



**HAL**  
open science

# Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bacterien, et le pommier (*Malus x domestica*)

Thomas Dugé de Bernonville

## ► To cite this version:

Thomas Dugé de Bernonville. Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bacterien, et le pommier (*Malus x domestica*). Biologie végétale. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00482385

**HAL Id: tel-00482385**

**<https://theses.hal.science/tel-00482385>**

Submitted on 10 May 2010

**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.

**CARACTERISATIONS HISTOLOGIQUE, MOLECULAIRE ET BIOCHIMIQUE DES INTERACTIONS  
COMPATIBLE ET INCOMPATIBLE ENTRE *ERWINIA AMYLOVORA*, AGENT DU FEU BACTERIEN,  
ET LE POMMIER (*MALUS X DOMESTICA*)**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie cellulaire et végétale

ECOLE DOCTORALE : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer (VENAM)

Présentée et soutenue publiquement

le 17 décembre 2009

à Angers

par Thomas Dugé de Bernonville

Devant le jury ci-dessous :

Philippe SIMONEAU (Président), Professeur, Université d'Angers

Isabelle DEBEAUJON (Rapporteur), Chargée de Recherches, INRA, Versailles

Yves MARCO (Rapporteur), Directeur de Recherches, CNRS, Toulouse

Dominique EXPERT (Examineur), Directeur de Recherches, CNRS, Paris

David WENDEHENNE (Examineur), Professeur, Université de Bourgogne

Marie-Noëlle BRISSET (Directeur de thèse), Chargée de Recherches, INRA, Angers

UMR077 Pathologie Végétale INRA-Agrocampus Ouest-Université d'Angers

INRA site d'Angers, 42, rue Georges Morel, BP60057, 49071 Beaucouzé cedex

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, Isabelle Debeaujon et Yves Marco m'ont accordé un immense privilège en acceptant d'être rapporteurs de ma thèse, je tiens donc à les remercier sincèrement, au même titre que Dominique Expert et David Wendehenne, qui ont bien voulu être examinateurs de ce travail, et Philippe Simoneau, pour avoir accepté de présider ce jury.

Tout ce travail n'aurait bien sûr pas été possible sans le soutien inconditionnel et l'aide inestimable de Marie-Noëlle Brisset, alias Nat, mon encadrante depuis maintenant 3 ans et demi. Je tiens donc tout particulièrement à te remercier pour toute cette aventure, qui a connu des hauts comme des bas, mais qui par-dessus tout aura été extrêmement enrichissante pour moi, à tous les niveaux. Merci énormément pour m'avoir accordé ta confiance.

J'adresse également mes remerciements à Jean-Pierre Paulin, Le Chef, pour sa vénérable sagesse, son esprit critique et son humour tordant. Vos conseils auront toujours été d'une grande valeur. Je suis également très reconnaissant à Michel Tharaud pour m'avoir aidé dans la préparation de communications orales, pour avoir accepté de lire ce document, mais également pour les discussions enrichissantes en tout genre.

Tu es arrivé dans l'équipe il y a à peine plus d'un an mais tu auras été cependant d'un grand apport pour ma 3<sup>e</sup> année de thèse, je tiens donc vivement à te remercier, James Dat, pour ton expertise scientifique et nos infinissables et ô combien stimulantes préparations d'expériences du siècle et ces réflexions métaphysiques sur comment montrer qu'Evereste est résistant au feu bactérien et MM106 sensible.

Je dois énormément aux autres membres de l'équipe GÉFIN : Sophie Cesbron, ces 3 années de bureau commun auront été très enrichissantes sur le plan scientifique et humain ; Christelle Heintz, pour toute son aide technique, dans tous les domaines quels qu'ils soient et sa disponibilité ; Roland Chartier, également pour son aide technique ainsi que la gestion du matériel végétal et bactériologique.

Voilà donc l'équipe GÉFIN au complet, Nat, le Chef, Dupondt, James, Sonia, Patton, Roncevaux, que j'ai eu l'immense chance et bonheur de connaître mais qui malheureusement est en cours de changement définitif. Un énorme merci à vous tous. Si c'était à refaire, je n'hésiterais pas une seconde. Je profite de ces remerciements pour saluer tous les stagiaires/CDD que nous avons encadrés et qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, un peu ou beaucoup, aux résultats présentés dans ce manuscrit : Mathieu Gauthier, Clément Gravouil (un cru exceptionnel ces deux-là), Julien Roboam, Julien Salliou, Arnaud Indiana, Damien Marcollin (ta collaboration au projet CoSaVe fut plus que remarquable, merci beaucoup à toi), Marine Pénisson (merci pour la préparation de la microscopie), Brice Marolleau (toi et les deux License Pro, le trio gagnant) et enfin Mathieu Gaucher, mon successeur, qui m'a énormément aidé techniquement et à qui j'adresse tout mes vœux de réussite pour les 3 ans à venir. Je vous remercie tous infiniment pour votre bonne humeur et votre dévouement.

Je souhaite sincèrement remercier Sylvain Guyot de l'Unité de Recherches Cidricoles de l'INRA du Rheu pour sa précieuse aide et sans qui le chapitre II présenté ici n'aurait peut-être jamais été écrit. Merci beaucoup pour ta disponibilité et tout ce que tu as pu m'apprendre, ç'a été un réel plaisir de collaborer avec toi.

Les analyses spectroscopiques qui ont permis d'identifier la sieboldine et la trilobatine ont été réalisées à l'Université d'Angers sous la responsabilité de Pascal Richomme, que je remercie pour son interprétation des spectres RMN. Je tiens à remercier Daniel Henrion, Laurent Loufrani et Kevin Retailau de l'équipe Biologie NeuroVasculaire Intégrée de la Faculté de Médecine d'Angers et Séverine Derbré de l'équipe Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux de l'UFR de Sciences Pharmaceutiques de l'INRA d'Angers pour nous avoir permis d'étudier plus largement les propriétés antioxydantes de la sieboldine, ainsi que David Guilet, du Plateau Technique PHYTO de l'IFR149, pour avoir participé à la purification de ce composé.

Le plateau technique IMAC de l'IFR149 nous a offert l'opportunité de réaliser l'analyse microscopique. Je veux donc remercier Marie Tellier et Michel Chevalier pour la qualité de leur aide et de leurs conseils.

Je souhaite aussi remercier Emilie Vergne-Gaillard et Jean-Guillaume Bertault, de l'UMR GenHort de l'INRA d'Angers, pour leur fructueuse collaboration au clonage et à la caractérisation des PPO du Pommier.

Je tiens ensuite à remercier tous les chercheurs, doctorants, techniciens et stagiaires de l'UMR PaVé pour leurs conseils, leur disponibilité et les échanges scientifiques divers et variés. J'en profite pour remercier grandement Elisabeth de Loménie, Secrétaire de Direction, pour son efficacité et sa gentillesse, ainsi qu'Elisabeth Dineau, pour son aide à l'obtention de certains articles scientifiques. Le matériel végétal a été soigneusement obtenu et entretenu par l'équipe des serres de l'UMR GenHort (scions), et en particulier, Lysianne Lecloux, et par l'équipe de la serre de l'UMR PaVé, Paul Horeau, Joël Besnard et Sylvain Hanteville (semis). Je les remercie donc grandement pour la qualité de leur travail. J'en profite également pour remercier Jacqueline Gaudin pour la préparation des milieux de culture et de l'eau stérile.

Finalement, je souhaite remercier très chaleureusement Bérénice Briand, pour sa participation à certaines manips, m'avoir attendu tous les midis pour aller manger, sa perpétuelle bonne humeur mais également pour son dévouement dans le maintien de mes conditions physiques et mentales au cours de la rédaction de ce document. Merci infiniment à toi. Je salue (corps et âme) Aymeric Boivin qui m'a aidé et encouragé au cours de ces derniers mois. Bien entendu, tout ceci n'aurait jamais été possible sans mes parents, que je remercie vivement pour m'avoir sans cesse encouragé et permis d'arriver jusque-là. En dernier lieu, je me permets de saluer Baptiste, Julien, Nok et Théau pour tout ce que nous avons pu faire avec IPR, pour tous ces bons moments passés ensemble ; ma thèse s'est faite en parallèle de ce projet, qui restera gravé à jamais dans ma mémoire.

## ABREVIATIONS

<b>4CL</b> 4-coumaroyl-CoA ligase	<b>DAMPs</b> damage-associated molecular patterns
<b>AAO3</b> aldehyde oxidase 3	<b>DEF</b> défensine
<b>ABA</b> acide abscissique	<b>DHC</b> dihydrochalcone
<b>APPH</b> 2,2-azobis(2-amidinopropane)	<b>DIPM</b> DspA/E-interacting protein from <i>Malus</i>
<b>ACC</b> 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	<b>DMAPP</b> diméthylallyl di-phosphate
<b>ACCS</b> ACC synthase	<b>DO</b> densité optique
<b>ACCO</b> ACC oxidase	<b>DPPH</b> 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl
<b>ACL</b> ATP:citrate lyase	<b>Dsp</b> disease specific
<b>ACP</b> analyse en composantes principales	<b>DXP</b> 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate
<b>AdoMet</b> S-adénosine-L-méthionine	<b>Ea</b> <i>Erwinia amylovora</i>
<b>AGEs</b> advanced glycation end-products	<b>EDS</b> enhanced disease susceptibility
<b>AIA</b> acide indole-acétique (auxine)	<b>EIL</b> EIN3-like
<b>ALLI</b> alliinase	<b>EIN</b> ethylene insensitive
<b>ANS2</b> anthocyanidine synthase2	<b>EPS</b> exopolysaccharide
<b>AOC</b> allene oxide cyclase	<b>EREBP</b> ethylene-response element binding protein
<b>AOS</b> allene oxide synthase	<b>ERF1</b> ethylene-response factor1
<b>AtSR</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> signal-responsive	<b>ERS</b> ethylene response sensor
<b>Avr</b> protéine d'avirulence	<b>EST</b> expressed sequence tag
<b>BA2H</b> benzoic acid 2-hydroxylase	<b>ET</b> éthylène
<b>BCB</b> blue copper-binding protein	<b>ETI</b> effector-triggered immunity
<b>b-CHI</b> basic chitinase	<b>ETO1</b> ethylene overexpressor1
<b>bHLH</b> basic helix-loop-helix	<b>ETP</b> EIN2 targeting protein
<b>CAD</b> cinnamyl alcohol dehydrogenase	<b>ETR</b> ethylene response
<b>CAH</b> cinnamate 4-hydroxylase	<b>FAO</b> formes actives de l'oxygène
<b>CaIS</b> callose synthase	<b>Flg22</b> peptide de la flagelline
<b>CAOMT</b> acide caféique o-méthyl transférase	<b>FPPS</b> farnesyl pyrophosphate synthase
<b>CBP</b> chlorophyll a/b binding protein	<b>GA</b> gibbérellines
<b>CCM</b> chromatographie sur couche mince	<b>GéFln</b> Génomique Fonctionnelle d'une Interaction
<b>CFBP</b> Collection Française de Bactéries Phytopathogènes	<b>GFP</b> green fluorescent protein
<b>CFU</b> colony-forming unit (unité de dénombrement bactérien)	<b>GPPS</b> geranyl pyrophosphate synthase
<b>CHS</b> chalcone synthase	<b>GgPPS</b> geranyl-geranyl pyrophosphate synthase
<b>Cn</b> chaîne aliphatique à n carbones (C16, C18,...)	<b>GC-MS</b> gas chromatography-mass spectrometry
<b>CO</b> catechol oxidase	<b>GMPc</b> guanosine monophosphate cyclique
<b>COI1</b> coronatine-insensitive1	<b>GNSO</b> S-nitrosylglutathion
<b>CTR</b> constitutive triple response	<b>GSSG</b> glutathion oxydé
<b>CWA</b> cell wall apposition	<b>GST</b> glutathione-S-transferase
<b>CYP</b> protéines-cytochrome P450-dépendante	<b>HEL</b> hevein-like
<b>Cytb6</b> cytochrome b6 réductase	<b>HMBC</b> Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HMGR** 3-hydroxy-3-methylglutarate-CoA reductase  
**HMQC** Heteronuclear Multiple Quantum Correlation  
**HIPM** HrpN-interacting protein from *Malus*  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** peroxyde d'hydrogène  
**hpi** heures post-infiltration  
**HR** hypersensitive response  
**HRGP** hydroxyproline-rich glycoprotein  
**ICS** isochorismate synthase  
**IEF** isoelectrofocalisation  
**IPP** isopentényl di-phosphate  
**ISR** induced systemic resistance  
**JA** acide jasmonique  
**JA-ACC** acide jasmonique conjugué à l'ACC  
**JA-Ile** jasmonoyl isoleucine  
**JAR1** jasmonate response locus1  
**JAZ** jasmonate ZIM-domain  
**JMT** jasmonate methyltransferase  
**LOX2** lipoxygenase2 (type 13)  
**IPL** parenchyme lacuneux lysé  
**LAC** laccase  
**LAP** leucine aminopeptidase  
**LC-DAD-MS** liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry  
**LD-PCR** long-distance PCR  
**LIM** limonene synthase  
**LMCO** laccase-like multicopper oxidase  
**LTP** lipid-transfer protein  
**LYTB** 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate reductase  
**MAMPs** microbe-associated molecular patterns  
**MAPK** mitogen-activated protein kinase  
**MBTH** 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone  
**MeJA** methyl-jasmonate  
**MEP** 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate  
**MeSA** methyl-salicylate  
**MF** matière fraîche  
**MS** matière sèche  
**MKS1** MAPK substrate1  
**MYC2** facteur de transcription allélique à *JAI1/JIN1* jasmonate (insensitive1)  
**NB-LRR** récepteur type nucleotide binding site/leucin-rich repeat (à motif TIR ou CC)  
**NCBI** National Center for Biotechnology information

**NER** niveau d'expression relative  
**NO** oxyde nitrique  
**NPR1** non-expressor of pathogenesis related-1  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** anion superoxyde  
**<sup>•</sup>OH** radical hydroxyle  
**OMT** o-methyltransferases  
**OPDA** acide (9S,13S)-12-oxo-cis-10,15-phytodiénoïque  
**OPR3** OPDA réductase  
**ORAC** oxygen radical absorbance capacity  
**PAD4** phytoalexin accumulation deficient4  
**PAL** phenylalanine ammonia lyase  
**PCD** programmed cell death  
**PCR** polymerase chain reaction  
**PDF** plant defensin  
**PERE** primary ethylene-responsive element  
**PGPR** plant growth-promoting rhizobacteria  
**PIN** protease inhibitor  
**PLD1** phospholipase D1  
**POP** phloridzin oxidation product  
**PPO** polyphénol oxydase  
**PR** pathogenesis-related  
**PRR** pattern recognition receptor  
**PSII** photosystème II  
***Pst*** *Pseudomonas syringae* pv. tomato  
**PTI** PAMP-triggered immunity  
**PUFAs** polyunsaturated fatty acids  
**PVPP** polyvinylpyrrolidone  
**PXA1** transporteur type ATP-Binding cassette  
**QTL** quantitative trait loci  
**R** protéine majeure de résistance  
**RLK** receptor-like kinase  
**RMN** résonance magnétique nucléaire  
**ROO<sup>•</sup>** radical peroxyde  
**RO<sup>•</sup>** radical phénoxyde  
**SA** acide salicylique  
**SAG101** senescence-associated gene101  
**SAMT** salicylic acid methyltransferase  
**SAR** systemic acquired resistance  
**SCF** SKP1-CUL1-F-box E3 ubiquitine ligase  
**SDS** sodium dodecyl sulphate  
**SDS-PAGE** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
**SID2** salicylic acid induction deficient2  
**SIPK** salicylate-induced protein kinase  
**SOT** sorbitol transporter

**SSH** *suppressive subtractive hybridisation*

**SSI2** *suppressor of salicylate insensitivity2*

**STS** *stilbene synthase*

**SUT** *sucrose transporter*

**T3SS** *type III secretion system*

**TEAC** *trolox equivalent antioxidant capacity*

**TMV** *tobacco mosaic virus*

**Trolox** *(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchromane-2-carboxylic acid*

**TRX** *thioredoxine*

**TYR** *tyrosinase*

**UV** *ultraviolet*

**UV/Vis** *spectres ultraviolet/visible*

**VSP** *vegetative storage protein*

**WIPK** *wound-induced protein kinase*

## REMERCIEMENTS

## ABREVIATIONS

## INTRODUCTION GENERALE 1

## CHAPITRE I. CARACTERISATIONS HISTOLOGIQUE ET TRANSCRIPTIONNELLE DE L'INTERACTION 5

### I. Symptomatologie et histologie de l'interaction 7

#### I.1. Etude bibliographique 7

##### I.1.1. Les barrières physiques des plantes 7

###### *I.1.1.a) La cuticule 8*

###### *I.1.1.b) La paroi cellulaire 10*

###### *I.1.1.c) Le système vasculaire 14*

##### I.1.2. Histologie et cytologie de l'interaction Pommier/*Ea* 15

###### *I.1.2.a) Localisation de la bactérie dans les tissus infectés 15*

###### *I.1.2.b) Analyse histologique des symptômes 16*

#### I.2. Résultats 17

##### I.2.1. Symptomatologie et ultrastructure de l'interaction 17

##### I.2.2. Etude microscopique de l'interaction avec MM106 et Evereste 20

#### I.3. Récapitulatif et interprétation 23

### II. Caractérisation moléculaire de l'interaction 29

#### II.1. Etude bibliographique 31

##### II.1.1. La perception des agents pathogènes 31

##### II.1.2. Les voies de défenses 33

###### *II.1.2.a) L'acide salicylique 34*

###### *II.1.2.b) L'acide jasmonique 41*

###### *II.1.2.c) L'éthylène 48*

###### *II.1.2.d) Interactions entre les voies 51*

###### *II.1.2.e) Le contrôle de la mort cellulaire 53*

##### II.1.3. Autres gènes impliqués dans les interactions plante-microorganisme 55

###### *II.1.3.a) La photosynthèse 55*

###### *II.1.3.b) Les sucres 56*

#### II.2. Résultats : Expression des gènes candidats au cours de l'interaction entre *Ea* et Evereste/MM106 56

##### II.2.1. Exploitation des résultats 57

##### II.2.2. Analyse globale des résultats 58

##### II.2.3. Comparaison des niveaux d'expression des gènes entre les deux génotypes 59

##### II.2.4. Modulation des expressions de gènes après infection dans chaque génotype. 61

###### *II.2.4.a) Les gènes induits 62*

###### *II.2.4.b) Les gènes réprimés 63*

##### II.2.5. Bilan 64

#### II.3. Approfondissements 65

##### II.3.1. Comparaison des réponses moléculaires entre limbe et nervure 65

##### II.3.2. *LTP15* est très fortement induit chez Evereste au cours de l'interaction 67

### III. Discussion sur les données histologiques et transcriptionnelles 68

### IV. Matériel et méthodes 79

#### IV.1. Matériel biologique 79

#### IV.2. Produits chimiques 79

#### IV.3. Inoculation par infiltration 79

#### IV.4. Dénombrements bactériens 80

<b>IV.5. Microscopie optique</b>	<b>80</b>
<b>IV.6. Analyse d'expressions de gènes</b>	<b>81</b>
IV.6.1. Extraction d'ARN	81
IV.6.2. Rétro-transcription	82
IV.6.3. Suivi de l'expression de gènes par PCR quantitative	83
IV.6.4. Analyses statistiques	84
<b>IV.7. Manipulations de l'ADN : amplification et clonage</b>	<b>84</b>
IV.7.1. Clonage	84
IV.7.2. Amplification par PCR	85
IV.7.3. RACE-PCR	85

## **CHAPITRE II. CARACTERISATION DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES ET ANTIOXYDANTES D'UNE SOUS-FAMILLE DE FLAVONOÏDES, LES DIHYDROCHALCONES (DHC), DANS LES FEUILLES DE POMMIER – IMPLICATION DES DHC ET DE LEURS PRODUITS DE TRANSFORMATION, DANS L'INTERACTION EA-POMMIER**

**86**

<b>I. Etude de métabolites secondaires constitutifs du Pommier</b>	<b>89</b>
<b>I.1. Etude bibliographique</b>	<b>89</b>
I.1.1. Les produits phénoliques	89
<i>I.1.1.a) Biosynthèse</i>	89
<i>I.1.1.b) Régulations et rôles</i>	91
I.1.2. Les isoprénoïdes	93
<i>I.1.2.a) Biosynthèse</i>	93
<i>I.1.2.b) Régulation et rôles</i>	94
I.1.3. Les cystéines sulfoxydes	97
<b>I.2. Résultats</b>	<b>98</b>
I.2.1. Profils des flavonoïdes solubles	98
I.2.2. Activités antioxydantes des DHC purifiées à partir des feuilles	101
I.2.3. Activités antioxydantes des feuilles d'Evereste et de MM106	102
<i>I.2.3.a) Activité des extraits méthanoliques de feuilles</i>	102
<i>I.2.3.b) Protection contre le choc oxydant induit par le paraquat</i>	103
I.2.4. Activités antibactériennes	105
I.2.5. Profilage métabolique de 18 descendants issus du croisement entre Evereste et MM106	106
I.2.6. Bioactivités des dihydrochalcones	108
<i>I.2.6.a) Activité vasorelaxante de segments d'artères mésentériques de rat</i>	109
<i>I.2.6.b) Inhibition de la formation des produits avancés de glycation (AGEs)</i>	110
<b>I.3. Conclusion sur les DHC constitutives</b>	<b>112</b>
<b>II. Analyse des produits de transformation des DHC</b>	<b>114</b>
<b>II.1. Etude bibliographique : la transformation des flavonoïdes.</b>	<b>115</b>
II.1.1. L'oxydation	117
<i>II.1.1.a) Les polyphénol oxydases</i>	117
<i>II.1.1.b) Les peroxydases</i>	124
<i>II.1.1.c) Autres réactions d'oxydation</i>	127
II.1.2. Glycosylation/déglycosylation	128
II.1.3. Autres réactions de transformation	129
<b>II.2. Etude enzymatique des réactions de transformation des DHC du Pommier et caractérisation moléculaire des PPO</b>	<b>132</b>
II.2.1. Activités des enzymes de transformation au cours de l'interaction	132
<i>II.2.1.a) Détermination du pH optimal d'activité des PPO</i>	132
<i>II.2.1.b) Erwinia amylovora induit fortement les activités crésolases et catécholases chez ses hôtes</i>	133
II.2.3. Caractérisation moléculaire des PPO d'Evereste et de MM106	135
<i>II.2.3.a) Obtention des transcrits de PPO et analyse des séquences protéiques</i>	135
<i>II.2.3.a) Profils d'expression des PPO au cours de l'interaction</i>	137
II.2.4. Transformation de la phloridzine <i>in vitro</i> en présence d'extraits enzymatiques totaux	140
<i>II.2.4.a) Les produits de transformation sont antibactériens</i>	140
<i>II.2.4.b) Identification des produits de transformation</i>	140

II.2.5. Etude de broyats de feuilles d'Evereste et de MM106	145
II.2.5.a) Etude des produits issus de la transformation des DHC dans des broyats de feuilles d'Evereste et de MM106	145
II.2.5.b) Identification des produits de transformation	146
II.2.5.c) Phlorétine et activité antimicrobienne	150
<b>III. Discussion sur les DHC constitutives et leurs produits de transformation</b>	<b>152</b>
<b>IV. Matériel et Méthodes</b>	<b>159</b>
IV.1. Produits chimiques	159
IV.2. Matériel biologique	159
IV.3. HPLC analytique et techniques spectroscopiques	159
IV.3.1. HPLC	159
IV.3.2. Spectrométrie de masse	160
IV.3.3. Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du carbone	160
IV.4. Purification des DHC des feuilles de Pommier	161
IV.5. Tests antioxydants	161
IV.5.1. Activité antiradicalaire, piégeage du DPPH	161
IV.5.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	162
IV.5.3. Tolérance au paraquat	162
IV.5.4. Activité anti-vasoconstriction	163
IV.5.5. Inhibition de la formation des AGEs (produits de glycation avancés)	163
IV.6. Evaluation des activités antibactériennes	164
IV.6.1. Sur boîte	164
IV.6.2. En bioscreen	164
IV.7. Dosages enzymatiques	165
IV.7.1. Préparation	165
IV.7.2. Dosage des protéines totales	165
IV.7.3. Activité polyphénol oxydase (catécholase et tyrosinase)	166
IV.7.4. Activité peroxydase	166
IV.7.5. B-glucosidase	166
IV.7.6. Electrophorèse des protéines totales	167
IV.7.6.a) Gel en condition dénaturantes (SDS-PAGE)	167
IV.7.6.b) Isoélectrofocalisation (IEF)	167
IV.7.6.c) Révélation des activités PPO sur gel	167
IV.8. Etude moléculaire des PPO	168
IV.9. Analyse des produits de transformation des DHC	168
IV.9.1. Transformation <i>in vitro</i> de la phloridzine.	168
IV.9.2. Broyages de feuilles	169
IV.9.3. Chromatographie sur couche mince CCM	169
IV.10. Analyses statistiques	170
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>171</b>
<b>LISTE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>180</b>
<b>ANNEXE : PUBLICATION ACCEPTEE DANS PHYTOCHEMISTRY</b>	

**“DIHYDROCHALCONES: IMPLICATION IN RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS AND BIOACTIVITIES AGAINST ADVANCED GLYCATION END-PRODUCT AND VASOCONSTRICTION”**

## **INTRODUCTION GENERALE**

Le feu bactérien des *Maloideae*, une tribu des Rosacées incluant des arbres fruitiers à pépins (Pommier, Poirier, Cognassier) et des arbustes ornementaux (tels que Cotoneaster, Pyracantha, Aubépine), est causé par *Erwinia amylovora* (Ea), une gamma-protéobactérie nécrogène. Cette maladie s'exprime essentiellement par des nécroses évolutives et des dessèchements des parties aériennes. Les jeunes pousses atteintes ont tendance à se recourber en crosse et des gouttelettes d'exsudat, mélange d'exopolysaccharides et de bactéries, sont émises fréquemment à la surface des tissus infectés (Encart 1). Ces deux symptômes sont caractéristiques de la maladie. Le pathogène peut provoquer la mort de l'arbre dans le cas de variétés très sensibles. La maladie a été détectée pour la première fois aux Etats-Unis à la fin du XVIIIe siècle, puis est apparue sur le continent Européen à partir de 1960. Des attaques sont régulièrement observées dans les zones productrices européennes, en France, en Suisse et en Espagne par exemple. Des cas ont été déclarés récemment (2006) en Afrique du Nord. La maladie est donc en constante extension. De grandes régions productrices de pommes et de poires, comme la Chine et le Chili, sont encore indemnes du pathogène.

La prophylaxie est la méthode de lutte la plus couramment utilisée pour limiter la généralisation des symptômes et la transmission d'arbres en arbres, en association avec l'utilisation de variétés moyennement sensibles. Les possibilités de lutte chimique sont plutôt limitées, la molécule la plus efficace étant la streptomycine, un antibiotique dont l'usage est interdit ou réglementé de manière très stricte selon les pays. L'utilisation de stimulateurs de défense de la plante pourrait offrir une solution alternative puisque certains éliciteurs, tels que l'acibenzolar-S-méthyl, analogue de l'acide salicylique, ou bien le prohexadione-calcium, un réducteur de croissance, montrent expérimentalement des potentialités de protection, partielle mais significative, contre le feu bactérien. La création de variétés résistantes de Pommier, par sélection variétale ou transgénèse, serait une autre option dans la lutte. Jusqu'à récemment la résistance au feu bactérien était plutôt décrite comme quantitative, mais dernièrement plusieurs forts QTL de résistance ont été repérés chez le Pommier (Calenge et al., 2005 ; Peil et al., 2007 ; Durel et al., 2009), laissant supposer l'existence de gènes majeurs de résistance, utilisables dans des programmes de sélection variétale. Concernant la transgénèse, plusieurs constructions ont déjà été étudiées expérimentalement qui s'appuient sur les connaissances accumulées sur la bactérie. Jusqu'à présent, ces constructions intègrent surtout des transgènes d'origine non végétale, par

exemple une dépolymérase de l'exopolysaccharide (EPS) d'*Ea* d'origine virale (Malnoy et al., 2005) ou bien une lactoferrine destinée à appauvrir en fer, indispensable à la bactérie, les espaces intercellulaires de la plante (Malnoy et al., 2003). L'induction des défenses du Pommier dans des constructions transgéniques a également été réalisée, par surexpression d'un effecteur protéique d'*Erwinia amylovora* (HrpN ; Vergne et al., 2009) ou bien d'une protéine de régulation des défenses (MdNPR1 ; Malnoy et al., 2007). La recherche actuelle s'oriente plutôt vers l'intragenèse et vise à exploiter les connaissances acquises sur les défenses de plantes hôtes potentiellement efficaces contre *Erwinia amylovora*. C'est dans l'acquisition de ces connaissances que se situe le travail de recherche présenté ici.

L'étude du dialogue moléculaire qui s'installe entre la bactérie et ses hôtes, sensibles et résistants, est un domaine de recherche actif, notamment au sein de l'équipe GéFlN, de l'UMR PaVé du site INRA d'Angers. Les données disponibles dans la littérature sur les réponses des plantes à l'infection par *Ea* sont décrites dans le chapitre I. Concernant le pouvoir pathogène de la bactérie, les recherches ont débuté depuis une vingtaine d'années et les différents facteurs impliqués ont été identifiés. Ce pouvoir pathogène (revu dans Oh et Beer, 2005) repose essentiellement sur la capacité de la bactérie à injecter des effecteurs protéiques au sein des cellules végétales ou à les sécréter dans l'apoplaste, *via* un système de sécrétion de type III (T3SS, Type III Secretion System), formé d'une accroche membranaire et d'un pilus par lequel transitent les effecteurs (Mudgett, 2005). Ils sont décrits dans l'encart 2. Le second facteur essentiel du pouvoir pathogène est la capsule de la bactérie formée d'EPS, qui lui est indispensable pour sa multiplication dans les tissus de la plante (Geider, 2000). Enfin, *Erwinia amylovora* produit un sidérophore de type desferrioxamine, impliqué dans l'agressivité (Dellagi et al., 1998). A la différence d'autres espèces bactériennes anciennement classées dans le genre *Erwinia* (appelées maintenant *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.), *Ea* ne sécrète pas d'enzymes pectinolytiques (Seemüller et Beer, 1976).

Les travaux présentés dans ce document ont pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de résistance et de sensibilité du Pommier (*Malus x domestica*) à *Erwinia amylovora*. Plusieurs approches ont été menées pour décrire la physiologie de l'interaction : cyto-histologie, analyses transcriptionnelles et métaboliques. Comme il sera décrit dans chacune des études bibliographiques, des données sont déjà disponibles sur l'interaction

entre *Ea* et le Pommier. Toutefois ces données sont assez disparates et les différents travaux réalisés jusqu'à présent ont apporté davantage sur la compréhension du pouvoir pathogène de la bactérie que sur les réponses du Pommier à l'infection, même si la tendance semble s'inverser depuis quelques années, notamment grâce aux travaux réalisés au sein de l'équipe GéFIn. L'originalité de la présente étude est de caractériser, dans la continuité des travaux précédents (thèses Venisse, 2003 et Pontais, 2006), les réponses à l'infection par *Erwinia amylovora* de deux génotypes de Pommier, l'un sensible, MM106, et l'autre résistant, Evereste, par une combinaison de plusieurs approches, et dans des conditions expérimentales toujours identiques. Les résultats ont permis de mettre en évidence un certain nombre de processus intéressants qui offrent des perspectives prometteuses pour la compréhension de l'interaction *Ea*/Pommier.

## **CHAPITRE I.**

### **CARACTERISATIONS HISTOLOGIQUE ET TRANSCRIPTIONNELLE**

### **DE L'INTERACTION**

Le pathosystème *Ea*-MM106/Evereste est étudié depuis plusieurs années au laboratoire GÉFIn pour tenter de comprendre les événements moléculaires associés à la sensibilité (interaction compatible avec le génotype MM106) et à la résistance (interaction incompatible avec le génotype Evereste) du Pommier au feu bactérien (Venisse et al., 2002 ; Pontais et al., 2008). Les travaux présentés ici visent à approfondir la connaissance de ce pathosystème et à identifier et caractériser de nouveaux marqueurs associés à chaque type d'interaction. Deux approches ont été utilisées : une première approche, histologique et exploratoire basée sur l'utilisation de la coloration au bleu de toluidine de coupes de tissus infectés inclus dans une résine (Ramalingam et Ravindranath, 1970) et d'une souche GFP d'*Ea* (Bogs et al., 1998 et 2004), et la seconde approche, transcriptionnelle, visant à élargir les résultats obtenus par Venisse et al. (2002) ; cette dernière a été rendue possible grâce à l'enrichissement des banques de données en séquences nucléotidiques de Pommier ces dernières années. Les méthodes d'inoculation, de préparation d'inoculum et de prélèvement sont similaires dans chacune des approches, dans le but de pouvoir associer données tissulaires/cellulaires et données moléculaires. L'objectif de la première étude est de préciser si les tissus des deux génotypes sont organisés de façon semblable ou au contraire présentent des caractères propres, soit au niveau constitutif, soit au cours de l'infection, ainsi que de comprendre le développement spatio-temporel de la maladie. La seconde approche vise à analyser les réponses transcriptionnelles des deux génotypes à l'infection par la bactérie et à identifier les défenses potentiellement impliquées dans la résistance.

## ***I. Symptomatologie et histologie de l'interaction***

Comme le montre l'étude bibliographique suivante, l'histologie et la cytologie de l'interaction entre *Erwinia amylovora* et une variété sensible de Pommier ont déjà été abordées (Tableau I.1.). Cependant, aucune approche de ce genre n'a encore été réalisée sur un hôte résistant ni utilisée pour comparer les réponses entre hôte sensible et résistant. Cette approche, essentiellement basée sur l'utilisation de la microscopie, a pour objectif de mieux caractériser le pathosystème *Ea-Evereste/MM106*. La première partie de cette étude rassemble les données présentes dans la littérature concernant les structures constitutives et induites des plantes qui sont susceptibles de remplir un rôle de barrière contre les bioagresseurs.

### **I.1. Etude bibliographique**

#### **I.1.1. Les barrières physiques des plantes**

Il existe un certain nombre de barrières préformées, telles que la cuticule et la paroi des cellules, offrant à la plante une résistance innée et directe contre les agressions extérieures et notamment les agents pathogènes (Dangl et Jones, 2001 ; Nürnberger et al., 2004). Cependant, il y a certains cas où les pathogènes ont réussi à contourner ces défenses, ce qui a contraint les plantes à élaborer des systèmes de reconnaissance permettant l'activation de défenses. La reconnaissance d'un pathogène par l'intermédiaire de ses MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) provoque dans un premier temps des défenses qualifiées de « basales », car elles ne sont pas vraiment spécifiques d'un pathogène donné (Nürnberger et al., 2004 ; Bent et Mackey, 2007). Une de ces réponses est la formation de papilles au site d'infection qui créent un obstacle physico-chimique à la pénétration du pathogène (Pearce, 1996 ; Hüchelhoven, 2007). Les stomates peuvent même être impliqués, dans la mesure où il a été montré que la reconnaissance précoce de *Pst* DC3000 par *Arabidopsis* s'accompagne d'une fermeture rapide des stomates, en lien avec une production d'oxyde nitrique (NO) et sous la dépendance de l'acide abscissique (Melotto

et al., 2006). Ce type de réponse vise donc à limiter l'entrée du pathogène en constituant une véritable barrière, bien que ce résultat reste à généraliser à d'autres espèces végétales.

Dans le pathosystème *Ea*-Pommier, la cuticule présente un obstacle important à la pénétration de la bactérie, qui doit donc pénétrer dans la plante par des ouvertures naturelles (stomates, hydathodes) ou bien des blessures (Thomson, 2000). Les trichomes localisés sur l'épiderme pourraient également constituer une niche favorable à la bactérie en augmentant l'humidité environnante et en offrant une ouverture de taille appropriée quand ils se brisent, altérant ainsi l'intégrité de l'épiderme (Bogs et al., 1998).

Les paragraphes suivants ont pour objectif de présenter les principaux éléments anatomiques des plantes capables de limiter la progression des pathogènes.

#### *1.1.1.a) La cuticule*

Pour se protéger des stress biotiques et abiotiques (UV notamment) et lutter contre les pertes d'eau, les épidermes sont recouverts, chez la plupart des végétaux, d'une substance hydrophobe, la cuticule. Cette dernière est composée principalement de cutine et de cires, qui composent l'épicuticule (Heredia, 2003 ; Nawrath, 2006). La cutine comporte des acides gras en C16 ou C18, estérifiés, et hydroxylés ou époxyhydroxylés. Les cires sont beaucoup plus diversifiées et contiennent des molécules à chaîne longue (C24 à C36), telles que des aldéhydes, des alcools, des alcanes, ainsi que certains composés cycliques comme des triterpènes et des acides hydroxycinnamiques (Heredia, 2003 ; Nawrath, 2006). La synthèse et l'assemblage de la cuticule ne sont pas encore parfaitement connus. Les monomères de cutine sont synthétisés à partir d'acide oléique ou linoléique par des phénomènes d'hydroxylation et d'époxydation successives, réactions catalysées par des enzymes de type cytochrome P450 (CYP) ou bien des peroxygénases (qui diffèrent des peroxydases par le mode d'oxydation). Selon les espèces, la cutine contient plus ou moins de monomères en C16 ou en C18, bien que cela n'ait pas de conséquences particulières sur ses propriétés (Lequeu et al., 2003). Cependant, une déficience en époxydes diminue l'épaisseur de la cuticule et, chez le maïs, provoque une sensibilité accrue à l'agent pathogène fongique *Cochliobolus heterostrophus*. L'assemblage complexe de ces monomères par estérification des fonctions hydroxyles et par des phénomènes de cross-linking, forme un réseau amorphe et flexible, bien que les points de cross-linking confèrent une certaine rigidité (Heredia, 2003). Le transport des monomères de cutine nécessiterait l'action de LTP (Lipid-Transfer

Protein), étant donnée que des gènes codant de telles protéines sont fortement exprimés dans l'épiderme (Suh et al., 2005). Le rôle des LTP sera rediscuté dans la partie transcriptomique de cette étude. La cuticule de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* est assez différente de la structure décrite chez d'autres espèces. Elle est riche en acides dicarboxyliques et acides gras à longue chaîne atypique et est particulièrement fine (Nawrath, 2006). Par conséquent, les données acquises sur la cuticule de cette espèce ne sont pas toujours directement transposables à d'autres espèces.

La cuticule joue un rôle important dans les interactions plante-pathogène. Tout d'abord, cette structure crée une barrière difficilement franchissable et les pathogènes ont dû développer des stratégies leur permettant de la franchir. Une de ces stratégies est la production d'enzymes de dégradation de la cutine, des cutinases et des lipases (Walton, 1994). Un certain nombre de champignons pathogènes nécrotrophes produisent de telles enzymes, tels que *Botrytis cinerea* et *Nectria haematococca* (Hématy et al., 2009). Une autre stratégie utilisée par les champignons est l'application d'une pression mécanique suffisamment forte pour briser la cuticule, grâce à la mise en place d'appressoria, comme c'est le cas pour *Magnaporthe grisea*, agent de la pyriculariose du riz (van Kan, 2006). Cependant, les bactéries phytopathogènes ne semblent pas produire pas d'enzymes capables de dégrader la cutine (Dutta et al., 2009). C'est notamment le cas pour *Erwinia amylovora*, qui ne possède pas non plus d'enzymes de dégradation de la paroi végétale (Seemüller et Beer, 1976). Ceci explique d'ailleurs pourquoi, comme la plupart des bactéries pathogènes des organes aériens des plantes, elle pénètre par des ouvertures naturelles ou par des blessures.

Au-delà du rôle de barrière, la cutine peut jouer un rôle important dans l'interaction avec les bactéries : des travaux suggèrent que certains types de monomères de cutine sont capables de réprimer l'expression des effecteurs de type III de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Xiao et al., 2004). Des mutants d'*Arabidopsis* déficients pour la synthèse de ces monomères présentent une cuticule moins épaisse et sont plus sensibles à ce pathogène. De plus, il semble que les monomères de cutine puissent être perçus par la plante comme un signal d'activation de défense, c'est-à-dire qu'ils agissent comme des éliciteurs. En effet, des hydrolysats de cutine de tomate induisent l'expression d'une glutathion-S-transférase sur des cultures cellulaires de pomme de terre (Schweizer et al., 1996) et la surexpression d'une cutinase fongique chez *Arabidopsis* confère une résistance très forte à *Botrytis cinerea* (Chassot et al., 2007). Les monomères de cutine sont reconnus spécifiquement et induisent

l'expression de certaines défenses, de manière indépendante des voies de signalisation de l'acide salicylique, l'acide jasmonique et de l'éthylène (qui seront détaillées plus loin dans ce chapitre), telle que des LTP, des peroxydases et des inhibiteurs de protéase (Chassot et al., 2007). Ainsi les monomères de cutine sont potentiellement impliqués dans l'activation des défenses de la plante, processus que la bactérie doit probablement éviter pour réussir l'infection. Ainsi, la cuticule intervient non seulement dans la protection passive mais également dans le réseau de perception externe que la plante met en place pour assurer son développement.

Il y a peu de données dans la littérature sur la cuticule des feuilles de Pommier et son implication dans la résistance aux agents pathogènes. Une étude montre que la résistance ontologique à la tavelure n'est pas liée à une barrière physique créée par la cuticule car le champignon responsable, *Venturia inaequalis*, est capable de la traverser par émission d'un haustorium (Valsangiacomo et Gessler, 1988). Dans le cas d'*Ea*, il semble peu probable que la cuticule intervienne dans la résistance du Pommier au feu bactérien, puisque ce pathogène pénètre plutôt par des ouvertures naturelles, telles que les stomates et les hydathodes, ou bien des blessures.

#### *1.1.1.b) La paroi cellulaire*

La paroi primaire des cellules végétales est le deuxième obstacle que doivent franchir les pathogènes, après leur pénétration dans les tissus. Elle correspond à d'une structure complexe essentiellement constituée de polysaccharides (Cosgrove, 2005). Globalement, elle s'organise en longues fibres de celluloses ( $\beta$ -1,4-glucane) parallèles au plasmalemme qui sont rattachées entre elles (Fig.1.1.A), probablement de manière non covalente, *via* un réseau d'hémicelluloses ( $\beta$ -1,4-glucane ou  $\beta$ -1,4-xylane, chaque sous-unité portant plusieurs substitution par du xylose ou de l'arabinose), bien que la composition exacte varie selon les tissus considérés (Knox, 2008). La paroi cellulaire comprend également un important réseau de pectines (homo- ou hétéro-polymères d'acide galacturonique plus ou moins ramifiés par d'autres polysaccharides) reliées entre elles en présence de calcium, qui exerce un phénomène de cross-linking entre leurs fonctions carboxylates. Ce cross-linking est régulé par le degré de méthylation des pectines (Cosgrove, 2005). En absence de stress, la paroi primaire ne contient pas de callose ni de lignine, même si des esters d'acide férulique

participent constitutivement à la liaison entre les différents composants structuraux. Ce réseau ainsi formé est très solide mais cependant flexible.

La paroi cellulaire secondaire est essentiellement mise en place au cours de la maturation du xylème pour assurer la rigidité des trachéides notamment. Elle contient principalement des fibres de cellulose, ainsi que de la lignine et du xylane qui assure le cross-linking entre les différents éléments (Ye et al., 2006). Cependant, sa composition est bien plus variable selon les espèces étudiées que celle de la paroi primaire (Knox, 2008). La synthèse de la paroi secondaire implique des cellulose synthases spécifiques ainsi que des glycosyl-transférases (Ye et al., 2006).

Pour pénétrer ce réseau polysaccharidique, beaucoup de pathogènes fongiques et bactériens utilisent des enzymes de dégradation de la paroi comme des cellulases, des pectinases, et glucanases diverses (Watson, 1994 ; Hüchelhoven, 2007). A l'image des cutines, la fragmentation des pectines sous l'action d'endogalacturonases produit des oligogalacturonates susceptibles d'être perçus par la plante comme un signal d'agression et de provoquer l'expression de défenses, ce qui a donné naissance au concept de DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns ; Heil, 2009). Ceci a été observé depuis longtemps, par exemple sur des cultures cellulaires de persil (Davis et Halhbrock, 1987), sur lesquelles l'application de lysats de parois cellulaires obtenus par une endogalacturonate lyase de *Pectobacterium carotovorum* induit la synthèse de coumarines (des phytoalexines) et l'activité phénylalanine ammonia lyase (PAL, première enzyme de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes). Les oligogalacturonates sont obtenus après une lyse partielle des pectines, et l'ensemble des études réalisées à ce jour semble indiquer que les oligomères comportant entre 10 et 12 unités sont les plus actifs (Shibuya et Minami, 2001). Des travaux plus récents montrent que l'activation des défenses (glutathion-S-transférase, PAL, chitinases et glucanases entre autres) dans des cellules de vigne traitées par des oligogalacturonates est dépendante de la production de formes actives de l'oxygène (FAO) et fait intervenir des cascades de phosphorylation (Aziz et al., 2004). Comme mentionné ci-dessus, *Erwinia amylovora* ne possède pas d'enzymes de dégradation de la paroi, et ce phénomène ne devrait donc pas se produire de manière directe lors de son interaction sur Pommier. En revanche, il se peut que les dégâts cellulaires et membranaires provoqués par la bactérie au cours de l'infection génèrent de tels éliciteurs endogènes, participant à l'activation des réponses de la plante.

D'un autre côté, une étude récente montre que des mutants d'*Arabidopsis* déficients pour la synthèse de la paroi cellulaire secondaire sont plus résistants à des pathogènes bactérien (*Ralstonia solanacearum*) et fongique (*Plectosphaerella cucumerina*), en liaison avec une surexpression constitutive de défenses « acide abscissique (ABA)-dépendantes » (Hernandez-Blanco et al., 2007). L'hypothèse est faite que certains éléments de la paroi agissent comme des modulateurs de l'expression de gènes de défense et que l'expression constitutive de certaines LTP et de métabolites secondaires type glucosinates chez ces mutants participent à la création d'un environnement antimicrobien.

Au-delà de ces inductions de défenses, la paroi cellulaire peut subir un renforcement localisé sous la forme d'une structure appelée papille ou apposition pariétale (Cell Wall Apposition, CWA), caractérisée par l'inclusion de matériel non constitutivement présent dans les parois (Hückelhoven, 2007). Les principaux composés structuraux présents dans les papilles sont la lignine et la callose. Elles peuvent également contenir d'autres composés antibactériens comme certains produits phénoliques. Le rôle de ces papilles dans le blocage de la pénétration par création d'une résistance physico-chimique aux appressoria fongiques a été démontré à plusieurs reprises (Hückelhoven et al., 1999 ; Bhuiyan et al., 2009 ; Collinge, 2009) ainsi que dans la résistance vis-à-vis de bactéries (Elfstrand et al., 2002 ; Hauck et al., 2003 ; DebRoy et al., 2004 ; Mishina et Zeier, 2007). Ces papilles constituent véritablement l'interface entre la plante et le pathogène, c'est vers ce point que les défenses de la plante seront dirigées (Kwon et al., 2008).

#### *-La callose*

La callose est un polymère de  $\beta$ -1,3-glucanes dont la synthèse est catalysée par des callose synthases (CaS) (Kwon et al., 2008). Elle peut facilement être observée par fluorescence après marquage au bleu d'aniline. La callose est très souvent synthétisée dans les papilles mises en place rapidement après détection d'un pathogène, comme par exemple dans l'interaction incompatible coton-*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Dai et al., 1996) ou laitue-*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Bestwick et al., 1995). Dans cette dernière étude les auteurs montrent que la formation de papilles est T3SS-indépendante et pourrait donc impliquer la perception de MAMPs par la laitue. Cette proposition est renforcée par Gomez-Gomez et al. (1999) qui montrent que la reconnaissance du motif flg22 de la flagelline provoque dans les feuilles d'*Arabidopsis* la production et le dépôt de callose et s'accompagne de l'induction des gènes *PR-1* et *PR-5*. Le dépôt de callose dans les parois

peut donc être induit après perception de MAMPs. Ces appositions pariétales sont réprimées par l'effecteur AvrPto de *Pst* DC3000 (Hauck et al., 2003) chez les variétés sensibles d'*Arabidopsis*, et il en est de même pour DspA/E d'*Ea* qui réprime les dépôts de callose induits par HrpN chez *Arabidopsis* (M.-A. Barny, com. pers.) et chez le Pommier (DebRoy et al., 2004). Ces données montrent bien que la callose est importante chez la plante pour limiter la progression de l'agent pathogène, et que celui-ci tend à réprimer son dépôt. De manière remarquable, *Ea* induit les dépôts de callose lors de l'interaction avec *Arabidopsis*, de manière T3SS-dépendante (Degrave et al., 2008). Cette interaction avec la plante modèle aboutissant à une réaction similaire à une HR et à des symptômes avortés (localisés), suggère que ces dépôts de callose pourraient participer au blocage de la progression d'*Ea*.

#### -La lignine

La synthèse de lignine met en oeuvre une voie complexe qui utilise des monolignols dérivés de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes comme précurseurs (Boerjan et al., 2003). Plusieurs enzymes clés sont impliquées : la cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) et les *ortho*-méthyltransférases (OMT), ainsi que les peroxydases et les laccases, enzymes terminales impliquées dans la polymérisation des monomères (Fig.1.1.B). Des travaux sur l'interaction *Blumeria graminis*-orge montrent l'importance de la formation de papilles, au niveau de l'épiderme de la plante, dans la résistance à la pénétration par le pathogène (Hückelhoven et al., 1999). La formation de papilles au cours de l'interaction *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* –blé s'accompagne d'une forte induction des activités PAL et acide caféique O-méthyltransférase (CAOMT) et d'une forte production de lignine *in situ*, visible par fluorescence (Bhuiyan et al., 2009). De plus, le blocage de ces enzymes à l'aide d'inhibiteurs favorise la pénétration par le pathogène.

Dans le cas des interactions plante-bactérie, il a été montré que les papilles formées par *Arabidopsis* en réponse à des pathogènes hétérologues (*Pseudomonas syringae* pv. *glycines* ou *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) sont probablement enrichies en lignine car ces différentes bactéries induisent l'expression de la PAL et d'une enzyme de synthèse de lignine (BCB, Blue Copper-Binding protein, type laccase) (Mishina et Zeier, 2007). Ce mécanisme constitue donc une réponse non-hôte. Des tabacs surexprimant une peroxydase de pin (SPI2) montrent une composition en lignine légèrement différente et sont plus résistants à la bactérie macergène *Pectobacterium carotovorum*, qui se multiplie beaucoup

moins efficacement dans ces tabacs mutants que dans les sauvages (Elfstrand et al., 2002). Bien que le mécanisme fonctionnel associé n'ait pas été décrit, ces résultats suggèrent que la lignine est susceptible de jouer un rôle important dans les interactions plantes-bactéries.

Il n'y a pas beaucoup d'études portant sur la lignine chez le Pommier. La teneur en lignine de fruits de la variété Golden Delicious est inversement corrélée avec la fréquence d'infection des blessures par *Penicillium expansum* (Valentines et al., 2005). La synthèse de lignine dans les fruits en conservation permettrait de diminuer significativement le nombre d'infections. Dans le cas de l'interaction avec *Ea*, il a été montré que le traitement de Pommier à l'acibenzolar-S-méthyl, analogue de l'acide salicylique, confère, en conditions contrôlées, une forte protection contre le pathogène et que cette protection est corrélée à l'induction des activités peroxydases (Brisset et al., 2000). En fonction de la disponibilité en monolignols, cette activité pourrait être impliquée dans la production de lignine. Il est donc raisonnable de penser que l'imprégnation pariétale par de la lignine puisse participer aux mécanismes de défense du Pommier dirigés contre *Ea*.

#### *1.1.1.c) Le système vasculaire*

Les plantes sont capables de mettre en œuvre plusieurs types de défenses au sein de leur système vasculaire, de manière à contrôler la progression des agents pathogènes susceptibles d'envahir ces tissus (Pearce, 1996). Outre le fait que le système vasculaire est protégé par plusieurs couches de cellules (parenchymes médullaires et corticaux, sous-épiderme, épiderme), des composés antibactériens (phytoalexines) peuvent être produits à l'intérieur des vaisseaux et des barrières peuvent se constituer. L'occlusion des vaisseaux a été rapportée à plusieurs reprises, par exemple dans l'interaction entre la plante parasite *Orobanche crenata* et *Vicia sativa*, où la résistance est associée à la production d'un mucilage riche en pectines dans les vaisseaux du xylème (Pérez-de-Luque et al., 2006). La formation de tyloses est un processus similaire d'occlusion vasculaire, impliquant le dépôt de substances pectiques dans les vaisseaux du xylème, par les cellules du parenchyme adjacent (Benhamou et Nicole, 1999). Les tyloses constituent une des premières défenses contre les pathogènes vasculaires. Elles ont été impliquées, entre autres, dans la résistance du manioc à *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Benhamou et Nicole, 1999) ainsi qu'au cours de l'interaction entre le champignon *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* et le platane (Clériver et al., 2000). Dans cette même interaction, les tyloses peuvent également être

enrichies en produits phénoliques, participant à l'occlusion et probablement antifongiques. Les cellules du parenchyme du xylème sont très importantes dans ces phénomènes, dans la mesure où elles subissent un important remaniement métabolique en réponse aux pathogènes vasculaires et sont souvent caractérisées par l'accumulation de lignine et/ou de callose (Pearce, 1996 ; Benhamou et Nicole, 1999). Une peroxydase est notamment induite dans les cellules du parenchyme du xylème dans le riz au cours de l'interaction avec le pathogène vasculaire *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et coïncide avec l'épaississement des parois du xylème, et ce de manière plus rapide en cas d'interaction incompatible (Hilaire et al., 2001). En conséquence, le diamètre de la lumière des vaisseaux se retrouve réduit, et cette obstruction empêche la progression de l'agent pathogène.

Comme décrit ci-dessous, des phénomènes d'occlusion vasculaire ont déjà été décrits chez le Pommier, au cours de l'infection par *Ea*. Cette occlusion est provoquée par le dépôt d'un matériel fibreux qui pourrait être en partie de l'exopolysaccharide bactérien, mais dont la nature précise reste à être déterminée (Suhayda et Goodman, 1981b).

### 1.1.2. Histologie et cytologie de l'interaction Pommier/*Ea*

L'interaction entre *Ea* et ses hôtes sensibles a déjà été abordée au niveau microscopique (plus particulièrement avec la variété sensible Jonathan) dans le but de déterminer les événements cellulaires et tissulaires associés à la maladie ainsi que sur d'autres géotypes sensibles pour localiser la bactérie. L'ensemble de ces travaux sont rapportés dans le Tableau I.1.

#### **1.1.2.a) Localisation de la bactérie dans les tissus infectés**

Les résultats de Dellagi et al. (1999), sur semis sensibles inoculés par blessure, ont permis de localiser la bactérie, par immunofluorescence et à l'aide d'un mutant exprimant une fusion *lacZ*, dans le mésophylle, à proximité des parois végétales, dans le parenchyme cortical de la nervure centrale ainsi que dans certains éléments déformés du xylème. Bien que ces données n'aient pas été généralisées à l'ensemble des hôtes sensibles d'*Ea*, le système vasculaire de la plante, et plus particulièrement le xylème, semble constituer un élément essentiel pour assurer la migration du pathogène vers les parties distales du point

d'infection (Huang et Goodman, 1976 ; Suhayda et Goodman, 1981 a et b ; Goodman et White, 1981 ; Bogs et al., 1998 ; Bogs et al., 2004). Lorsque la bactérie est retrouvée dans le limbe, il semble que ce soit préférentiellement dans le parenchyme lacuneux (Dellagi et al., 1999, Heyens et Valcke, 2004). En effet, en utilisant une bactérie virulente surexprimant la GFP, Heyens et Valcke (2004) ont remarqué que la fluorescence associée à la GFP n'est visible que par observation de la face abaxiale de la feuille, indiquant que la bactérie se trouve plutôt du côté de l'épiderme inférieur. *Erwinia amylovora* a donc été mise en évidence dans les tissus infectés et plus particulièrement le parenchyme lacuneux du limbe et dans les vaisseaux du xylème. De manière moins précise et par une approche de détection par PCR, Momol et al. (1998) ont également démontré que la bactérie peut parfois être détectée de manière systémique et asymptomatique dans ses hôtes.

#### *1.1.2.b) Analyse histologique des symptômes*

Une des observations majeures des travaux antérieurs est l'occlusion des vaisseaux du xylème par un matériel fibreux d'origine polysaccharidique, accompagnée d'une destructuration (plasmolyse et vésiculation) des cellules voisines (Tableau I.1.). Ces phénomènes ont été détectés dans le génotype sensible Jonathan. Toujours dans ce génotype, les dépôts de callose sont réprimés sous l'action de DspA/E car les mutants n'exprimant plus cet effecteur, qui sont par ailleurs non virulents (Gaudriault et al., 1997), induisent fortement ce type de défense (DebRoy et al., 2004). Par conséquent, la répression des dépôts de callose pourrait constituer un facteur de sensibilité chez l'hôte.

Bien qu'observé sur une plante non-hôte, DspA/E exprimé transitoirement dans le tabac provoque des perturbations cellulaires caractérisées par une lyse des cellules du mésophylle, une désorganisation des noyaux et un étirement des parois cellulaires (Boureau et al., 2006). De même, l'infiltration de HrpN dans des feuilles de tabac provoque la HR, et les évènements précoces liés à ce processus ont été décrits récemment. Ils impliquent notamment une migration des chloroplastes dans les cellules (vers le pôle basal pour les cellules du parenchyme palissadique et vers le pôle apical pour celles du parenchyme lacuneux) ainsi qu'un remaniement des thylakoïdes (Boccaro et al., 2007). Ces observations n'ont pour le moment pas été faites sur Pommier. Toutefois, la pulvérisation d'une solution contenant HrpN sur des pommes en conservation confère une résistance au pathogène fongique, *Penicillium expansum* responsable de pourritures. Cette résistance est corrélée à

l'accumulation de tannins dans les vacuoles des cellules du sous-épiderme du fruit (de Capdeville et al., 2008). Ces différents éléments seront étudiés au cours de l'analyse microscopique présentée ci-après sur le Pommier.

## **I.2. Résultats**

### **I.2.1. Symptomatologie et ultrastructure de l'interaction**

L'inoculation des deux génotypes a été réalisée par infiltration sous vide de la souche virulente CFBP1430, dans les mêmes conditions que celles décrites par Venisse et al. (2002) et Pontais et al. (2008), et celles utilisées pour l'étude transcriptionnelle présentée dans la partie II de ce chapitre. La cinétique de développement des symptômes obtenus de cette manière avec un inoculum de  $10^7$  cfu/mL d'*Ea* exprimant une fusion GFP est présentée dans la figure I.2. Les premières régions nécrotiques apparaissent après 24h et de manière très localisée sur le limbe d'Evereste. Ces nécroses sont sèches et présentent une coloration marron. Des taches très discrètes de couleur marron peuvent aussi être observées sur le limbe de MM106, leur intensité variant avec la densité de l'inoculum. Après 48h, les symptômes ont progressé sur la presque totalité de la feuille de MM106, à l'exception des nervures qui restent vertes (visible sur Fig.I.2.B). Sur les feuilles d'Evereste, les nécroses peuvent également s'étendre, mais elles restent généralement localisées sur le limbe, alors que sur le génotype sensible MM106 les nécroses vont s'étendre au pétiole, à la tige puis progresser sur l'ensemble de la plante (Fig.I.2). Les nécroses sur les deux génotypes ont un aspect différent. En effet, elles apparaissent plus sombres et plus sèches sur les feuilles du génotype sensible, ce qui pourrait être un signe d'une atteinte tissulaire différente entre les deux génotypes, perturbant aussi différemment l'équilibre hydrique. Il sera intéressant de suivre l'évolution de ce dernier, notamment par la mesure de la teneur en eau des feuilles infectées. La présence des nécroses dans les deux cas montre clairement que la bactérie entre en contact avec les cellules hôtes de manière localisée et qu'un dialogue moléculaire se met en place. Après 5 jours, les nécroses n'évoluent plus chez Evereste, tandis qu'elles se propagent chez MM106 pour atteindre les nervures et le pétiole et provoquer le symptôme caractéristique de recourbement en crosse de la tige. A ce stade, un évènement chez Evereste a vraisemblablement abouti au blocage de la progression de la bactérie, en provoquant son cloisonnement et/ou sa mort.

Afin de suivre la progression de la bactérie dans les tissus foliaires, une inoculation a été réalisée à l'aide d'une souche d'*Ea* exprimant une fusion GFP (Bogs et al., 2004), permettant de localiser le pathogène par microscopie à fluorescence. Des zones nécrosées sont visibles à la surface des feuilles des deux génotypes 48 h après infection (Fig.I.2.A et B). Ces nécroses sont caractérisées par l'absence de la fluorescence rouge caractéristique de la chlorophylle présente dans les chloroplastes, tandis que les zones encore saines fluorescent fortement. Chez Everest, la bactérie semble confinée dans les zones nécrosées avoisinant des zones saines. A l'inverse chez MM106, la fluorescence GFP est plus forte et se situe à la frontière entre le tissu sain et le tissu nécrosé. Cette observation suggère que la multiplication et la progression bactériennes sont plus soutenues dans le génotype sensible et que ces deux processus sont accompagnés d'une nécrose, illustrant parfaitement le concept de bactérie nécrogène. La bactérie tue dans un premier temps les cellules hôtes avec lesquelles elle rentre en contact mais ne reste pas localisée au niveau de la nécrose. Ces nécroses limitées au limbe 48h après infiltration (Fig.I.2.A et B) sont observables aussi bien chez Everest que chez MM106. Les phases précoces de l'interaction pourraient donc être similaires entre ces deux génotypes. Cependant, la bactérie réussit à progresser dans les tissus encore sains de l'hôte sensible en provoquant leur mort, expliquant ainsi la progression des symptômes foliaires. Chez Everest, il n'y a pas de progression et une observation à plus fort grossissement de la nécrose sur limbe des feuilles montre que la fluorescence GFP apparaît sous forme de taches localisées dans la zone nécrosée (Fig.I.3.C et G) qui pourraient peut-être correspondre au piégeage du pathogène. Les dénombrements bactériens iraient en ce sens (Fig.I.2.), plutôt que dans celui d'une activité antibactérienne car la population bactérienne augmente dans les deux génotypes, avec une amplitude et une cinétique similaires. En effet, ils ne montrent pas de différence entre les deux génotypes, ce qui paraît étonnant, étant donné le fort signal GFP chez MM106. Ceci pourrait être en partie dû à la zone de prélèvement qui consiste en des disques foliaires découpés à cheval sur la nervure et le limbe de feuilles infiltrées massivement par la bactérie. Quelque soit le génotype, ces zones meurent précocément et la bactérie reste capable de se multiplier pendant au moins 48 h, ce qui suggère que chez Everest il ne semble pas exister de pouvoir bactéricide constitutif et immédiat. En revanche, la bactérie étant incapable de progresser à partir de ces zones, il n'est pas impossible que les tissus environnants reçoivent un signal local ou systémique initié par la présence de la bactérie, créant en bordure des zones nécrosées un milieu défavorable à *Ea*. Concernant les dénombrements bactériens, des

différences plus marquées auraient probablement pu être trouvées en focalisant les prélèvements sur les frontières entre zone saine et zone nécrosée. De même, des dénombrements sur une durée plus longue et les étendre au pétiole et/ou à la tige pour montrer l'absence de progression chez Everest et au contraire l'avancée chez MM106 pourront être réalisés. Dans le cas présent, il est certain que l'infiltration apporte la bactérie de manière artificielle dans les tissus de l'hôte, ce qui peut être à l'origine de réponses tardives chez Everest. Dans tous les cas, la progression de la bactérie chez ce dernier s'arrête au plus tard au niveau de la zone d'abscission entre le pétiole et la tige.

L'utilisation de la fluorescence aux UV, qui permet de visualiser la présence de polyphénols et de lignine, révèle la présence de ces composés dans les cellules stomatiques sur la surface abaxiale (Fig.I.3.D.). Leur présence ne colocalise pas avec la présence des spots de fluorescence GFP. Le fait que la pénétration des bactéries par infiltration se fait en grande partie par les stomates suggère que la bactérie ne reste pas confinée aux chambres sous-stomatiques et migre probablement vers un tissu qui lui est plus favorable. Cette migration serait assurée plutôt par la croissance de la population bactérienne que par une mobilité directe, puisqu'il a été montré que la bactérie réprime l'expression de son flagelle au cours de l'infection (Cesbron et al., 2006). L'activation temporaire de ce système de mobilité, en alternance avec des phases d'inactivation, ne peut cependant pas être rejetée. La fluorescence UV est confinée aux stomates et aux trichomes, riches en lignine, et il n'y a pas de renforcement pariétal par imprégnation de lignine observable, même après 5 jours d'infection, bien que les bactéries apparaissent sous forme de taches très ponctuelles chez Everest (Fig.I.3.F et G). De manière remarquable, les nécroses, traduites par l'absence de fluorescence rouge, sont observables aussi bien sur la face adaxiale que sur la face abaxiale mais la fluorescence GFP ne l'est que sur la face abaxiale, tel que décrit par Heyens et Valcke (2004). Les bactéries sont donc vraisemblablement plutôt localisées du côté de l'épiderme inférieur de la feuille, ce qui est en accord avec les résultats de Dellagi et al. (1999) qui montrent une localisation de la bactérie dans le parenchyme lacuneux du limbe. Cette observation est aussi vérifiée chez MM106, chez qui la bactérie progresse vite (Fig.I.3.I et L). La présence de la GFP colocalise très bien avec la frontière entre les zones saines et les zones nécrosées (Fig.I.3.J et M). En effet, la bactérie n'est plus présente dans les zones nécrosées, ce qui indique sa progression vers les tissus sains. Il apparaît que les populations bactériennes sont très limitées par les nervures (Fig.I.3.M), suggérant que ce tissu peut être défavorable à la bactérie (présence de phytoalexines ou par son anatomie).

La localisation préférentielle de la bactérie du côté de la face abaxiale pourrait être associée au fait que le parenchyme palissadique est une importante source de FAO produites par l'activité photosynthétique. Bien qu'*Ea* possède une tolérance élevée à l' $H_2O_2$  (Venisse et al., 2003) assurée par la production de la desferrioxamine, une présence trop importante de FAO pourrait lui être préjudiciable. D'autre part, la production de ces FAO nécessite la mise en place de systèmes antioxydants dans les cellules du parenchyme palissadique (où l'intensité photosynthétique est la plus élevée), rôle potentiellement assuré par certains flavonoïdes, tels que la quercétine (Agati et al., 2007 ; Hernandez et al., 2008). Ces flavonoïdes, plutôt que les FAO, pourraient également avoir une activité antibactérienne directe contre *Ea* (Cushnie et Lamb, 2005). Ainsi, par la présence de flavonoïdes ou de FAO, le parenchyme palissadique pourrait constituer un milieu plus défavorable pour la multiplication bactérienne. Une autre hypothèse est également à envisager quant à l'anatomie même du tissu : la densité cellulaire du parenchyme palissadique, et par conséquent un espace intercellulaire réduit, n'autorise peut-être tout simplement pas la pénétration des bactéries dans ce tissu.

Les résultats présentés ci-dessus permettent de souligner plusieurs points : (i) les nécroses s'accompagnent d'une importante dégradation de la chlorophylle dans les cellules du mésophylle mais (ii) dans les deux génotypes, le pathogène est plutôt localisé sur la face abaxiale de la feuille, dans le parenchyme lacuneux; (iii) la progression de la bactérie est stoppée chez Everest, mais le pathogène semble se maintenir dans les zones récemment nécrosées alors que (iv) aucune imprégnation pariétale de lignine n'est observable à faible grossissement (X100) et (v) la dynamique de population bactérienne est peu différente entre les deux génotypes. Afin de compléter ces premières données, une étude histologique a été conduite sur des feuilles infectées par infiltration pour préciser les tissus préférentiellement attaqués par le pathogène et identifier d'éventuelles barrières physiques chez Everest, qu'elles soient constitutives ou induites.

### I.2.2. Etude microscopique de l'interaction avec MM106 et Everest

Des coupes transversales ont été réalisées 48 h après infiltration d'eau ou d'*Ea* dans le limbe, les nervures et le pétiole des feuilles des deux génotypes. La coloration au bleu de Toluidine a été utilisée pour marquer les polyphénols et la lignine en vert, et les parois de

chaque cellule ainsi que les autres polysaccharides en bleu (Ramalingam et Ravindranath, 1970).

- **Limbe et nervures** (Fig.I.4. et I.5.) : une comparaison des nervures de feuilles saines de même âge ne montre aucune différence structurale majeure entre les deux génotypes (Fig.I.4. A, B, E et F). Pour les deux génotypes, le parenchyme palissadique est composé de deux couches de cellules alignées sous l'épiderme supérieur en-dessous duquel se trouve le parenchyme lacuneux. Une numération des cellules de ce dernier montre que la densité est équivalente dans les deux génotypes, même si celle-ci varie en fonction de la physiologie de la feuille (environ 200 cellules/mm<sup>2</sup> dans les tissus jeunes et 400 dans les tissus plus âgés), et les parois de chaque cellule semblent être de même épaisseur. Concernant l'anatomie de la stèle, elle est également similaire entre les deux génotypes.

Quarante-huit heures après infection, la bactérie n'est pas détectée dans les nervures. Cependant, un certain nombre de modifications sont observées : (i) le parenchyme lacuneux est particulièrement perturbé dans le limbe des feuilles de MM106 car de larges cavités sont observées, résultant probablement des perturbations liées à l'infection (IPL, Fig.I.4.G), telles que la peroxydation des lipides (Venisse et al., 2002) conduisant à une lyse cellulaire, (ii) les vaisseaux du xylème et du phloème d'Evereste se remplissent d'un élément coloré en rose sur les coupes (Fig.I.4.D), tandis que ceux de MM106 n'accumulent pas ce produit (Fig.I.4.H). Ce produit coloré ne fluoresce pas aux UV et pourrait correspondre au matériel fibreux déjà décrit sur plante sensible (Suhayda et Goodman, 1981b). Ces derniers proposent que l'EPS pourrait être à l'origine de la formation de bouchons dans le xylème, empêchant l'alimentation en eau de la feuille. Cette observation d'obstruction du xylème a été rapportée à plusieurs reprises, mais comme une réaction de défense dans d'autres interactions plante-pathogène. L'occlusion serait plutôt due dans ces cas à des substances polysaccharidiques d'origine végétale (Lorrain et al., 2004 ; Clérvet et al., 2000). L'occlusion du xylème chez Evereste constituerait une réponse propre à ce génotype, dont l'intensité et la rapidité de mise en place pourraient participer à l'isolement d'*Ea* au site d'infection, par blocage d'une des voies de migration, selon les études citées dans le Tableau I.1., ou bien en appauvrissant le tissu infecté en eau, ce qui serait défavorable au développement du

pathogène. D'autres changements histologiques sont également observés chez Evereste, telle qu'une importante lignification de la paroi des cellules du péri-cycle dans la nervure principale à proximité du pétiole (Fig.I.5.E et F). Le renforcement des cellules du péri-cycle existe de manière constitutive à la base de la nervure (près du pétiole) et dans les tissus plus âgés. Toutefois, le renforcement chez Evereste, induit par la bactérie, a été constamment retrouvé. De plus, le cytoplasme de certaines cellules du parenchyme cortical de ce génotype fluoresce en jaune (Fig.I.5.). Ces cellules apparaissent également plus marquées par le bleu de toluidine et pourraient être le siège d'une accumulation de produits phénoliques, telle que celle décrite par Dai et al. (1996) dans le cadre de l'interaction coton-*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Ces cellules particulières sont également visibles sur des coupes longitudinales de nervures (Fig.I.5.G). Le précipité vacuolaire est très visible dans certaines cellules et ressemble à celui observé par de Capdeville et al. (2008) dans des coupes transversales de fruits traités par HrpN.

- **Pétiole et tige** (Fig.I.6.-I.7.-I.8.): constitutivement, l'anatomie des pétioles des deux génotypes est très similaire. Dans les deux cas, le sous-épiderme est constitué de deux assises cellulaires aux parois épaisses constituant un collenchyme qui enveloppe l'ensemble du parenchyme cortical du pétiole. Sous ce dernier, il semblerait qu'une couche de cellules possédant de nombreux chloroplastes existe chez Evereste mais pas chez MM106. Toutefois, ceci pourrait être dû à un stade ontologique légèrement différent entre les deux tissus étudiés (la lignification est plus importante dans les tissus plus matures) bien que des étages foliaires similaires aient été systématiquement comparés. La structure du cylindre central est peu discriminante entre les deux génotypes, mais il semblerait que les cellules du péri-cycle d'Evereste soient également plus chargées en polyphénols (Fig.I.7.B). Quarante-huit heures après infection, cette couche de cellules s'enrichit probablement en polyphénols se traduisant par la forte coloration bleue/violette des coupes (flèches Fig.I.6.C et D). Il semble que ce soit également le cas dans certaines cellules du phloème de pétioles d'Evereste (flèches Fig.1.7.C). Des perturbations tissulaires telles que celles observées sur les sections de limbe sont retrouvées ici aussi pour MM106 : en effet, le parenchyme cortical situé au voisinage de l'épiderme apparaît plus désorganisé avec la présence de lacunes importantes (Fig.I.6.H et

I.7.H). Les analyses utilisant une souche d'*Ea* exprimant une fusion GFP montrent, chez MM106, que la bactérie se multiplie activement dans la tige 5 jours après infiltration des feuilles supérieures, la bactérie progresse donc très vite depuis le point d'infection (Fig.I.8.). Le pathogène est retrouvé en grande partie dans le parenchyme cortical de la tige et y provoque d'importants dommages cellulaires (Fig.I.8.H). Ce dernier constitue sans doute le type de tissu préférentiel pour la bactérie, car elle attaque aussi celui des nervures (cf. ci-dessus). Les populations bactériennes colocalisent parfois avec certaines cellules du parenchyme accompagnant le phloème mais plus souvent dans les vaisseaux du xylème (Fig.I.8.D, F et G). Huang et Goodman (1976) rapportent la présence de la bactérie majoritairement dans les vaisseaux du xylème, dès 1 jour après inoculation directe du pétiole. Ces auteurs ont observé des phénomènes de plasmolyse dans les cellules du parenchyme ainsi que des cavités lysogéniques. La plasmolyse a également été observée dans les cellules voisines des vaisseaux du xylème (Goodman et White, 1981), bien que la méthode d'inoculation utilisée par cette étude fût la coupure avec un inoculum faible ( $5 \times 10^4$  cfu/mL). Ces mêmes travaux suggèrent la possibilité pour la bactérie de coloniser l'ensemble de la plante à partir du xylème. Dans la tige infectée de MM106 se produit une accumulation de polyphénols (coloration jaune Fig.I.8.D) mais également un renforcement important des parois lignifiées du xylème qui fluorescent bien plus que celles du témoin (Fig.I.8.F). Ce renforcement s'observe également dans les cellules du sclérenchyme localisé dans le péricycle et est similaire à celui observé dans les nervures d'Evereste (Fig.I.5.F). La bactérie-GFP n'a été observée qu'occasionnellement dans les pétioles et les tiges d'Evereste, chez qui les symptômes sont très généralement limités au limbe. Une éventuelle progression asymptomatique de la bactérie ne peut toutefois pas être totalement écartée car c'est un processus qui a déjà été décrit (Momol et al., 1998), d'autant plus qu'*Ea* semble survivre temporairement, et notamment dans certains vaisseaux du xylème, chez Evereste (Fig.I.2.).

### **I.3. Récapitulatif et interprétation**

La figure I.9. reprend les différents résultats décrits précédemment. La sensibilité de MM106 se manifeste notamment par des phénomènes de lyse du parenchyme lacuneux des feuilles ainsi que de certaines cellules du parenchyme cortical des pétioles et tiges. La bactérie est détectée dans les cellules adjacentes au phloème ainsi que dans les vaisseaux du xylème, ce qui pourrait lui servir pour assurer sa propagation. D'importants renforcements pariétaux, des imprégnations de lignine dans les parois des cellules du xylème ainsi que celles du sclérenchyme soutenant la stèle, sont observés dans les deux génotypes, mais de manière plus marquée chez Everest, en cohérence avec la mise en place de systèmes de défense par la plante. Ce renforcement devra être plus amplement décrit pour déterminer s'il peut constituer un des éléments de la résistance d'Everest, par exemple par des dosages de teneur en lignine. De même, la présence de callose, dont l'induction des dépôts est réprimée par DspA/E chez un Pommier sensible (DebRoy et al., 2004), reste encore à être recherchée chez Everest pour évaluer son éventuelle implication dans le confinement de la bactérie. Un renforcement pariétal des cellules du parenchyme cortical des nervures de feuilles de la variété McIntosh a été observé après traitement au prohexadione-calcium, qui a un effet positif sur la résistance à *Ea* (McGrath et al., 2009) ; ce traitement n'est pas corrélé à une diminution de la population bactérienne, il se peut donc que le mécanisme de résistance induite soit en partie lié à ces phénomènes d'épaississement. Cette observation pourrait constituer une bonne hypothèse pour expliquer la résistance d'Everest, bien que le renforcement pariétal soit peu différentiel entre les deux génotypes. En effet, le fait que les populations bactériennes se développent localement dans les deux génotypes avec une cinétique et une amplitude similaires suggère que l'origine de la résistance d'Everest réside dans sa capacité à bloquer, physiquement ou chimiquement, la progression de la bactérie vers de nouveaux tissus. En dehors de ce renforcement précis dans les cellules du sclérenchyme de la nervure, l'infection par *Erwinia amylovora* ne semble pas provoquer de modifications de la paroi végétale, de type papilles, chez aucun des deux génotypes. Etant donné que la bactérie semble migrer du limbe vers la nervure dans le génotype sensible et seulement très occasionnellement dans le résistant, un tel renforcement aurait pu être attendu dans les cellules du mésophylle ou bien à la jonction limbe/nervure. Dans l'interaction incompatible *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*/laitue (Bestwick et al., 1995), un mutant du T3SS et une souche sauvage provoquent les mêmes événements précoces sur la paroi cellulaire, à savoir la formation d'une papille accompagnée de l'accumulation de callose et de composés lignifiés. Cependant, seule la souche sauvage est

reconnue et provoque l'induction d'autres défenses (phytoalexines) et en particulier l'expression de la réponse d'hypersensibilité, caractérisée par une forte plasmolyse. Ces résultats illustrent très bien le concept de PAMP-Triggered Immunity (PTI), induite par le mutant, et d'Effector-Triggered Immunity (ETI), induite par la souche sauvage. Ces deux concepts seront rediscutés dans la partie suivante. Ceci implique que d'autres défenses participant à la résistance contre *Ea* pourraient n'être induites que chez Everest.

De larges cavités lysogéniques ont été observées chez MM106 mais pas chez Everest, ou en tout cas de manière beaucoup plus discrète chez ce dernier. Le processus d'infiltration implique une pénétration de la bactérie dans les tissus par les stomates. Le pathogène est donc confronté en premier lieu aux cellules du parenchyme lacuneux. Ce tissu semble être la cible principale d'*Ea* chez le génotype sensible MM106, puisque les phénomènes de lyse sont majoritairement situés à cet endroit (Fig.I.4.G). Le parenchyme palissadique au contraire ne semble pas affecté par la présence de la bactérie, probablement car ce tissu est une source majeure de FAO ainsi que de flavonoïdes (Hernandez et al., 2008). Ces derniers font partie du système antioxydant des plantes pour lutter contre la production de FAO liée à l'activité photosynthétique et certains d'entre eux sont localisés dans les chloroplastes (Agati et al., 2007). En plus de cette activité antioxydante, certains produits phénoliques présentent également une activité antimicrobienne (Cushnie et Lamb, 2005). Par conséquent, que ce soit par la présence excessive de FAO ou de flavonoïdes antibactériens, le parenchyme palissadique est un environnement peu favorable pour la bactérie. Etant donné que le parenchyme lacuneux d'Everest semble plus résistant à la bactérie, il se pourrait que, chez ce génotype résistant, ce tissu soit plus apte à produire des FAO ou bien contienne plus de flavonoïdes potentiellement antibactériens, conférant une résistance similaire à celle du parenchyme palissadique. Il est envisageable aussi qu'il puisse y avoir mobilisation de défenses présentes dans ce dernier, vers les espaces du parenchyme lacuneux, *via* la production de vésicules riches en métabolites secondaires et protéines de défenses. Selon cette dernière hypothèse, les métabolites secondaires d'Everest seraient plus efficaces contre *Ea* que ceux de MM106, ou bien les deux génotypes possèdent les mêmes défenses mais ne les mobilisent pas aussi efficacement. La présence d'antioxydants dans le parenchyme lacuneux pourrait de plus limiter la mort cellulaire provoquée par la bactérie, chez le génotype résistant. Effectivement, Venisse et al. (2002) ont montré que l'induction du choc oxydant se produit localement dans les tissus infiltrés par *Ea*, aussi bien dans le génotype résistant que dans le

génotype sensible et ces auteurs proposent que la production de FAO serve à la bactérie pour provoquer la lyse des cellules hôtes. La mise en place de systèmes antioxydants efficaces (en plus de ceux relatifs au glutathion ou l'acide ascorbique, car ceux-ci semblent non différentiels entre les deux génotypes) pourraient limiter ce processus et donc empêcher la bactérie de progresser. Dans le cadre d'une étude sur des tabacs déficients pour une catalase, Dat et al. (2003) ont montré qu'une forte illumination, et donc une forte activité photosynthétique et production de FAO ( $H_2O_2$ ), provoque chez ces plantes transgéniques une importante lyse des cellules du parenchyme palissadique. Il est envisageable que l'induction du choc oxydant chez MM106 provoque le même effet mais sur les cellules du parenchyme lacuneux, avec l'hypothèse que ces cellules sont incapables de mettre en place un système détoxiquant efficace. A l'inverse, chez Everest, un potentiel antioxydant plus fort pourrait assurer le contrôle de ce choc oxydant. Le fait que la bactérie n'attaque pas le parenchyme palissadique impliquerait justement la présence de composés antimicrobiens et/ou antioxydants dans ce tissu qui est, en dehors de l'épiderme, le plus en contact avec le rayonnement lumineux et où l'activité photosynthétique est la plus forte. Les travaux d'Agati et al. (2007) démontrent que les flavonoïdes de la feuille de *Phillyrea latifolia* sont essentiellement présents dans l'épiderme supérieur et le parenchyme palissadique des feuilles ; il est fort probable que ce soit le cas également chez le Pommier, renforçant l'hypothèse formulée ci-dessus. Ce point sera d'ailleurs abordé dans le chapitre par l'étude d'une sous-famille de flavonoïdes, les dihydrochalcones. Toutefois, il ne peut être exclu que la forte densité cellulaire du parenchyme palissadique constitue également une barrière à la progression de la bactérie dans ce tissu.

La seule observation bien différentielle entre les deux génotypes faite dans cette étude est l'occlusion des vaisseaux, et elle conforte l'hypothèse de l'existence d'une barrière physico-chimique chez Everest. En effet, cette occlusion pourrait avoir un double effet sur le pathogène (Fig.I.9) :

- d'une part, elle pourrait constituer un obstacle direct à la progression des bactéries par le xylème, qui semble être la principale voie de propagation chez les génotypes sensibles, dont MM106 (Fig.I.8.G). Bien que la coupe présentée sur la figure I.4.D montre que de nombreux vaisseaux contiennent du matériel occlusif (plus d'un sur trois), il se pourrait que ce type de réponse puisse s'exprimer de manière très localisée en cas d'infection naturelle par exemple, durant laquelle seule une partie des tissus de la feuille est en contact avec le pathogène. Le rôle de l'occlusion

vasculaire dans la résistance aux bactéries phytopathogènes n'a pas été beaucoup décrite dans la littérature. Les tyloses, qui sont des épaisissements de la paroi cellulaire des vaisseaux du xylème et aboutissent à leur occlusion, sont notamment impliqués dans la résistance du manioc à *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Benhamou et Nicole, 1999). Des résultats récents suggèrent que l'occlusion du xylème constitue une réponse de l'hôte dans le cadre de l'interaction *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*/olivier pour tenter de bloquer la progression du pathogène (Marchi et al., 2009). Dans ce pathosystème, la bactérie peut envahir la plante entière par les vaisseaux du xylème, lorsque les bouchons, de nature polysaccharidique et/ou phénolique, sont produits trop tardivement. Les données disponibles dans la littérature autorisent à penser que la progression d'*Ec* dans la plante peut se faire de manière similaire, c'est-à-dire par leur passage dans les vaisseaux du xylème, dans les géotypes sensibles de Pommier. Puisque les occlusions vasculaires n'ont été observées précocement que chez Evereste, il est raisonnable de penser qu'un des mécanismes de résistance de ce géotype puisse être associé à une capacité plus importante à bloquer le pathogène près du point d'infection, ou tout du moins dans les vaisseaux du xylème pour limiter sa progression. Ceci expliquerait d'ailleurs pourquoi la bactérie est détectée occasionnellement et de manière très localisée dans les vaisseaux du xylème d'Evereste (Fig.I.9). Dans l'état actuel de la littérature et des résultats présentés ici, il est impossible de conclure sur l'importance de la colonisation des vaisseaux du xylème : soit la bactérie pénètre « accidentellement » dans le xylème et se retrouve piégée, et dans ce cas sa propagation se ferait essentiellement dans les parenchymes lacuneux accompagnant les vaisseaux, soit la colonisation active du xylème est indispensable pour la bactérie pour assurer sa propagation à l'ensemble de la plante.

- D'autre part, l'occlusion vasculaire pourrait exercer un autre effet sur les feuilles infectées. L'alimentation en eau est indispensable à la multiplication du pathogène. Par conséquent, une diminution du statut hydrique de la feuille causée par un arrêt de l'approvisionnement en eau de la feuille par l'occlusion des vaisseaux du xylème permettrait de freiner la croissance du pathogène. Une étude très récente (Freeman et Beattie, 2009) a mis en évidence que la résistance d'*Arabidopsis* à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* s'accompagne très rapidement de la fermeture des stomates

ainsi que d'une diminution de l'activité photosynthétique et d'une diminution de la disponibilité en eau. L'arrêt du flux vasculaire xylémien dans les zones infectées est observé en parallèle de ces processus. Cet arrêt se produit dès 3 h après infiltration de l'agent pathogène, l'occlusion vasculaire n'est donc pas à l'origine de ce processus puisque sa mise en place nécessite quelques jours. La fermeture des stomates et des altérations du statut osmotique par arrêt du chargement du phloème sont beaucoup plus rapides et pourraient expliquer la diminution du flux vasculaire xylémien (Freeman et Beattie, 2009). De la même manière, les résultats d'Oh et Collmer (2005) indiquent que la diminution du flux vasculaire est associée aux défenses basales et peut être réprimée par l'action d'effecteurs de type III de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* en interaction compatible avec le tabac. Cependant, l'intensité de réduction du flux semble plus faible dans le cas d'une induction basale que lors de l'induction de l'HR. Dans le cas de l'interaction *Ea*-Evereste, il est possible qu'une partie de la résistance puisse être expliquée par une diminution de l'approvisionnement en eau des tissus infectés. Un modèle basé sur le potentiel osmotique des tissus a d'ailleurs été construit pour tenter de comprendre le mécanisme de sensibilité du Pommier (Suleman et Steiner, 1994). Ce modèle prédit que lorsque les tissus ont un potentiel osmotique négatif supérieur à celui créé par la bactérie via son EPS, alors l'approvisionnement de l'apoplaste en eau est rendu possible, permettant à la bactérie de se multiplier efficacement, tandis que c'est l'inverse lorsque les tissus végétaux ont un potentiel osmotique négatif inférieur. Le potentiel osmotique est corrélé avec la teneur des tissus en sorbitol, le sucre de transport majoritaire chez le Pommier (Suleman et Steiner, 1994). Des tissus jeunes, plus sensibles à la bactérie, contiennent moins de sorbitol et ont donc un potentiel osmotique faiblement négatif. Cette étude montre bien l'importance de l'approvisionnement en eau pour assurer le développement de la bactérie. Dans le cas d'Evereste, la résistance pourrait donc en partie résider dans une capacité à restreindre les apports d'eau. L'occlusion des vaisseaux du xylème n'a été observée que chez le génotype résistant 48 h après infiltration. Si cette occlusion a un effet sur la circulation des flux dans la feuille, il s'agit d'une réponse tardive et il serait alors intéressant de déterminer si d'autres réponses plus précoces (ouverture des stomates, altération du chargement du phloème,...) permettent de restreindre l'alimentation en eau des tissus infectés. Toutefois, les travaux antérieurs (Suhayda et Goodman, 1981b) ont montré que

l'occlusion vasculaire se produit également dans les géotypes sensibles de Pommier, en réponse à l'infection par *Ea*, et ce dès 24 h. Dans ce cas, l'occlusion est constituée d'un matériel fibreux plus ou moins dense contenant vraisemblablement des bactéries et de l'exopolysaccharide bactérien. Le fait que cette occlusion soit observée si vite pourrait être dû à la technique d'inoculation utilisée par ces auteurs, qui consistait à injecter directement dans la tige une suspension d'*Ea*, ce qui pourrait faciliter l'accès de la bactérie aux vaisseaux. Etant donné que les résultats présentés ici n'ont pas permis de mettre en évidence d'occlusions précoces chez MM106, ce phénomène peut être considéré comme une réaction de résistance potentielle. D'une façon générale, d'autres approches sont nécessaires pour estimer l'impact de l'occlusion : niveau de transpiration, flux vasculaires et teneur en eau des tissus infectés. Un projet ambitieux pourrait être prochainement mis en place avec l'équipe BNVI CNRS/INSERM de la Faculté de Médecine d'Angers, avec laquelle une collaboration a déjà été concluante (cf. Chapitre II). En effet, cette équipe possède un matériel permettant de voir les flux sanguins dans les artères capillaires de rat, grâce à un Laser Doppler. La possibilité de transférer cette technique de capillaroscopie dynamique au végétal sera testée pour déterminer si les flux d'eau peuvent être suivis *in planta*, de manière non invasive, ce qui permettrait un suivi continu. Ce suivi pourrait être de plus complété par la mesure de la conductance stomatale et de l'activité photosynthétique par un système Li-COR (Freeman et Beattie, 2009).

Cette étude met donc en lumière l'existence d'une barrière physico-chimique probable chez Evereste, qui pourrait être efficace contre *Ea* (présence de polyphénols, occlusion vasculaire). A ce stade toutefois, une analyse plus fine sur l'induction spatio-temporelle des modifications dans les deux géotypes est nécessaire. En effet, bien que puissent exister les mêmes défenses dans ces deux géotypes, leurs expressions suivent probablement des cinétiques, des localisations et des intensités différentes. Cette analyse nécessite dans un premier temps de savoir quelles sont les défenses qui sont exprimées au cours de l'interaction avec *Ea*. C'est pourquoi une étude transcriptionnelle sur plusieurs gènes candidats a été réalisée, dont les résultats sont présentés dans la partie suivante.

## **II. Caractérisation moléculaire de l'interaction**

Les données de microscopie présentées précédemment illustrent l'absence de progression d'*Ea* après son infiltration dans le génotype résistant Everest. Cependant, les différences histologiques entre Everest et MM106 au cours de l'infection ne sont pas aussi contrastées que le phénotype macroscopique. Si visuellement la bactérie apparaît confinée dans un cas ou au contraire se propage fortement dans l'autre et qu'au niveau tissulaire il n'y a pas vraiment de réponses différentielles, c'est probablement une combinaison de facteurs qui gouvernent le devenir de l'interaction. Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, 3 QTL majeurs de résistance au feu bactérien ont été détectés chez le Pommier à ce jour, un chez Fiesta (sur le groupe de liaison 7, Calenge et al., 2005), un chez Robusta (groupe de liaison 3, Peil et al., 2007) et un chez Everest (groupe de liaison 12, Durel et al., 2009). Bien que le mécanisme fonctionnel lié à ces QTL soit encore inconnu, la résistance d'Everest pourrait, ainsi que celle des deux autres génotypes, résider dans une activation de certaines défenses (métabolisme secondaire, PR-protéines, renforcement pariétal...) plus rapide et plus précoce que dans le génotype sensible MM106. Ceci pourrait être possible si les génotypes résistants reconnaissent plus efficacement la bactérie (présence de récepteurs) que les génotypes sensibles. A l'inverse, la sensibilité de MM106 pourrait être liée également à une manipulation plus importante de la bactérie sur le métabolisme de son hôte (induction du métabolisme des sucres, de leur transport,...). Des données préliminaires sur l'expression de quelques gènes de défense dans des feuilles de Pommier infectées par la bactérie ont déjà été obtenues par RT-PCR semi-quantitative (Venisse et al., 2002 ; Bonasera et al., 2006b). Par exemple, les PR-protéines PR-1a, PR-2, PR-3, PR-5 et PR-8 ont été trouvées induites dans des tissus infectés par *Ea*. Cependant cette induction a été observée avec une intensité similaire dans des génotypes sensibles (MM106 et Gala) et résistant (Everest), et par conséquent ces défenses ne semblent pas préjudiciables pour la bactérie. Le seul marqueur potentiel de résistance/sensibilité repéré à ce jour est la répression de la biosynthèse des phénylpropanoïdes dans le génotype sensible MM106 alors que cette voie est plutôt activée chez le résistant Everest (Venisse et al., 2002). L'approche présentée ici est ciblée sur l'analyse des principales voies de signalisation des défenses, et des défenses associées, connues à ce jour chez les plantes, ainsi que sur divers gènes du métabolisme pouvant jouer un rôle dans l'interaction (Tableau I.1., Fig.I.15. ; Veronese et al., 2003). L'objectif principal est de détecter d'autres marqueurs moléculaires différenciant les deux types d'interactions, compatible et incompatible. L'intérêt d'étudier les différentes voies de signalisation permettra de plus (i) de déterminer la nature de la

reconnaissance d'*Ea* (par exemple comme un biotrophe ou comme un nécrotrophe, en fonction des voies de signalisation préférentiellement induites/réprimées) et (ii) de déterminer la manière dont sont régulées les défenses chez le Pommier et d'évaluer si le schéma des espèces modèles (tomate, *Arabidopsis*) est transposable au Pommier.

## **II.1. Etude bibliographique**

L'approche utilisée pour cette étude est basée sur la sélection d'un certain nombre de gènes candidats (présentés dans le Tableau 1.2.), connus pour être impliqués dans d'autres pathosystèmes et donc susceptibles de jouer un rôle dans l'interaction *Ea*-Pommier. Cette étude bibliographique vise à présenter ces différents gènes et à expliquer leur choix. La reconnaissance de la bactérie par la plante peut modifier l'expression de ses défenses, c'est pourquoi les différents processus de perception des pathogènes par les plantes seront abordés dans cette étude bibliographique.

### **II.1.1. La perception des agents pathogènes**

L'activation de défenses adaptées, en réponse à un agent pathogène particulier, passe nécessairement par un système de reconnaissance approprié. La perception d'un pathogène peut se faire essentiellement à trois niveaux : par la reconnaissance (i) de ses MAMPs (Zipfel, 2009), (ii) de ses effecteurs protéiques (Lukasik et Takken, 2009) et (iii) de débris cellulaires d'origine végétale formés suite à l'attaque du pathogène, également appelés DAMPs (Heil et al., 2009). Pour Jones et Dangl (2006), tandis que la reconnaissance des MAMPs définit la PTI, l'ETI est provoquée par la perception des effecteurs du pathogène ou bien par des molécules de la plante ayant subi une transformation liée à l'action de ces effecteurs. Ces deux concepts de PTI et ETI définissent la capacité de la plante à détecter la présence d'un pathogène, et surtout à mobiliser ses défenses en conséquence, quelle que soit leur nature. La différence entre un MAMP et un effecteur majeur du pouvoir pathogène tel qu'un produit de gène d'virulence est que le premier est un élément indispensable à l'intégrité du microorganisme et ne peut être supprimé sans altérer fortement sa viabilité (Bent et Mackey, 2007). C'est le cas par exemple de l'ergosterol présent dans les membranes

des champignons ou encore du facteur d'élongation bactérien EF-Tu (Boller et Felix, 2009). Chaque MAMP semble être reconnu par un récepteur spécifique de type PRR (Pattern Recognition Receptor) qui se dimérise après fixation et provoque l'activation d'une cascade d'évènements intracellulaires : c'est le cas du peptide flg22 de certaines flagellines bactériennes, reconnu par le récepteur FLS2 (Altenbach et Robatzek, 2007). La plupart de ces récepteurs sont susceptibles d'être internalisés par endocytose après fixation du ligand pour assurer leur fonction de signalisation (Geldner et Robatzek, 2008). La suppression d'un effecteur, en revanche, n'est pas létale pour le pathogène, bien qu'elle puisse altérer sa « fitness », vis-à-vis d'autres souches de la même espèce ou d'autres pathogènes. Les effecteurs Avr sont reconnus, par interaction physique directe ou par la reconnaissance indirecte d'une cible modifiée par leur action, par des récepteurs de type NB-LRR (Nucleotide-Binding Site/Leucine-Rich Repeat, Bent et Mackey, 2007). Les DAMPs sont des substances d'origine végétale, telles que les oligomères de pectine et les monomères de cutine, et sont produites sous l'action d'un stress abiotique ou biotique (voir partie I. à ce sujet) (Heil, 2009). Leur reconnaissance se fait également de manière spécifique par des récepteurs probablement de type PRR mais qui ne sont pas tous identifiés (Zipfel, 2009). Des récepteurs fixant spécifiquement des endopeptides et des oligogalacturonates sont en cours de caractérisation. La perception des MAMPs et des effecteurs est plus généralement caractérisée par l'activation en aval de défenses SA-dépendantes, tandis que la détection de DAMPs est plutôt associée à l'activation de défenses JA-dépendantes.

Chez le Pommier, plusieurs interactions R-Avr ont été décrites avec *Venturia inaequalis*, pathogène hémibiotrophe responsable de la tavelure (Xu et Korban, 2002 ; Bus et al., 2005 ; Malnoy et al., 2008). Bien qu'*Ea* possède plusieurs effecteurs homologues de gènes d'avirulence, il n'y a pas d'interaction R-Avr décrite à ce jour. Toutefois, il a été montré qu'HrpN peut interagir avec une protéine membranaire appelée HIPM (HrpN-interacting protein from *Malus*) et promouvoir la croissance lorsque l'interaction HrpN-HIPM est transférée dans *Arabidopsis* (Oh et Beer, 2007). De même, quatre receptor-like Ser/Thr kinases (RLK) possédant des domaines LRR, ont été identifiés chez *Malus* comme des récepteurs potentiels de DspA/E. Ils sont chacun capables d'interagir avec DspA/E *in vitro* (Meng et al., 2006). Ces récepteurs ont été nommés DIPM (DspA/E-interacting protein from *Malus*). Exprimés de manière constitutive et aussi bien au sein de génotypes résistants à *Ea* que sensibles, les DIPM ne semblent pas être impliqués dans l'activation de défenses, en réponse à la reconnaissance de DspA/E. Une étude réalisée sur *Malus baccata* montre que

l'expression d'un gène de résistance, *MbR4*, de type TIR-NB-LRR dans *Arabidopsis* provoque l'accumulation de PR-3 et PR-5 ainsi qu'une résistance accrue à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Lee et Lee, 2005). Toutefois, aucun lien n'a été fait entre la présence de ce gène et la résistance de *Malus baccata* au feu bactérien.

Hormis l'interaction entre DspA/E et les DIPMs qui pourrait assurer la reconnaissance d'*Ea* par le Pommier, il n'y a pas de données disponibles sur la manière dont ce pathogène est perçu par ses hôtes. Puisque des résultats montrent qu'*Ea* semble réprimer l'expression de ses MAMPs, et plus particulièrement la flagelline en conditions inductrices du T3SS (Cesbron et al., 2006), sa perception par la plante pourrait se faire plutôt au niveau de ses effecteurs. Les premiers résultats du séquençage du QTL de résistance d'Evereste ont révélé la présence de récepteurs type NB-LRR. Des études sont actuellement en cours pour déterminer leur expression *in planta*, constitutive et au cours de l'interaction et évaluer leur niveau d'implication dans la résistance à *Ea*.

### II.1.2. Les voies de défenses

La plupart des données accumulées à ce jour sur les interactions plante-pathogène s'accordent sur la prédominance de trois hormones, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET), dans le contrôle des défenses des plantes. Celles-ci agissent indépendamment, en synergie, ou de manière antagoniste (Pieterse et al., 2009). Une étude transcriptomique sur le sorghum en réponse à l'acide salicylique, l'acide jasmonique et un précurseur de l'éthylène illustre bien que chacune des hormones régule des gènes qui lui sont propres mais que beaucoup de gènes (environ 10%, dont des PR-protéines type PR-5 et PR-10, ainsi que des facteurs de transcription type EREBP dépendants de l'éthylène) sont également régulés de manière commune (Salzman et al., 2005), l'éthylène étant l'hormone régulant le moins de gènes de défenses. Cette étude illustre très bien également la complexité des régulations des fonctions physiologiques, puisque plusieurs gènes impliqués dans un même processus peuvent répondre de manière différente à ces hormones. C'est notamment le cas de leurs enzymes de biosynthèse. A ces modulations propres à chacune des hormones s'ajoute ensuite un réseau d'interactions qui régule l'expression des défenses. Effectivement, il devient de plus en plus clair que les autres hormones (auxine, acide abscissique et gibbérellines) ainsi que la lumière interagissent avec

ces voies de manière subtile pour optimiser la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques auxquels elles sont confrontées (Fig.I.10.A ; Grant et Jones, 2009 ; Griebel et Zeier, 2008). Ce réseau d'interaction fait intervenir les protéines DELLAs et le chloroplaste comme carrefours principaux.

Pour mieux comprendre le fonctionnement moléculaire de l'interaction Pommier-*Ea*, plusieurs marqueurs des voies de l'acide salicylique, de l'éthylène et de l'acide jasmonique ont été choisis au sein de la banque d'EST *Malus* du NCBI et leur expression a été étudiée lors de l'interaction. L'objectif de cette étude était de pouvoir décrire le comportement de ces trois voies de signalisation en réponse à l'infection par *Ea*. Les paragraphes suivants décrivent le fonctionnement de ces trois voies, ainsi que les gènes étudiés au cours de l'interaction Pommier-*Ea*.

#### *II.1.2.a) L'acide salicylique*

L'accumulation locale et systémique d'acide salicylique a été corrélée depuis longtemps à une activation de PR-protéines (notamment la PR-1) ainsi qu'à la résistance à un certain nombre de pathogènes (par exemple le virus de la mosaïque du tabac) (Durrant et Dong, 2004). Typiquement, l'acide salicylique s'accumule lors des interactions R-Avr suite au déclenchement de l'ETI, se traduisant notamment par une réaction d'hypersensibilité (HR) qui correspond à une mort cellulaire programmée aboutissant à la restriction des agents pathogènes biotrophes et héli-biotrophes au point d'infection (Pieterse et al., 2009).

#### *-Biosynthèse*

La biosynthèse d'acide salicylique est initiée très rapidement lors de la PTI et de l'ETI, les gènes de sa synthèse faisant partie des premiers gènes induits (van den Burg et al., 2009). La synthèse d'acide salicylique peut être assurée par deux voies à partir du chorismate (Fig.I.10.A): la voie des phénylpropanoïdes et la voie de l'isochorismate (Wildermuth et al., 2001). L'activation de ces deux voies se ferait séquentiellement dans le cadre d'une réponse à un stress. La voie des phénylpropanoïdes serait privilégiée pour une production localisée et rapide tandis que celle de l'isochorismate serait plutôt sollicitée pour maintenir un niveau constitutif d'acide salicylique et induire la SAR (Wildermuth et al., 2001). La synthèse de phénylalanine, précurseur des phénylpropanoïdes, est assurée à partir du chorismate en présence d'une chorismate mutase, et la production de l'acide salicylique

peut se faire *via* la conversion de l'acide cinnamique en acide benzoïque puis en acide salicylique sous l'action de l'acide benzoïque 2-hydroxylase (BA2H) (Durrant et Dong, 2004). La voie de l'isochorismate, quant à elle, fait intervenir une isochorismate synthase ainsi qu'une isochorismate pyruvate lyase. L'isochorismate synthase est une enzyme chloroplastique codée par le gène *ICS*, dont un des mutants correspondant chez *Arabidopsis* est le mutant *sid2*, très sensible à certains pathogènes (Wildermuth et al., 2001 ; Garcion et al., 2008).

La protéine EDS5, homologue à une famille de transporteurs de flavonoïdes, servirait à l'entrée de précurseurs de synthèse de SA à l'intérieur du chloroplaste et les mutants déficients pour cette protéine sont incapables de synthétiser le SA (Shah, 2003). Les protéines EDS1, PAD4 et SAG101, homologues à des lipases, sont indispensables à la biosynthèse d'acide salicylique et à la perception des signaux régulés par les gènes de résistance de type TIR-NBS-LRR. Cependant, les différents mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été identifiés (Wiermer et al., 2005).

Dans la présente étude, la biosynthèse d'acide salicylique sera suivie au cours de l'interaction Ea-Pommier *via* les gènes *SID2*, *EDS1* et *PAL* (Tableau I.2.). De même, le gène codant l'enzyme qui catalyse la méthylation de l'acide salicylique en méthyl-salicylate (SAMT) a également été étudié.

#### *-Signalisation et défenses SA-dépendantes*

- Evènements précoces

Les flux de calcium constituent un des tous premiers évènements liés à la perception de PAMPs ou de produits de gènes d'avirulence (Lecourieux et al., 2006 ; Ma et Berkowitz, 2007). La concentration en calcium dans le cytosol est très faible, tandis qu'elle est élevée, de l'ordre du mM, dans la paroi cellulaire (dans le réseau pectique), ainsi que dans la vacuole. Les flux de calcium vers le cytosol sont assurés par des canaux passifs. Selon la littérature, ces flux peuvent nécessiter ou non des évènements de phosphorylation (Ma et Berkowitz, 2007). Ils participent à la production d'anions superoxydes par l'activation directe de NADPH oxydases membranaires possédant des domaines de fixation au calcium (Sagi et Fuhr, 2006). L'anion superoxyde, en retour, active également les influx de calcium, créant donc une boucle d'auto-activation. Les NADPH oxydases seraient aussi sous le contrôle de kinases calcium-dépendantes (Ma et Berkowitz, 2007). De plus, l'entrée de calcium apoplastique provoque l'activation de transporteurs de calcium de la vacuole, mettant ainsi

en place une boucle d'auto-induction de l'augmentation du calcium cytosolique (Ma et Berkowitz, 2007). Ces différents évènements sont représentés schématiquement dans la figure I.11. C'est vraisemblablement la variation de la concentration en calcium cytosolique qui est à l'origine de la mise en action des cascades de signalisation, notamment par le biais de calmodulines kinases calcium-dépendantes. Par exemple, le calcium intervient dans la régulation de l'expression précoce d'*EDS1* et donc dans la synthèse de SA (Fig.I.12). Constitutivement, *EDS1* est très faiblement exprimé sous l'effet répresseur d'un facteur de transcription capable d'interagir avec une calmoduline calcium-dépendante, AtSR1 (Du et al., 2009). Ces flux de calcium suppriment certainement, d'une manière ou d'une autre, cet effet répresseur pour permettre l'expression d'*EDS1* et promouvant ainsi l'induction de l'expression de gènes SA-dépendants et de la HR.

La production de NO est activée par une calmoduline kinase en présence de calcium chez *Arabidopsis* (Lecourieux et al., 2006 ; Ma et al., 2008). En plus d'être impliqué dans des processus développementaux tels que le développement des feuilles ou encore la fermeture des stomates, le NO intervient dans la régulation de l'activité des protéines par nitrosylation (fixation d'un groupement NO) et nitration (fixation d'une groupement NO<sub>2</sub> ; Besson-Bard et al., 2008). L'origine de la production durant les stress d'origine biotique n'est toujours pas élucidée. Elle pourrait impliquer une production non enzymatique ou catalysée par une nitrate/nitrite réductase à partir du nitrite, ou bien par une activité arginine-dépendante, similaire à une oxyde nitrique synthase (Besson-Bard et al., 2008). Cependant, l'activité oxyde nitrique synthase chez les plantes reste plutôt controversée, et il se pourrait que le catabolisme des polyamines soit une source importante de la production de NO. Cette diversité des origines du NO fait que l'étape d'activation de la production de cette molécule par la calmoduline kinase n'est pas élucidée. L'augmentation du calcium cytosolique induit la production de NO qui à son tour régule les flux de calcium, probablement en bloquant l'influx apoplastique mais en favorisant l'efflux vacuolaire, de manière GMPc-dépendante (Wendehenne et al., 2004 ; Lecourieux et al., 2006). Le NO intervient donc dans le maintien d'une forte concentration en calcium cytosolique. Il est également capable de réguler positivement l'expression de gènes codant des PR-protéines, les enzymes de la voie des phénylpropanoïdes, ainsi que d'autres gènes de défense (Wendehenne et al., 2004), certainement par la S-nitrosylation des protéines, comme c'est le cas pour NPR1 (voir ci-dessous ; Leitner et al., 2009).

Comme mentionné précédemment, les flux de calcium sont à l'origine de la stimulation de la synthèse de FAO (anion superoxide et indirectement de peroxyde d'hydrogène après dismutation, ainsi que de radicaux hydroxyles en présence de métaux cationiques). Les FAO jouent un double rôle dans la voie de l'acide salicylique, en promouvant sa synthèse d'une part et en établissant un état redox jouant un rôle très important dans l'induction NPR1-dépendante des défenses (voir ci-dessous ; Vlot et al., 2008). La production d' $H_2O_2$ , en partie assurée par les mitochondries et les chloroplastes, est stimulée par l'acide salicylique, il y a donc une boucle d'autoinduction qui s'instaure, en parallèle du choc oxydant. De plus, le peroxyde d'hydrogène est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire liée à l'HR (Van Breusegem et Dat, 2006).

- Les facteurs de régulation des défenses SA-dépendantes

Le principal médiateur de l'activation des défenses SA-dépendantes est la protéine NPR1 et cette activité est régulée par la monomérisation et l'oligomérisation de NPR1, gouvernant son entrée ou non dans le noyau (Fig.I.12. ; Fobert et Després, 2005). NPR1 est présent constitutivement sous forme d'oligomères cytosoliques, liés entre eux par des ponts disulfures (Grant et Lamb, 2006 ; Dong, 2004), qui sont donc sensibles au potentiel redox. Cette protéine possède des domaines répétés de type ankyrine qui servent probablement à l'interaction avec des facteurs de transcription. Quand l'acide salicylique s'accumule, il se produit une altération du potentiel redox cellulaire, d'abord oxydant puis réducteur, qui coïncide avec une augmentation de glutathion oxydé (GSSG) cytosolique (Fobert et Després, 2005). Les oligomères de NPR1 sont alors réduits en monomères capables de franchir la membrane nucléaire pour interagir avec des facteurs de transcription et induire l'expression de gènes de facteurs de transcription et de protéines de défenses (Dong, 2004). Il est intéressant de noter que l'interaction de NPR1 avec la voie de l'acide jasmonique (voir paragraphes suivants) ne nécessite pas sa translocation dans le noyau, à l'inverse des défenses SA-dépendantes (Spoel et al., 2003). Le gène *NPR1* est exprimé constitutivement à un faible niveau et des monomères franchissent, avec un faible débit, la membrane nucléaire. Pour éviter une induction constitutive des défenses qui serait préjudiciable au développement de la plante, NPR1 est dégradé par le signalosome COP9 après interaction avec la culline CUL3, une E3-ubiquitine ligase (Spoel et al., 2009). Au cours de l'induction de la SAR, la dégradation de NPR1 est toujours assurée mais dirigée contre la forme phosphorylée de NPR1. La fixation de NPR1 sur une séquence promotrice assure le

recrutement du complexe de transcription pour activer l'expression du gène situé en aval. Une fois l'expression du gène activée par NPR1, la phosphorylation de ce dernier aurait pour objectif de favoriser son interaction avec la culline pour provoquer sa dégradation, libérant ainsi la séquence promotrice pour d'autres monomères de NPR1 « frais » et assurer l'expression continue de facteurs de transcription et de gènes de défense (Spoel et al., 2009 ; Mukhtar et al., 2009). Ainsi, la dégradation de NPR1 est indispensable à la mise en place de la SAR. En revanche, le rôle des facteurs TGA dans cette régulation n'est pas encore établi (Mukhtar et al., 2009). En plus de ce mécanisme de contrôle, la translocation de NPR1 est régulée par le degré de nitrosylation de NPR1, processus dépendant de thioredoxines (TRX) et du S-nitroglutathion (GSNO). La première enzyme est indispensable pour catalyser la réduction et donc la monomérisation de NPR1 tandis que le GSNO, formé en présence de NO, est capable d'oxyder NPR1 par nitrosylation et d'en favoriser la polymérisation (Tada et al., 2008). Cette nitrosylation est cependant indispensable pour une bonne induction des défenses en présence de SA et oligomérisation et monomérisation seraient finement contrôlées au cours de cette réponse. Ainsi, la plante a réussi à élaborer un système de défense rapidement inductible mais qui reste sous contrôle afin de ne pas altérer son développement en cas d'absence de stress abiotique.

Le gène *NPR1* sera suivi dans le pommier au cours de l'interaction avec *Ea*, mais étant donnée l'importance des régulations post-traductionnelles décrites ci-dessus, l'interprétation des résultats sera faite sous réserve. Il est utile de noter cependant que le gène *MpNPR1* a été cloné chez le Pommier et présente 35% d'identité avec *AtNPR1* (Malnoy et al., 2007). Sa surexpression permet une induction plus rapide des gènes *PR-2*, *PR-8* et *PR-10*, et confère une résistance significativement accrue à *Erwinia amylovora*, ainsi qu'à *Venturia inaequalis* et *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. Plusieurs gènes de PR-protéines ont par ailleurs été inclus dans le présent travail, comme marqueurs potentiels de la voie de l'acide salicylique : *PR-1*, *PR-2* et *PR-5*.

- Les gènes régulés par l'acide salicylique

Des travaux très récents indiquent que l'acide salicylique induit l'expression d'un nombre important de gènes, de manière NPR1-indépendante et NPR1-dépendante. Les premiers gènes, NPR1-indépendants, sont induits très rapidement, dans les deux premières heures, après application d'acide salicylique (Blanco et al., 2009). Ces gènes codent plutôt des enzymes de systèmes antioxydants et de détoxication, tels que des glutarédoxines ou des

glutathion-S-transférases, et pourraient avoir comme fonction globale de rétablir la balance redox lors de l'interaction avec un pathogène, favorisant de plus la monomérisation de NPR1. Ces gènes ont la particularité de porter un motif commun dans leur séquence promotrice, l'élément *as-1*, qui est différent du motif de reconnaissance des facteurs TGA et assure une régulation immédiate, FAO-dépendante et NPR1-indépendante, sous le contrôle de l'acide salicylique (Garreton et al., 2002 ; Blanco et al., 2009). Des protéines kinases et des facteurs de transcription WRKY font également partie de cet ensemble de gènes précocement induits par SA. De plus, des données montrent que plusieurs WRKY sont des cibles directes de NPR1 (Wang et al., 2006).

Les facteurs de transcription WRKY jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité des plantes et notamment dans la régulation des défenses SA-dépendantes (Eulgem et Somssich, 2007). Ces protéines sont toutes constituées d'au moins un motif N-terminal de liaison à l'ADN portant la signature très conservée WRKYGQK ainsi qu'un motif doigt de zinc (Pandey et Somssich, 2009). Ces deux motifs, formant le domaine WRKY, assurent la reconnaissance et l'interaction avec une séquence spécifique de l'ADN appelée W-box, présente dans la séquence promotrice de nombreux gènes (Eulgem et al., 2000). Beaucoup de facteurs de transcription WRKY existent au sein du génome, et leur nombre varie selon les genres étudiés (plus de 100 chez le peuplier et 70 chez *Sorghum bicolor*), chacun pouvant avoir des effets spécifiques, notamment agir comme des activateurs ou bien des répresseurs des défenses. Le facteur de transcription WRKY70 semble jouer un rôle déterminant dans l'induction des défenses SA-dépendantes et également dans la modulation négative de la voie de l'acide jasmonique (Li et al., 2004). Ce facteur, réprimé par COI1 est capable de réprimer les défenses JA-dépendantes et d'induire des défenses SA-dépendantes. De plus, sa surexpression confère la résistance d'*Arabidopsis* à *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. A l'image de NPR1, WRKY70 est donc un élément crucial de l'interaction entre les voies SA et JA.

Un facteur de transcription WRKY a été suivi dans le travail présenté dans ce chapitre, au cours de l'interaction entre le Pommier et *Ea*. Il est homologue à *WRKY30* (p-value :2-08 en BLASTx) qui est connu pour être induit en présence d'un choc oxydant, provoqué par exemple par le paraquat (Scarpeci et al., 2008).

A ces différents éléments régulateurs s'ajoute également la régulation chromatinienne. L'expression des gènes *PR-1* et *PR-4* par exemple est réprimée constitutivement.

L'acétylation de leur promoteur conduit à une « ouverture » de la conformation de la chromatine, facilitant l'induction de leur expression (van den Burg et al., 2009). Inversement, l'acétylation est limitée constitutivement par l'action de l'histone deacétylase HDA19, réprimant ainsi leur expression. Le facteur SNI1 serait impliqué dans la régulation de ce phénomène.

#### *-La résistance systémique acquise (SAR)*

La SAR correspond à une activation durable, sur l'ensemble de la plante, de défenses en réponse à une accumulation locale et systémique d'acide salicylique (Loake et Grant, 2007 ; Vlot et al., 2008). La SAR peut également être induite suite à la reconnaissance de certains MAMPs, tel que le peptide flg22 de certains flagelles bactériens mais également suite à l'ETI se produisant à la suite d'une reconnaissance R-Avr. Elle confère une résistance à une large gamme d'agents pathogènes (Grant et Lamb, 2006). La transmission du signal vers les parties non attaquées de la plante n'est pas entièrement élucidée. Un certain nombre de travaux réalisés à l'aide de mutants d'*Arabidopsis* placent à ce jour plusieurs molécules comme candidats pour être des médiatrices de la SAR, parmi lesquelles: la forme méthylée de l'acide salicylique (MeSA), l'acide jasmonique, un petit peptide généré par l'action d'une protéase apoplastique (CDR1) et le NO. La MAP kinase MKK7, associée au phloème, pourrait également être impliquée (Vlot et al., 2008). De plus, le métabolisme lipidique semble jouer un rôle important dans l'établissement de la SAR en raison du rôle positif d'EDS1 et PAD4, analogues de lipases, dans la signalisation liée à la reconnaissance R-Avr, ainsi que d'une protéine de transfert de lipides (LTP), DIR1, et d'une dihydroxyacétone phosphate réductase (Wiermer et al., 2005). DIR1 pourrait intervenir dans le transport systémique d'un signal lipidique. De plus, les mutants altérés dans les étapes de  $\beta$ -oxydation de la biosynthèse du JA ne sont plus capables d'activer systématiquement leurs défenses, même si la reconnaissance du signal est toujours assurée (Balbi et Devoto, 2008). Cependant, des données très récentes sont en contradiction avec cette observation. Sur *Arabidopsis*, il s'avère en effet que l'induction de la SAR est indépendante de la production de MeSA et de la voie de signalisation de l'acide jasmonique (aussi bien la synthèse que la transduction). L'acide jasmonique induit la méthylation de l'acide salicylique, vraisemblablement pour provoquer sa volatilisation et limiter son accumulation dans les cellules, phénomène qui alimente donc l'antagonisme entre ces deux voies (Attaran et al., 2009). Ainsi, les données accumulées

jusqu'à présent ne permettent pas de conclure sur un candidat précis pour la transmission d'un signal activant la SAR.

### *II.1.2.b) L'acide jasmonique*

L'acide jasmonique fait partie d'un ensemble de dérivés lipidiques appelés oxylipines s'accumulant en réponse à un certain nombre de stress biotiques, en particulier l'attaque par les insectes herbivores, et aux blessures, et intervenant également dans la régulation de processus développementaux comme la maturation des organes de reproduction (Farmer et al., 2003 ; Wasternack, 2007 ; Koo et Howe, 2009). Les oxylipines sont essentiellement produits par oxydation de précurseurs lipidiques dérivés des membranes, tels que l'acide linoléique (18:3) et possèdent des activités de signalisation et/ou antimicrobiennes (Prost et al., 2005). Contrairement à la voie de l'acide salicylique dans laquelle de nombreux points restent encore obscurs, les données sur la voie de biosynthèse ainsi que sur la perception et les mécanismes de signalisation sous-jacents pour l'acide jasmonique sont mieux connues (Browse, 2009). L'acide jasmonique est également impliqué, comme l'acide salicylique et la SAR, dans l'induction systémique de défenses (ISR) caractérisée par l'expression de PR-protéines et de métabolites secondaires. La différence fondamentale entre ISR et SAR réside dans le processus d'induction de ces mécanismes. L'ISR s'exprime en réponse à divers stress abiotiques mais aussi à la présence de certains microorganismes, les PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria), tandis que la SAR, comme décrit dans le paragraphe précédent, est activée après reconnaissance d'un MAMP ou d'un produit de gène d'avirulence par le produit d'un gène de résistance.

#### *-Biosynthèse*

Dans des feuilles de tabac, l'acide jasmonique s'accumule rapidement à la suite de blessures mais aussi en réponse à la sécheresse, aux UV, à l'ozone et à certains éliciteurs, insectes et agents pathogènes (Devoto et Turner, 2005). Sa biosynthèse, présentée dans la figure I.11.B, serait stimulée en réponse à la production de la systémine, un peptide impliqué dans l'expression systémique de défenses (Howe et Schilmiller, 2002). Un des aspects marquants de la biosynthèse de l'acide jasmonique est sa compartimentation (Fig.I.13.; Wasternack, 2007). Des études immunocytochimiques montrent que la synthèse des

jasmonates est très active dans les cellules compagnes du phloème et que l'acide jasmonique s'accumule dans le système vasculaire de la plante (Koo et Howe, 2009). Le précurseur principal est l'acide linoléique présent dans les phospholipides membranaires des chloroplastes, libéré sous l'action d'une phospholipase de type A2 (Devoto et Turner, 2005). Cette étape est commune dans la synthèse des oxylipines mais peut également impliquer l'acide linoléique (18:2). Ces acides gras insaturés (PUFAs) sont susceptibles d'être oxydés enzymatiquement par une classe de protéines appelées lipoxygénases. Ces enzymes catalysent l'insertion d'oxygène moléculaire sur les carbones 9 ou 13 de la chaîne insaturée après une abstraction d'hydrogène sur le carbone 11 (Feussner et Wasternack, 2002). L'étape de peroxydation est très importante car les 9-hydroxyperoxydes et 13-hydroxyperoxydes résultants vont subir des transformations différentes pour aboutir à des composés spécifiques. Il existe deux types de lipoxygénases (9- et 13-lipoxygénases) distinctes qui sont capables de catalyser spécifiquement l'insertion sur le carbone 9 ou le carbone 13. Les 9-hydroperoxydes et 13-hydroperoxydes peuvent subir, entre autres, des transformations catalysées par une divinyl éther synthase ou une hydroperoxyde lyase, fournissant un panel d'oxylipines variées (Howe et Schilmiller, 2002). Elles constituent, entre autres, des espèces électrophiles réactives capables d'activer des défenses (Farmer et al., 2003). Les jasmonates sont issus des 13-hydroperoxydes. Ces derniers sont convertis en acide 12,13(S)-époxylinoléique par l'action d'une allène oxyde synthase (AOS) puis en acide (9S,13S)-12-oxo-*cis*-10,15-phytyldiénoïque (OPDA) par l'allène oxyde cyclase (AOC). L'AOS est une enzyme chloroplastique de la classe des cytochromes P450 monooxygénases (Feussner et Wasternack, 2002). L'OPDA est un intermédiaire qui possède une activité de signalisation COI1-indépendante qui lui est propre (voir ci-dessous ; Taki et al., 2005). L'ensemble de ces étapes initiales est chloroplastique. L'OPDA est transporté ensuite jusqu'aux peroxysomes *via* le transporteur ATP-Binding Cassette PXA1 (Théodoulou et al., 2005) et subit une réduction catalysée par l'OPDA réductase, codée par le gène *OPR3* (Devoto et Turner, 2005). Le produit résultant de cette réduction est alors conjugué au coenzyme A puis subit trois cycles de  $\beta$ -oxydation (impliquant notamment des enzymes type Acyl CoA oxydases, ACX), et l'acide jasmonique est formé après hydrolyse de ce coenzyme. La plupart de ces gènes mentionnés et codant des enzymes de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique sont sujets à une boucle de régulation positive par l'acide jasmonique et sont donc induits en présence de cette hormone (Browse, 2009). L'acide jasmonique, comme les autres oxylipines, est susceptible de subir diverses transformations qui vont modifier ses propriétés

de volatilité et de signalisation. Ces transformations comprennent la méthylation, la décarboxylation, l'hydroxylation, la réduction et la conjugaison à la leucine ou à la valine (Browse, 2009). L'ensemble des dérivés de l'acide jasmonique est regroupé sous le terme de jasmonates. La conjugaison à l'isoleucine est catalysée par une jasmonate-isoleucine transférase codée par le gène *JAR1* et la méthylation catalysée par la jasmonate méthyltransférase codée par le gène *JMT*. Ces deux processus constituent des réactions primordiales car leurs produits respectifs, le jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) et le méthyljasmonate (MeJA), jouent un rôle important dans l'induction de gènes et dans la transmission systémique respectivement (Koo et Howe, 2009). Le MeJA n'est pas actif directement dans l'activation des défenses COI1-dépendantes, car il n'est pas directement capable d'interagir avec COI1 (voir paragraphes suivants) (Katsir et al., 2008). Le MeJA doit donc être déméthylé puis conjugué à l'isoleucine.

Pour l'étude de l'interaction Pommier-*Ea*, il a été choisi de suivre les gènes *PLD1*, *LOX2* (homologue à une lipoxygénase de type 13 d'*Arabidopsis*), *JMT* et *JAR1* comme indicateurs de la voie de biosynthèse des jasmonates (tableau I.2.).

#### *-Le jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) et COI1, et les facteurs de transcription*

- JA-Ile

Des études très récentes suggèrent que la réponse moléculaire induite à la suite d'une blessure est régulée par la forme conjuguée de l'acide jasmonique à l'isoleucine (Koo et Howe, 2009). L'induction systémique des défenses implique d'ailleurs une synthèse *de novo* de cette forme conjuguée. Les mutants *jar3* et *jar1* du tabac et d'*Arabidopsis*, respectivement, sont déficients pour une JA amino-acid synthase et sont fortement atteints dans les réponses JA-dépendantes, signifiant ainsi que le JA-Ile est une forme active de jasmonates (Staswick et Tiryaki, 2004 ; Balbi et Devoto, 2008). Le JA-Ile est synthétisé rapidement après perception d'une blessure ou d'un stress mécanique, probablement à partir des pools constitutifs d'OPDA et de JA (Browse, 2009). De plus, l'interaction de COI1 avec les facteurs JAZ (voir paragraphes suivants) n'est possible qu'après fixation au JA-Ile (Katsir et al., 2008 ; Browse, 2009). Toutefois, malgré l'importance du JA-Ile, d'autres jasmonates et oxylipines interviennent dans les processus de développement et de réponse aux pathogènes, car des mutants déficients en lipoxygénases (étape précoce dans la biosynthèse) ne peuvent pas être entièrement restaurés par application de JA-Ile (Chini et

al., 2009). De plus, la réponse à une blessure nécessite également la présence d'OPDA en tant que médiateur (Taki et al., 2005).

- COI1

Les mutants *coi1* d'*Arabidopsis* montrent une insensibilité à la coronatine, qui est une toxine bactérienne analogue du JA-Ile, produit notamment par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Ces mutants sont plus sensibles à certains pathogènes et sont altérés dans le développement des étamines (Balbi et Devoto, 2008). La protéine active, COI1, est un régulateur crucial dans l'expression des gènes jasmonates-dépendants (Devoto et al., 2005). En effet, en réponse à une blessure, beaucoup de gènes sont mobilisés par l'intermédiaire de COI1 qui (i) induit l'expression de gènes de protéines de défense (glucanases et thionines entre autres), de la voie des phénylpropanoïdes et des anthocyanes et (ii) au contraire, réprime les gènes associés à la sénescence et à la voie des terpénoïdes chez *Arabidopsis*.

Des études d'interaction ligand-récepteur et de pull-down *in vitro* montrent clairement que COI1 est le récepteur du JA-Ile et que la fixation de ce dernier sur COI1 permet la dégradation des répresseurs JAZ (voir paragraphes suivants) et l'induction de l'expression des gènes jasmonate-dépendants (Thines et al., 2007 ; Katsir et al., 2008). La coronatine ainsi que l'acide jasmonique conjugué à la valine sont également capables de fixer COI1 avec une forte affinité, bien que celle de la coronatine soit la plus forte. Le gène *COI1* code une protéine de type F-box, qui s'associe à une culline et une autre protéine de type Skp1, ASK1 ou ASK2 pour former un complexe E3-ubiquitine ligase fonctionnel (Xu et al., 2002). Les protéines F-box confère la spécificité de substrat aux ubiquitine ligases de type E3. Celles-ci, comme décrit précédemment, gouvernent l'ubiquitylation ciblée de protéines destinées à être dégradées et sont notamment activées par neddylation (greffage covalent d'une protéine type-ubiquitine appelée NEDD8/RUB1) (Lechner et al., 2006). De plus, le complexe ainsi formé, appelé SCF<sup>COI1</sup>, interagit avec une des protéines CSN du signalosome COP9 pour marquer les facteurs protéiques destinés à être dégradés par le protéasome (Feng et al., 2003). Cette interaction est nécessaire à la désactivation du SCF<sup>COI1</sup> par déneddylation (Serino et Deng, 2003). Le modèle actuel est que l'activation du SCF<sup>COI1</sup> par perception du JA-Ile dans le noyau de la cellule promouvrait la dégradation des répresseurs JAZ (voir paragraphes suivants), assurant ainsi l'expression des gènes induits par l'acide jasmonique *via*, entre autres, le facteur de transcription *MYC2* (Browse, 2009 ; Chini et al., 2009 ; Grant et Jones, 2009). Ce genre de régulation par dégradation de répresseur est un système

conservé dans les voies de signalisation, retrouvé par exemple dans les voies de l'auxine, des gibbérellines et de l'éthylène (Chini et al., 2009).

Après perception d'une blessure, il apparaît que certains gènes sont modulés de manière COI1-indépendante et d'autres de manière COI1- et JA-indépendante (dont la biosynthèse d'éthylène), mais globalement les gènes sous la dépendance de COI1 sont les plus nombreux. Ceci implique toutefois que la signalisation liée à ce type d'évènement mobilise d'autres signaux hormonaux (Devoto et al., 2005).

L'expression du gène *COI1* sera suivie au cours de l'interaction du Pommier avec *Ea*, mais comme pour NPR1, l'interprétation devra être prudente en raison de la régulation post-traductionnelle associée à ce facteur.

- Les répresseurs JAZ

Les défenses jasmonates-dépendantes sont constitutivement réprimées par une famille de facteurs de transcription récemment mise en évidence, les facteurs JAZ (Jasmonate ZIM-domain ; Chini et al., 2007). Ces facteurs possèdent un domaine ZIM et un domaine Jas (domaine CT) proche de l'extrémité C-terminale mais ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN (Browse, 2009). Il existe 12 protéines JAZ au sein du génome d'*Arabidopsis* et celles-ci jouent des rôles en partie redondants car les mutants uniques correspondants ne présentent pas de phénotype particulier. Les facteurs JAZ agissent donc comme des répresseurs de gènes répondant aux jasmonates. Ces facteurs étant dépourvus de domaine de liaison à l'ADN, ils n'agissent pas directement sur les promoteurs des gènes d'intérêt mais plutôt par répression de leurs activateurs. L'interaction avec les autres facteurs de transcription et SCF<sup>COI1</sup> se ferait par l'intermédiaire du domaine Jas. La fonction du domaine ZIM reste hypothétique mais il pourrait être impliqué dans l'interaction avec un co-répresseur (Thines et al., 2007 ; Browse, 2009). Comme décrit dans le paragraphe précédent, ces facteurs sont destinés à être dégradés par le protéasome après ubiquitylation guidée par SCF<sup>COI1</sup> en présence de JA-Ile. L'expression dans un génotype sauvage d'*Arabidopsis* d'une forme recombinante du facteur JAZ3, dépourvue du domaine C-terminal comme celle identifiée dans le mutant *jai3-1*, confère l'insensibilité à l'acide jasmonique (Chini et al., 2007). Dans le cas de *jai3-1*, l'absence du domaine C-terminale montre que c'est le domaine Jas qui est responsable de l'interaction avec SCF<sup>COI1</sup>. Ce domaine est nécessaire pour provoquer l'ubiquitylation. Cependant, un domaine ZIM fonctionnel est aussi indispensable pour la reconnaissance par SCF<sup>COI1</sup> (Browse, 2009).

- Les facteurs MYC2 et ERF1

Les défenses régulées par l'acide jasmonique dépendent principalement de l'action de deux facteurs de transcription principaux, MYC2 et ERF1 (Lorenzo et al., 2004). Ces deux facteurs jouent des rôles complémentaires dans la signalisation de l'acide jasmonique, et ils sont impliqués dans des types de réponses différentes. Globalement, MYC2 et ERF1 régulent des groupes de gènes qui leur sont propres et ont des effets antagonistes l'un sur l'autre. Par exemple, les gènes *PDF1.2* et *PR4* qui codent des protéines de défense sont induits dans le cadre d'interaction avec certains champignons nécrotrophes, par l'acide jasmonique et l'éthylène, *via* ERF1 alors que MYC2 exerce un effet répressur sur ces gènes (Lorenzo et al., 2003 et 2004). A l'inverse, les gènes *VSP2* et *LOX3* sont plutôt induits en réponse à des blessures mécaniques, *via* MYC2 tandis que ERF1 tend à les réprimer (Lorenzo et al., 2004). *MYC2* code un facteur de transcription possédant un domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) leucine zipper assurant la liaison à l'ADN portant une séquence G-box (CACGT ; Boter et al., 2004). Il intervient dans l'induction des gènes répondant aux blessures tels que *PIN2* (protease inhibitor) et *LAP* (leucine aminopeptidase) et réprime certains gènes de défenses, dont *PDF1.2*. L'activité de MYC2 s'exprime aussi par la présence d'acide abscissique, ce qui montre clairement que la voie de signalisation répondant à l'acide jasmonique interagit pleinement avec d'autres phytohormones (Lorenzo et al., 2004). L'activation des gènes JA- et MYC2-dépendants apparaît comme une réponse conservée d'une espèce à une autre, comme le démontre des résultats obtenus sur tomate et *Arabidopsis*. Ceci renforce par ailleurs l'importance de cette voie dans la physiologie des plantes (Boter et al., 2004). Le facteur MYC2 agit aussi en répressur en modérant également les inductions provoquées par l'acide jasmonique, comme c'est le cas pour la biosynthèse du tryptophane et des glucosinolates indoliques (Dombrecht et al., 2007). MYC2 est une cible des facteurs JAZ et son activation nécessite donc l'intervention du SCF<sup>COI1</sup> activé par le JA-Ile (Chini et al., 2007 ; Katsir et al., 2008). Cependant, parmi les gènes régulés par l'intermédiaire de MYC2 se trouvent également les facteurs de transcription JAZ, qui sont très rapidement exprimés et par conséquent participent à la modulation négative de l'effet de MYC2 (Chini et al., 2007).

Le facteur de transcription ERF1 a été initialement décrit comme acteur de la signalisation liée à l'éthylène et reconnaît des séquences promotrices d'ADN portant le motif GCC-box (Singh et al., 2002). ERF1 est capable d'induire l'expression de gènes de défense tels que *PDF1.2*, caractéristiques des interactions avec des champignons nécrotrophes

(Lorenzo et al., 2003). L'induction de ces gènes nécessite que les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'éthylène soient fonctionnelles, l'induction par l'éthylène nécessitant que COI1 soit fonctionnel et celle par l'acide jasmonique requérant EIN2. En effet, l'expression d'ERF1 n'est optimale que par activation de ces deux voies. Ainsi ERF1 agit en aval des voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène et permet l'induction de gènes de défense dirigés contre les nécrotrophes, *via* une action synergique de ces deux hormones (Lorenzo et al., 2003).

L'interaction entre les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'éthylène est renforcée par le fait qu'une partie du pool d'acide jasmonique est retrouvée constitutivement conjuguée à l'ACC, un précurseur de biosynthèse de l'éthylène (Staswick et Tiryaki, 2004). L'hydrolyse du JA-ACC pourrait donc provoquer l'activation des deux voies, bien que cela reste à être démontré. Vu de manière finaliste, la plante réussit ainsi à moduler précisément ses réponses aux divers stress environnementaux par le biais d'un réseau complexe de régulateurs.

#### *-Les gènes régulés par les jasmonates*

Les premiers travaux rapportant une activation de défenses, tels que des inhibiteurs de protéases et des métabolites secondaires, en réponse à des blessures, remontent aux années 1970 et se sont accumulés durant les années 1990 (Koo et Howe, 2009). Les jasmonates sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques, tels que la maturation du pollen, la sénescence et la défense contre les pathogènes, et gouvernent par conséquent l'expression d'un grand nombre de gènes (Pauw et Memelink, 2005). Parmi eux se trouvent des gènes codant des PR-protéines (chez *Arabidopsis*, *PR-3*, *PR-4* et *PDF1.2*) et des enzymes des voies de biosynthèse du métabolisme secondaire dont les alcaloïdes et les flavonoïdes (Dombrecht et al., 2007). Toutefois, la régulation de ces gènes varie considérablement selon les conditions d'expérimentation (culture cellulaire, plante entière,...) et selon les tissus étudiés (Pauwels et al., 2009). Un traitement au MeJA provoque l'accumulation de caffeoylputrescine dans des feuilles de tomate et s'accompagne d'une activation de la voie des phénylpropanoïdes (Chen et al., 2006). L'acide jasmonique stimule les gènes de sa propre voie de biosynthèse et affecte également l'expression de gènes codant des enzymes du métabolisme des sucres et des acides aminés. Des travaux récents montrent que le métabolisme du tryptophane et des indoles glucosinolates, la synthèse d'auxine ainsi que la production de mécanismes antioxydants sont régulés par l'acide jasmonique, sous le

contrôle du facteur de transcription MYC2 (Dombrecht et al., 2007). La modulation de tel ou tel gène doit correspondre au stimulus perçu par la plante et nécessite donc un important réseau de régulation.

Il n'y a pas de données dans la littérature sur l'activation de gènes JA-dépendants chez le Pommier au cours d'une interaction avec un pathogène. Comme mentionné précédemment, la voie des phénylpropanoïdes semble en grande partie régulée par l'acide jasmonique. Par exemple, le gène *CHS* est activé chez le soja en réponse à une blessure (Creelman et al., 1992). C'est pourquoi plusieurs gènes de cette voie du métabolisme secondaire ont été suivis au cours de l'interaction du Pommier avec *Ea*, *PAL*, *CAH*, *CHS* et *ANS2* (phénylalanine ammonia lyase, cinnamate-4-hydroxylase, chalcone synthase et anthocyanidine synthase respectivement ; voir chapitre II). Ces trois gènes permettront de suivre le comportement de la voie des phénylpropanoïdes (*PAL* et *CAH*), la première étape de synthèse des flavonoïdes (*CHS*) puis la synthèse des anthocyanes (*ANS2*). L'expression d'un gène codant une cinnamyl alcool déshydrogénase (*CAD*) catalysant la formation de précurseurs de lignine (Fig.I.1.B) sera suivie de la même manière. Des gènes codant des enzymes de transformations des polyphénols ont également été inclus, un codant pour une polyphénol oxydase (*PPO*) et un pour une laccase (*LAC3*). Une étude bibliographique plus détaillée sur ces enzymes est présentée dans le chapitre II. De plus, des gènes codant une défensine (*DEF*, similaire à *AtPDF2.2*), une LTP (*LTP*, codant l'allergène Mal d3) et un inhibiteur de protéinase (*PIN*) seront également étudiés comme des défenses répondant potentiellement à l'acide jasmonique mais aussi à l'éthylène. Les LTP sont des protéines pouvant jouer de multiples rôles physiologiques en raison de leur propriété de fixation spécifique ou non de lipides (de Oliveira Carvalho et Gomes, 2007). Certaines ont entre autres des propriétés de signalisation mais elles peuvent aussi avoir une action antimicrobienne directe. Comme mentionné dans l'étude bibliographique de la partie histologie de l'interaction, elles peuvent également participer à la formation de la cuticule.

D'autres gènes impliqués dans le métabolisme secondaire (isoprénoïdes [*HMGR*, *LYTB*, *AAO3*, *LIM*, *GgPPS* et *FPPS*] et cystéine sulfoxides [*ALLI*]) ont également été inclus dans l'analyse (voir chapitre II sur les métabolites secondaires du Pommier pour le détail de ces voies).

### II.1.2.c) L'éthylène

L'éthylène est une petite hormone gazeuse impliquée dans différents processus développementaux tels que la sénescence, le contrôle de la croissance, la maturation des fruits climactériques et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Bleecker et Kende, 2000). Initialement détecté comme responsable de la triple réponse des semis (faible élongation de la tige et élargissement de son diamètre, croissance horizontale), l'éthylène a aussi été impliqué dans des processus d'induction de défenses JA-dépendantes, et s'accumule notamment lors de la perception d'une blessure par la plante (Dong, 1998). Il est maintenant bien établi que l'éthylène n'agit pas seul dans l'induction de défenses mais plutôt comme un modulateur indispensable de certaines voies, et notamment celle de l'acide jasmonique (Adie et al., 2007).

#### *-Biosynthèse*

La biosynthèse de l'éthylène est bien connue, relativement simple et induite notamment par des signaux de blessures (DAMPs) ainsi qu'après une reconnaissance R-Avr (Adie et al., 2007). Le principal précurseur est la S-adénosine-L-méthionine (Fig.1.10. ; AdoMet), qui dérive du métabolisme de synthèse des acides aminés soufrés (méthionine, homocystéine et cystéine). Deux étapes importantes permettent de catalyser la formation d'éthylène à partir d'AdoMet (Bleecker et Kende, 2000) : il s'agit de la libération de l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) catalysée par l'ACC synthase (ACCS) puis de son oxydation par l'ACC oxydase (ACCO). La surexpression de ces deux étapes aboutit à l'expression des gènes de défense *PDF1.2* et *HEL* (HEvein-Like, similaire à PR-4) chez *Arabidopsis* (Adie et al., 2007). L'étape catalysée par l'ACCS est considérée comme limitante et le niveau de cette enzyme dans la cellule est régulée par dégradation par le protéasome 26S *via* la protéine ETO1 (Wang et al., 2004). En fait, l'activation de la synthèse d'éthylène passe probablement par une étape de phosphorylation d'ACCS en réponse à un stress, rompant l'interaction avec ETO1 et abolissant ainsi la dégradation d'ACCS. La phosphorylation d'ACCS pourrait impliquer les protéines kinases MAPK3 et MAPK6 (homologies aux kinases WIPK et SIPK du tabac), bien qu'à l'heure actuelle, des données indiquent que ce module serait plutôt impliqué dans la régulation d'EIN3 par phosphorylation (Hahn et Harter, 2009). Le détail de ces processus reste donc à être démontré. L'activation de l'ACCO a également été corrélée à l'induction de défense en réponse à des pathogènes viraux (TMV) et bactériens (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)

(Adie et al., 2007). Les gènes codant les enzymes des deux étapes de la synthèse d'éthylène peuvent donc constituer de bons marqueurs.

Au cours de l'interaction Pommier-*Ea*, il a été choisi de suivre l'expression du gène *ACCO* chez le Pommier (tableau 1.2.). Par ailleurs, son expression corrèle bien avec la production d'éthylène et la crise climactérique des pommes (Costa et al., 2005).

#### *-Signalisation : le trio CTR1/EIN2/EIN3*

Cinq récepteurs de l'éthylène (*ETR1/2*, *ERS1/2* et *EIN4*) ont été identifiés à ce jour et sont tous caractérisés par un domaine de fixation de l'éthylène et du cuivre dans leur partie N-terminale, ainsi qu'un domaine d'interaction avec le facteur *CTR1* (voir ci-dessous) dans leur partie C-terminale (Stepanova et Alonso, 2009). La dimérisation de ces récepteurs et la coordination du cuivre par des résidus cystéine et histidine sont indispensables pour former une poche hydrophobe capable de fixer l'éthylène (Fig.1.14.). Les récepteurs interagissent constitutivement avec *CTR1*, une protéine kinase qui agit comme un répresseur majeur de la voie de signalisation de l'éthylène. *CTR1* gouverne la dégradation d'*EIN2*, le premier régulateur positif de cette voie, *via* le protéasome et les deux protéines de type F-box *ETP1* et *ETP2* qui interagissent avec la partie C-terminale d'*EIN2* (Qiao et al., 2009). Constitutivement, le niveau de la protéine *EIN2* est bas, en raison de sa dégradation liée à son adressage au protéasome par *ETP1/2*, bien que la transcription du gène *EIN2* soit constante. L'inactivation de *CTR1* par fixation de l'éthylène sur son récepteur provoque l'inactivation d'*ETP1/2* et par conséquent l'accumulation d'*EIN2* (Fig.1.14), mais les mécanismes liés à ces inactivations ne sont pas connus (Qiao et al., 2009 ; Stepanova et Alonso, 2009). En présence d'éthylène, *EIN2* stimule la phosphorylation d'*EIN3* et d'*EIL1* *via* deux MAP Kinases. *EIN3* et *EIL1* sont les deux principaux facteurs de transcription régulant la réponse à l'éthylène et ils sont localisés dans le noyau (Li et Guo, 2007). La phosphorylation d'*EIN3* ou d'*EIL1* permet leur fixation sur des séquences promotrices particulières, appelées PERE (Primary Ethylene-Response Element). La séquence promotrice du gène codant le facteur de transcription *ERF1* contient notamment un élément PERE, ce qui a pour conséquence l'expression rapide d'*ERF1* en présence d'éthylène et de permettre l'expression de gènes de défenses, en synergie avec l'acide jasmonique, parmi lesquels *PDF1.2* et *b-CHI* (Solano et al., 1998 ; Adie et al., 2007). Au même titre qu'*EIN2*, l'activité d'*EIN3* est contrôlée par les protéines F-box *EBF1* et *EBF2* qui régulent son niveau de

dégradation par le protéasome (Stepanova et Alonso, 2009). De plus, EBF1 et EBF2 sont induits par EIN3, assurant ainsi un contrôle fin des réponses liées à l'éthylène.

Le gène *EIN3* a été choisi pour caractériser la voie de transduction liée à la perception de l'éthylène dans les feuilles de Pommier au cours de l'infection par *Ea*. Le facteur de transcription ZfC2H2 qui code une protéine à doigt de zinc dont le motif de fixation à l'ion métallique est de type Cys x 2/His x 2 a également été suivi. L'analyse microarray d'I. Pontais (2006) a montré qu'il était plutôt induit, de manière précoce chez Evereste. Bien qu'il soit difficile de déterminer sa fonction précise, les facteurs de transcription de type ZfCH2H2 sont connus pour réguler différents processus physiologiques, et certains sont notamment capables de réprimer l'expression de gènes dont les séquences promotrices portent des éléments de réponse à l'éthylène (Ciftci-Yilmaz et Mittler, 2008).

#### *-Les gènes régulés par l'éthylène*

La régulation de l'expression des gènes éthylène-dépendants est assurée par la présence de motifs conservés dans leur séquence promotrice, la GCC-box (Solano et al., 1998 ; Adie et al., 2007). L'éthylène participe à l'induction de plusieurs PR-protéines comme PR-2, PR-3, PR-4 et PR-12, mais ceci en interaction avec d'autres voies de signalisation (Adie et al., 2007). Des études transcriptomiques révèlent que l'éthylène intervient dans la régulation du métabolisme primaire, le renforcement de la paroi cellulaire et le contrôle du turn-over des protéines (Adie et al., 2007 ; Li et Guo, 2007). A ce titre, l'éthylène induit l'expression de glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP) qui vont participer au renforcement pariétal (Adie et al., 2007). Encore une fois, l'éthylène n'induit pas de lui-même l'expression de défenses spécifiques. Récemment, il a tout de même été montré que l'éthylène participe à l'accumulation de tocophérol en réponse à un stress hydrique (sécheresse) mais étonnamment sans provoquer d'accumulation transcriptionnelle (Cela et al., 2009). L'éthylène agit en coopération avec l'acide jasmonique pour induire l'ISR et participe globalement à la résistance contre les nécrotrophes (van Loon et al., 2006). Cependant et comme décrit dans le paragraphe concernant l'acide jasmonique, l'éthylène a une action antagoniste sur l'expression de gènes répondant au signal généré par une blessure (Adie et al., 2007).

#### *II.1.2.d) Interactions entre les voies*

Comme mentionné précédemment, les trois voies de signalisation décrites brièvement ci-dessus ne fonctionnent pas de manière isolée. Il existe des interactions, positives ou négatives, permettant de contrôler finement et d'adapter la reprogrammation transcriptionnelle en fonction des stimuli perçus par la plante (Fig.1.15. ; Pieterse et al., 2009). Certaines de ces interactions ont déjà été décrites, notamment la synergie entre JA et ET pour l'induction des défenses contre les nécrotrophes, par l'intermédiaire du facteur ERF1 (Lorenzo et al., 2003). Toutefois l'interaction entre JA et ET ne se résume pas à cette simple synergie, la réponse transcriptionnelle liée à la perception d'une blessure est contrôlée par JA mais régulée négativement par ET.

Une des interactions majeures entre les voies est l'antagonisme entre SA et JA, qui existe à différents niveaux. Tout d'abord, la MAP kinase MAPK4 possède une place cruciale dans l'interaction entre ces deux voies. Elle module négativement la voie SA, par répression de l'expression de *EDS1* et *PAD4* qui sont des régulateurs négatifs de l'interaction JA/ET. MAPK4 permet donc indirectement l'expression de gènes de défense contre les nécrotrophes (Brodersen et al., 2006). MAPK4 réprime la voie de l'acide salicylique par séquestration de complexes établis entre MKS1 et certains facteurs WRKY (Qiu et al., 2008). Lorsque l'activité de MAPK4 change, par exemple après perception d'un pathogène, les complexes MKS1-WRKY induisent l'expression de gènes de défense (Andreasson et al., 2005 ; Qiu et al., 2008). L'interaction entre SA et JA s'exprime également par l'action cytosolique et nucléaire de NPR1, capable de réprimer l'expression de gènes JA-dépendants (*VSP* et *LOX2*, par exemple) et également d'inhiber la synthèse de JA (Spoel et al., 2003). Un des autres nœuds d'interaction entre SA et JA est le facteur de transcription WRKY70, un intermédiaire positif dans la transduction de l'acide salicylique mais négatif dans la voie de l'acide jasmonique (Li et al., 2004). L'expression de *WRKY70* est induite de manière NPR1-dépendante et réprimée de manière COI1-dépendante.

Concernant l'interaction entre SA et ET, des résultats suggèrent que la régulation de la PTI est soumise à une régulation négative de SA par ET (Chen et al., 2009) et que ET est capable de moduler NPR1 et contrôler les voies SA et JA (Leon-Reyes et al., 2009). Effectivement, EIN3 réprime de manière constitutive l'expression de *SID2* en se fixant directement sur une de ses séquences promotrices, limitant ainsi le niveau de SA constitutif. Les mutants *ein3* d'*Arabidopsis* expriment constitutivement PR-1 et une résistance plus importante à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Chen et al., 2009). Cependant, il a été

observé que ET potentialise l'expression de PR-1 après traitement au SA, de manière NPR-1 dépendante (Leon-Reyes et al., 2009). De plus, ET joue un rôle redondant, de manière EIN2-dépendante, à celui de NPR1 dans la répression des défenses JA-dépendantes. L'ensemble de ces résultats illustre bien la complexité du réseau d'interaction existant entre les trois voies de signalisation SA, JA et ET.

Très récemment, des travaux ont montré l'importance des protéines DELLA comme modulateurs de toutes ces interactions entre voies de signalisation (Grant et Jones, 2009). Ces protéines sont effectivement à l'intersection entre les trois voies SA, JA et ET et impliquent également l'auxine, les gibbérellines et l'acide abscissique (Fig.1.15.). De plus, des mutants d'*Arabidopsis* exprimant de manière stable les DELLA sont plus sensibles aux pathogènes biotrophes (tels que *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) mais plus résistants aux pathogènes nécrotrophes. L'inverse est observé avec des mutants nuls pour plusieurs DELLA qui accumulent plus de SA en réponse aux pathogènes biotrophes, renforçant le rôle de ces protéines dans le contrôle de l'expression des défenses SA et JA/ET (Navarro et al., 2008). Les DELLA modulent négativement la signalisation conduisant à l'induction de l'HR, car les mutants déficients pour plusieurs DELLA exhibent sur toutes les feuilles des symptômes de micro-HR en réponse à la présence d'un pathogène, ce qui n'est pas observé sur les feuilles des plantes témoins.

Deux gènes codant des protéines kinases (*PK6* et *PK7*) ont été inclus dans l'analyse. En effet, bien qu'il n'y ait de données précises sur le rôle de leurs homologues chez *Ricinus communis* et *Arabidopsis thaliana* (Tableau 1.2) dans des interactions avec des agents pathogènes, elles ont déjà été retrouvées induites chez le Pommier par *Ea* et plus particulièrement chez le génotype sensible MM106 (Pontais, 2006).

#### *II.1.2.e) Le contrôle de la mort cellulaire*

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique important dans le développement (par exemple la formation du xylème ou bien d'aérenchymes) mais aussi dans la résistance aux agents pathogènes lorsque la réaction d'hypersensibilité s'exprime en situation incompatible (Lam, 2004). La pérennité des plantes exige que ce processus soit finement contrôlé, ce qui est assuré par un équilibre entre des signaux vitaux et d'autres promouvant la mort. Il s'avère que les hormones impliquées dans les processus de défense,

dont les voies associées ont été décrites dans les paragraphes précédents, jouent également un rôle dans le contrôle de la mort cellulaire. Initialement, ce sont les FAO et le NO, qui sont impliqués le plus souvent, dans l'induction de la mort cellulaire, et ils agissent plus en molécules signal que par une action directe sur la cellule (Overmyer et al., 2003). Toutefois, lorsque la production de ces FAO est trop importante et qu'ils provoquent des dégâts cellulaires (par peroxydation des lipides par exemple), il se produit une nécrose (Van Breusegem et Dat, 2006). Le mécanisme fonctionnel de la mort cellulaire n'est pas totalement élucidé chez les plantes et prend modèle en partie sur les modèles animaux (Hofius et al., 2007). La mort cellulaire est potentiellement régulée par beaucoup de signaux hormonaux, lipidiques, mitochondriaux et chloroplastiques et fait également intervenir des métacaspases, homologues des cystéines protéinases (caspases) animales, et les facteurs de type Bcl-2 (Hofius et al., 2007).

L'acide salicylique, à forte concentration, stimule la production de ROS et induit la mort cellulaire et c'est en partie de cette manière que la HR s'exprime en réponse à un pathogène reconnu par ses produits de gènes d'avirulence (Overmyer et al., 2003). Comme décrit précédemment, le NO s'accumule de manière précoce suite à ce type de reconnaissance. Il a été rapporté que le NO joue lui aussi un rôle dans l'induction de la mort cellulaire, en synergie avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vraisemblablement en parallèle de régulation d'activité enzymatique par S-nitrosylation (Leitner et al., 2009). Cependant, l'intervention du NO dans la régulation de la mort cellulaire n'est pas encore complètement élucidée. Les gènes *EDS1* et *PAD4*, sont nécessaires à l'expression de la HR, de manière SA-indépendante, ce qui suggère que le métabolisme des lipides joue un rôle dans la régulation de la mort cellulaire. A ce titre, les mutants *ssi2* d'*Arabidopsis*, affectés dans un gène codant une stéaroyl-ACP désaturase plastidiale, sont déficients en acides gras insaturés de type 18:1, ont une croissance réduite, expriment PR-1 de manière constitutive et expriment la HR de manière spontanée (Shah et al., 2001). Il s'avère de plus que le SA et *EDS1* agissent de manière partiellement redondante dans ce processus, bien que le mécanisme sous-jacent ne soit pas encore connu (Venugopal et al., 2009).

L'acide jasmonique participe à la régulation de la mort cellulaire, mais différemment selon le stress impliqué : le JA réprime la mort cellulaire dans le cas de la réponse à l'ozone mais il est nécessaire à son induction en réponse à une toxine fongique, la fumonisine B1 (Lam, 2004). Overmyer et al. (2003) propose un modèle du mécanisme associé à la mort cellulaire provoquée par l'ozone, dans lequel l'acide jasmonique agit comme un régulateur

négatif de la propagation de la mort par inhibition des voies SA et ET, ainsi que de la production de FAO.

L'éthylène est un régulateur positif de la mort cellulaire qui intervient dans les processus développementaux, tels que le développement de racines adventives dans le riz en réponse à une immersion des tiges (Steffens et Sauter, 2009), et la sénescence. De plus, l'éthylène est nécessaire à l'expression des nécroses lors des interactions compatibles entre *Arabidopsis* et les différentes bactéries phytopathogènes *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, toutes biotrophes (Bent et al., 1992 ; Cohn et Martin, 2005). Les mutants *ein2* d'*Arabidopsis* expriment beaucoup moins de symptômes au cours de l'infection par ces agents pathogènes, même si le développement de ces derniers est similaire sur plantes sauvages et les mutants. La mutation *ein2* confère donc dans ce cas une tolérance à ces pathogènes. Cependant, elle ne compromet pas la résistance exprimée lors des interactions incompatibles (Bent et al., 1992).

### II.1.3. Autres gènes impliqués dans les interactions plante-microorganisme

#### II.1.3.a) La photosynthèse

Une diminution de l'activité photosynthétique très localisée est généralement rapportée au cours des interactions plante-bactérie/champignon, aussi bien compatibles qu'incompatibles, bien que cette altération soit plus précoce dans les situations de résistance (Berger et al., 2007). De plus cette observation a été faite aussi bien pour des agents pathogènes biotrophes que nécrotrophes. Toutefois, dans certains pathosystèmes, tels que *Pseudomonas syringae* pv. *glycinae* sur soja (Zou et al., 2005), les gènes codant des protéines impliquées dans la photosynthèse (type plastocyanine A et une protéine du photosystème II) sont réprimés au cours de la HR, accompagnant la diminution de l'activité photosynthétique. L'hypothèse par rapport à cette répression de la photosynthèse repose sur la conversion du statut de la feuille de source en puits, de manière à stimuler l'apport d'assimilats au site d'infection et alimenter les besoins énergétiques pour l'expression des défenses (Berger et al., 2007 ; Bolton, 2009). Toutefois, ceci pourrait être contradictoire vis-

à-vis de la résistance, car un enrichissement du tissu infecté en substrats carbonés serait plutôt favorable au développement et à la multiplication des agents pathogènes.

Les gènes codant une protéine de liaison à la chlorophylle a/b (*CBP*) et la cytochrome b6 réductase (*CYTB6*) ont été choisis pour étudier la modulation de la photosynthèse chez le Pommier infecté par *Ea*.

### *II.1.3.b) Les sucres*

Les variations de l'activité photosynthétique décrites précédemment influent très certainement sur le métabolisme des sucres. Les assimilats présents dans la feuille font probablement l'objet d'une compétition entre les besoins de la plante et ceux du pathogène. Ce dernier doit réussir à détourner ce flux énergétique, d'une manière ou d'une autre, pour assurer son développement.

Les expressions de transporteurs de sorbitol (*SOT*), qui est la principale forme de transport chez *Malus* (Suleman et Steiner, 1994 ; Reidel et al., 2009) et de sucrose (*SUT*) ont été étudiés au cours de l'interaction, ainsi que celle d'un gène codant une ATP:citrate lyase (*ACL*), qui alimente le métabolisme en acétyl-CoA, principal précurseur des voies de synthèse de la plante.

L'ensemble des gènes qui seront suivis dans les feuilles de Pommier au cours de l'infection par *Ea*, ainsi que le réseau qu'ils constituent est présenté dans la figure I.16.

## **II.2. Résultats : Expression des gènes candidats au cours de l'interaction entre *Ea* et Everest/MM106**

L'expression des 49 gènes d'intérêt décrits précédemment et listés dans le tableau I.2. a été suivie par qPCR, 6, 24 et 48 hpi de la souche sauvage CBFP1430 (virulent), du mutant de sécrétion de type III PMV6023 (avirulent) et d'eau dans les feuilles d'Evereste et de MM106. L'expérimentation a été reproduite sur 4 répétitions biologiques indépendantes afin d'obtenir les réponses les plus significatives possibles.

## II.2.1. Exploitation des résultats

Les données de qPCR peuvent être traitées de différentes manières lorsque plusieurs génotypes sont comparés : soit les niveaux d'expression de chacun des gènes, pour l'ensemble des échantillons et indépendamment du génotype, sont rapportés à un échantillon calibrateur unique choisi arbitrairement (par exemple, le niveau d'expression dans un des deux génotypes non infectés), soit les niveaux d'expression de chacun des gènes dans un génotype donné sont rapportés au calibrateur de ce même génotype. Dans le premier cas, les quantités de transcrits d'un gène donné pourront être comparées entre tous les échantillons, indépendamment du génotype (Fig.I.17.B) de manière à établir qu'un gène G est plus exprimé dans une condition x que dans une condition y (comparaisons possibles entre génotypes). Dans le second cas, c'est l'effet d'un traitement, au sein d'un génotype, sur les modulations d'expression de gènes (« sens de variation », induction ou répression) par rapport au niveau constitutif de ce génotype qui peut être évalué (Fig.I.17.C). Par cette méthode de traitement, il est possible de décrire que le gène G est induit chez le génotype a par rapport à son niveau constitutif dans la condition x, tandis que ce même gène G est réprimé chez le génotype b, par rapport à son niveau constitutif et pour la même condition x. En traitant les données de ces deux manières, plusieurs informations sont regroupées pour déterminer, par exemple, qu'un gène G est plus exprimé dans la condition y chez le génotype a que chez le génotype b, mais G est induit par la bactérie chez a tandis qu'il est réprimé chez b.

Par conséquent, la stratégie suivante a été utilisée pour exploiter les résultats et rendre compte des différences les plus significatives : (i) calibration des données par rapport à une même valeur, celle de l'expression constitutive dans Everest, (ii) examen global des données, (iii) sélection des gènes présentant des niveaux finaux d'expression différents entre les deux génotypes, basée sur un test de comparaison de médianes, (iv) évaluation du sens de variation de la modulation dans chaque génotype par rapport à sa valeur constitutive. De cette manière, les deux informations principales, c'est-à-dire sens de modulation par rapport aux niveaux constitutifs propres à chaque génotype et niveau d'expression par rapport à un même niveau constitutif, devraient pouvoir être intégrées.

## II.2. 2. Analyse globale des résultats

La figure 1.18.A reprend l'expression de chaque gène dans chacune des conditions décrites ci-dessus et pour chaque répétition. Les expressions relatives ont été calculées comme décrit dans le matériel et méthodes, en utilisant dans un premier temps la valeur d'Evereste constitutif comme calibrateur, permettant ainsi de comparer l'ensemble des valeurs sur une même base (cf paragraphe précédent). La figure 1.18.A. donne une idée des modulations qui peuvent se produire au cours de l'interaction et montre qu'elles ne concernent que quelques gènes sur les 49 étudiés. Beaucoup d'entre eux semblent en effet rester assez stables quel que soit le traitement, leur modulation reflétant probablement le stress d'infiltration. En revanche, certains gènes subissent une importante modulation et notamment de fortes inductions en réponse à l'infection par la souche sauvage, et ce, dès 6 hpi. De plus, les gènes fortement induits dans un génotype ne sont pas forcément les mêmes dans l'autre (exemple du gène symbolisé par des courbes de couleur rose chez Evereste).

Concernant la reproductibilité de ces réponses, l'analyse en composantes principales des données montre clairement qu'elle est satisfaisante et sur l'ensemble, la représentation de la variabilité est bonne sur le plan F1-F2 (près de 50%; fig.1.18.B). En effet, bien que les 4 répétitions biologiques proviennent de 4 séries différentes de greffes et que les plantes sont cultivées en serre, les 4 séries de valeurs obtenues sont assez bien groupées et les intervalles de confiance paraissent acceptables (de plus, une analyse boîte-à-moustaches, montre qu'il n'y a pas de points aberrants, en utilisant comme limite 1,5 fois les valeurs du premier et du troisième quartile ; résultat non montré). Cette analyse permet en outre de mettre en évidence les effets de l'infection par la souche sauvage (*Ea wt*) : les points correspondant à ces conditions sont groupés et fortement séparés par l'axe 1 des deux autres conditions (eau et *Ea t3ss*). Les traitements par le mutant de sécrétion et par l'eau sont par ailleurs très semblables et provoquent peu de modulations, qui sont davantage liées au stress que provoque l'infiltration sous vide. Même si les deux génotypes de Pommier, Evereste et MM106, ne forment pas deux groupes bien dissociés, signifiant qu'ils répondent de manière similaire à la bactérie, ils ne sont pas totalement superposés et les niveaux constitutifs sont assez différents. Il a été montré cependant que l'ACP, bien que très adaptée à la visualisation des données, ne constitue pas une méthode de groupage robuste dans la constitution de groupes par des calculs de groupage (Yeung et Ruzzo, 2001) ; les groupes observés sur l'ACP

présentée Fig.I.18.B ne sont peut être pas très dissociés mais ils restent tout de même informatifs et *a priori* l'information est suffisante ici pour n'utiliser que les composantes F1 et F2. Les gènes (variables) qui permettent de construire le plan de projection, forment deux clusters non opposés, qui correspondent d'une part aux gènes fortement induits et d'autre part aux gènes non modulés ou réprimés par la souche sauvage d'*Ea*. L'utilisation d'autres composantes principales (F3, F4, F5 et F6 ; résultats non montrés) comme recommandé par Yeung et Ruzzo (2001) ne permet pas de séparer d'autres clusters. L'approche ACP permet en revanche d'indiquer que les gènes marqueurs des voies de l'acide salicylique (en violet sur l'ACP Fig.I.18.) et de l'acide jasmonique (en orange sur l'ACP) ne se comportent pas de la même manière en réponse à la souche sauvage d'*Ea*.

### II.2.3. Comparaison des niveaux d'expression des gènes entre les deux génotypes

Cette étape a pour objectif de déterminer quels sont les gènes qui, au cours de l'interaction, sont exprimés de façon différente entre génotypes. Pour cela, les données sont calibrées, comme décrit ci-dessus, sur la valeur du niveau constitutif d'Evereste. Dans un premier temps, les données sont analysées dans leur ensemble pour décrire les principales modulations au cours de l'interaction. Dans un second temps, les niveaux d'expressions sont comparés systématiquement afin d'évaluer les gènes ayant des niveaux d'expression significativement différents entre les deux génotypes.

Le groupage hiérarchique des gènes selon leur expression dans les feuilles infectées d'Evereste et de MM106 par *Ea* wt met en lumière des phénomènes probables de corégulation entre des gènes impliqués dans un même processus (Fig.I.19.). En effet, une majorité de gènes marqueurs potentiels de la voie de l'acide salicylique sont fortement induits et semblent corégulés (*EDS1*, *PR1*, *WRKY TF*, *PR2*, *PR5*), tandis que les principaux marqueurs de la voie de l'acide jasmonique sont présents dans un autre cluster de gènes, faiblement modulés (*LOX2*, *COI1*, *JMT*). De plus, ces résultats montrent que les voies des phénylpropanoïdes (*CAH*, *CHS*, *ANS2*) et des isoprénoïdes (*HMGR*, *LIM*, *FPPS*) sont vraisemblablement régulées par l'acide jasmonique et l'acide salicylique respectivement, car les gènes codant des enzymes de biosynthèse de ces voies du métabolisme secondaire sont présents dans les mêmes clusters que ces voies de signalisation (Fig.1.19.). Pour la suite, la

voie des phénylpropanoïdes sera donc considérée comme un marqueur de la voie JA, et la voie des isoprénoïdes comme un marqueur de la voie SA.

Les différents gènes étudiés ici ne sont pas tous présents constitutivement au même niveau dans les deux génotypes. En effet, comme montré dans la Fig.I.20.A., il apparaît que beaucoup de ces gènes (plus de 30) sont exprimés constitutivement plus fortement chez MM106 (ronds verts) que chez Evereste (qui correspond à la ligne de base sur laquelle les données ont été calibrées). Cette différence n'est pas négligeable puisque en moyenne les gènes chez MM106 sont exprimés presque 15 fois plus que chez Evereste ( $2^4$ ). Aucun gène de défense étudié ici (type PR-protéine ou métabolisme II) n'est exprimé plus fortement chez Evereste au niveau constitutif. Suite à l'infiltration par l'eau, beaucoup de gènes subissent une légère induction, vraisemblablement provoquée par le stress mécanique qu'engendre cette méthode d'inoculation. Cette induction concerne, pour partie, des gènes codant des PR-protéines (*PR1*, *PR2*, *PR5*) mais aussi des gènes codant des enzymes de biosynthèse du métabolisme secondaire (*HMGR*, *PAL*, *ALLII*).

Après soustraction des valeurs d'expression obtenues avec l'eau à celles obtenues avec le mutant de sécrétion, les valeurs pour cette dernière condition sont presque égales à 0 pour l'ensemble des gènes (Fig.I.20.B). Ceci indique que les réponses observées pour le mutant *t3ss* ne sont pratiquement que liées aux effets de l'infiltration sous vide. Par conséquent, une donnée importante est que la bactérie n'est reconnue ou n'est capable d'induire une réponse chez son hôte que par ses effecteurs de type III.

Les niveaux d'expression en réponse à la souche sauvage d'*Ea* ont ensuite été comparés entre les deux génotypes, pour chaque temps de prélèvement, permettant de dresser une liste de gènes candidats, présentée dans la figure I.20.C, potentiellement marqueurs des deux interactions. La sélection a été réalisée par comparaison des intervalles de confiance de la médiane, pour conclure sur la signification statistique des différences à 95%. Un gène n'a été retenu que s'il est statistiquement différent entre les deux génotypes à au moins un temps. Ces différents gènes, au nombre de 25, ont ensuite été classés par groupage hiérarchique (Fig.I.20.C). La vue d'ensemble est tout à fait comparable avec le profil ACP du plan de projection F1-F2, c'est-à-dire que globalement les réponses sont qualitativement très similaires entre les deux génotypes (le nombre de gènes différenciellement exprimés entre les deux génotypes reste faible à 6 et 24 hpi). Cependant, un examen plus approfondi montre des différences importantes de niveaux d'expression relatives 48h après infiltration par la souche sauvage. C'est d'ailleurs à ce temps qu'il y a le

plus grand nombre de gènes dont les niveaux d'expression sont significativement différents entre les deux génotypes et beaucoup plus de gènes sont plus fortement exprimés chez MM106 que chez Evereste (Fig.I.20.C). Au temps 6 h, seuls les gènes *CHS*, *PPO* et *EIN3* sont plus exprimés chez Evereste que chez MM106. Ceci suggère que la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est sollicitée très rapidement chez Evereste. Plusieurs gènes marqueurs de la voie JA (*PLD1*, *LOX2*, *JMT*) sont plus exprimés chez Evereste après 48 h que chez MM106, tandis que c'est l'inverse pour la voie SA, majoritairement plus exprimée chez MM106 (*EDS1*, *PR1*, *PR4*, *PR5*, *HMGR*, *LIM*). Les deux voies de signalisation SA et JA semblent donc différenciellement modulées au cours de l'interaction avec *Ea*, tout du moins avec des intensités différentes, avec la voie SA fortement exprimée chez MM106 et la voie JA plus fortement chez Evereste.

#### II.2.4. Modulation des expressions de gènes après infection dans chaque génotype.

Les données d'expression pour le génotype de MM106 ont été extraites du précédent jeu de données (calibrés par Evereste constitutif), puis calibrées par rapport à la valeur du niveau constitutif de ce génotype ( $\log_2(\text{exp}_{\text{ech1-gène1}}) - \log(\text{exp}_{\text{cal-gène1}})$ , avec  $\text{exp}$ =niveau d'expression,  $\text{ech1}$ , échantillon 1,  $\text{cal}$ , calibrateur (MM106 constitutif)). L'effet de l'infiltration indiqué par le traitement eau a été soustrait dans les deux génotypes, de manière à ne tenir compte que des effets spécifiques à la souche sauvage d'*Ea*. La comparaison ne porte alors plus sur les différences entre génotypes, mais plutôt sur le sens de variation de la modulation exercée par la souche sauvage au sein d'un même génotype. Une liste de gènes modulés significativement par la souche sauvage par rapport au niveau constitutif et au mutant de sécrétion, à chaque temps et pour chaque génotype, a ainsi pu être établie. Au total, 38 gènes sont exprimés de manière statistiquement différente par rapport au niveau constitutif, dans au moins un génotype et à un temps donné (Fig.I.21.A). Le nombre de gènes significativement modulés chez Evereste par rapport à son niveau constitutif diminue avec le temps (25, 9, 7 aux temps respectifs 6, 24 et 48 hpi *Ea* wt) tandis que chez MM106 ce nombre reste stable et élevé (22, 27 et 24 pour les mêmes temps). Ainsi, la présence de la bactérie influe très précocement et fortement sur la physiologie d'Evereste, alors que sur MM106 les effets se prolongent dans le temps.

Dans l'ensemble, quatre grands groupes de gènes sont retrouvés, classés en fonction du degré de modulation par rapport au niveau constitutif de chacun des génotypes (Fig.1.21.C). Le groupe 1 comprend des gènes très fortement induits par la bactérie et le groupe 4, à l'inverse, des gènes très réprimés. Les deux autres groupes sont intermédiaires, le groupe 2 étant constitué de gènes plus faiblement induits et le groupe 3, des gènes très peu modulés. Ces groupes sont tout à fait superposables avec ceux présentés dans la figure 1.19. D'un point de vue général, et renforçant les points abordés ci-dessus, peu de différences de comportement existent entre Evereste et MM106, bien que dans les groupes 1 et 4, les modulations à 48h chez Evereste sont très atténuées. Encore une fois, la présence de la bactérie chez le génotype sensible s'accompagne d'une réponse soutenue et durable, alors qu'elle apparaît plutôt transitoire dans le génotype résistant. Dans le groupe 3, des répressions plus fortes chez MM106 sont également visibles. Cependant, ce groupe ne peut pour l'instant pas être rattaché à une des voies de signalisation étudiées ici car le profil d'expression des gènes inclus dans ce groupement ne présente pas de co-régulation directe avec les marqueurs de ces voies.

#### *II.2.4.a) Les gènes induits*

La synthèse des isoprénoïdes est fortement sollicitée dans les deux génotypes, et seule l'expression du gène *HMGR*, codant une enzyme impliquée en amont dans la voie de biosynthèse de ces composés, est différentielle entre les deux génotypes (plus exprimé chez Evereste au temps 6h). L'induction stable de cette voie (à tous les temps après infiltration), non spécifique de la résistance ou de la sensibilité, accompagne celle de la voie de signalisation de l'acide salicylique, qui est observée dans les deux génotypes. Les gènes de PR-protéines connus pour répondre à cette hormone (*PR-1*, *PR-2*, *PR-5*), sont globalement très induits, quel que soit le génotype. L'induction semble plus intense et durable chez MM106 (Fig.1.21.A et B). Ainsi ce lot de défenses ne serait pas désavantageux pour la bactérie, car elles sont fortement induites dans le génotype sensible. L'expression des gènes de transporteurs de sorbitol, *SOT1* et *SOT3*, sont induits fortement 24 h et 48 h après infiltration chez MM106, alors que *SOT1* et *SOT4* sont plus induits chez Evereste 6h après infiltration. Il est tout à fait possible que par la manipulation des transporteurs de sorbitol, la bactérie puisse assurer l'enrichissement des espaces intercellulaires en nutriments, bien que

le sens de transport de *SOT1* et *SOT3* ne soient pas établis. A l'inverse, il se pourrait que la plante résistante cherche à appauvrir les tissus proches du site d'infection par translocation des substrats nutritifs dans le reste de la plante. Dans tous les cas, l'infection par *Ea* s'accompagne donc très certainement d'une altération du métabolisme des sucres.

Les gènes *GST* et *PPO* présents dans l'étude semblent plutôt sous le contrôle de l'acide salicylique, ce qui est généralement rapporté dans la littérature pour le premier (Blanco et al., 2009), alors que pour le second, le rôle de l'acide jasmonique est plus fréquemment évoqué (Constabel et Ryan, 1998). Ils ne constituent pas un marqueur spécifique de la sensibilité ni de la résistance. L'induction de la *GST* était prévisible, étant donné les résultats acquis précédemment sur l'induction d'un choc oxydant au cours de l'interaction (Venisse et al., 2002). Quant à *PPO*, ce gène reste induit très fortement chez MM106 à 48 hpi, mais son rôle précis reste à être déterminé. Il se pourrait que son induction témoigne, à l'image des PR-protéines également induites, d'une tentative de la plante de mobiliser un maximum de défenses contre la bactérie, mais sans efficacité apparente.

Il est aussi intéressant de noter que la synthèse d'éthylène est activée dans les deux génotypes, mais avec une cinétique très différente (précoce et transitoire chez Everest, soutenue chez MM106). L'induction d'*EIN3* suit également cette tendance.

#### *II.2.4.b) Les gènes réprimés*

Alors que les répressions de gènes chez Everest sont très rares et observées uniquement au temps 6h après infection, près de 15 gènes sont fortement réprimés chez MM106 48h après infection, parmi lesquels 8 sont des marqueurs potentiels de la voie JA (*LOX2*, *JAR1*, *JMT*, *DEF*, *LTP*, *CAH*, *CHS*, *ANS2* ; Fig.1.21.A.). Chez Everest, les répressions observées concernent des gènes de la voie JA (*LOX2*, *JAR1* et *JMT*) ainsi que de la voie des phénylpropanoïdes (*CAH* et *ANS2*), mais ne sont que transitoires. Le blocage prolongé de la voie de l'acide jasmonique est donc *a priori* très fort chez MM106 et pourrait constituer un facteur de sensibilité. La répression de la biosynthèse de la voie des phénylpropanoïdes a été précédemment décrite (Venisse et al., 2002), cependant c'est la première fois que la répression de la voie de signalisation de l'acide jasmonique comme mécanisme de répression de défenses du Pommier est rapportée.

Les deux gènes codant des protéines de la photosynthèse étudiés ici ne sont pas modulés chez Evereste par la bactérie, alors qu'ils sont réprimés à partir de 24h chez MM106.

Dans la catégorie de gènes « défenses/renforcement pariétal/stress oxydant », la callose synthase *CALs* et une *LTP* ne sont pas modulés de manière significative par la bactérie chez Evereste, alors qu'ils sont fortement réprimés chez MM106 (Fig.1.21.A.). Les dépôts de callose sont donc très intéressants à ce niveau, car leur répression pourrait être une des cibles de DspA/E pour faciliter l'infection (M.-A. Barny, com. pers. ; DebRoy et al., 2004). La *LTP*, correspondant à l'allergène Mal d3, pourrait aussi participer à la résistance, par une activité antibactérienne directe ou une activité de signalisation (de Oliveira Carvalho et Gomes, 2007).

## II.2.5. Bilan

Considérés dans leur ensemble, ces données montrent que le comportement général des principales voies de signalisation de défenses diffère entre les deux génotypes au cours de l'interaction avec *Ea* (Fig.I.22). Dans un premier temps, le suivi des expressions de gènes a permis de mettre en évidence plusieurs phénomènes de co-régulations entre gènes d'une voie de signalisation et gènes de défense : la voie des isoprénoïdes a pu être rattachée à la voie de signalisation de l'acide salicylique, tandis que la voie des phénylpropanoïdes semble plutôt dépendre de celle de l'acide jasmonique (Fig.I.19). Ces modulations sont similaires à celles décrites lors de l'infection d'*Arabidopsis* par *Ea* (Degrave et al., 2008) : induction de la voie SA (*PAD4*, *EDS5*, *PR-1*), et non-induction de la voie JA (*PDF1.2*), ce qui indique qu'il y a des similarités entre les réponses du Pommier et celle d'*Arabidopsis* au cours de l'infection par *Ea*. La régulation des différents gènes codant des transporteurs de sucres se fait de manière spécifique, puisque certains sont plutôt co-régulés avec les marqueurs de la voie de l'éthylène (*SUT1.2*, *SOT2*, *SOT4* et *SOT5*) et d'autres avec les marqueurs de la voie de l'acide salicylique (*SOT1* et *SOT3*). Concernant *SUT1.3*, il semble davantage sous le contrôle de la voie de signalisation de l'acide jasmonique, comme les gènes codant des protéines de la photosynthèse (*CBP* et *CYTB6*). Ces résultats permettent donc d'établir un réseau de défense chez le Pommier, intégrant quelques gènes de défense dont l'expression est sous le contrôle des trois phytohormones SA, JA et ET, (Fig.I.22). Le traitement des données de PCR

quantitative a apporté plusieurs informations, à savoir le niveau d'expression des gènes dans chacune des conditions et le sens de leur modulation. De cette manière, il apparaît que l'interaction devient vraiment différentielle au niveau moléculaire 48 h après infiltration. En effet à ce temps, beaucoup de gènes sont différentiellement exprimés entre les deux génotypes (Fig.I.20.C), et cette différence vient essentiellement du fait que les modulations chez Everest ont tendance à diminuer en intensité (les gènes « retrouvent » leur niveau constitutif) alors qu'au contraire chez MM106, les marqueurs de la voie de l'acide salicylique sont très induits, tandis que ceux de la voie de l'acide jasmonique sont très réprimés (Fig.I.21.A). Concernant, l'éthylène, il semble que sa production soit plus forte chez MM106, ce qui pourrait avoir pour conséquence l'activation de la voie de signalisation située en aval. Toutefois, le manque de marqueurs pour cette voie ne permet pas de conclure définitivement. Il est quand même intéressant de noter que cette hormone semble jouer un rôle important dans la régulation du transport des sucres, puisque plusieurs gènes de transporteurs ont été associés à cette voie.

### **II.3. Approfondissements**

Les deux études présentées ci-après apportent des résultats préliminaires sur les profils d'expression de quelques gènes-clé de manière tissu-spécifique ainsi que quelques résultats obtenus dans le cadre du projet CoSaVe (Construction et Santé du Végétal, financement régional) sur l'étude de petites protéines de défense.

#### **II.3.1. Comparaison des réponses moléculaires entre limbe et nervure**

Bien que certaines différences, décrites ci-dessus, permettent de mieux caractériser l'interaction, aucun gène en particulier ne semble responsable de la résistance d'Evereste, ou au contraire de la sensibilité de MM106. En particulier, une induction très forte d'un ou plusieurs gènes de défense chez Everest aurait pu être attendue. Etant donné que les différents suivis d'expression de gènes présentés dans la partie précédente ont été obtenus sur des ARN extraits de feuilles entières après leur infiltration, il se pourrait que certaines défenses, induites très localement, soient passées inaperçues dans la première analyse, par

un effet de dilution de ces réponses. Effectivement, lorsque les feuilles sont inoculées par coupure avec des ciseaux préalablement plongés dans une suspension d'*Ea*, le développement des symptômes chez MM106 se fait essentiellement le long de la nervure principale (Fig.I.23.A), alors qu'il n'y a pas de symptômes visibles chez Everest (en dehors de la blessure). De la même manière, par infiltration, des symptômes vont apparaître sur les nervures de feuilles infectées de MM106 au cours du temps, tandis que les nécroses observées sur le limbe d'Everest restent confinées à cet endroit (Fig.I.2.). Le passage de la bactérie du limbe vers la nervure et sa progression dans les tissus constituant la nervure pourraient donc être contrôlés chez Everest par une défense très localisée de type barrière physique (renforcement pariétal de quelques cellules) et/ou chimique (production de phytoalexines), qui serait absente chez MM106. En étudiant les expressions de gènes dans l'ensemble de la feuille, il se peut que cette défense très localisée n'ait pas été identifiée comme significative. De plus, l'analyse histologique présentée dans la partie I de ce chapitre a montré qu'il pouvait y avoir des phénomènes localisés de renforcement pariétaux dans la nervure. Par conséquent, il a été entrepris d'infiltrer des feuilles de MM106 et d'Everest par de l'eau ou la souche sauvage d'*Ea*, puis d'effectuer des prélèvements aux temps 6, 24 et 48 h après infiltration, en séparant à chaque fois le limbe et la nervure centrale (Fig.I.23.A).

Quelques gènes ont été suivis dans ces échantillons, et leur niveau d'expression, par rapport au niveau constitutif du limbe d'Everest, est présenté dans la figure I.23.B. Le gène *ACCO* a été retenu comme marqueur de la voie de l'éthylène, les gènes *PR1* et *HMGR*, comme marqueurs de la voie de l'acide salicylique et *LOX2*, *JMT*, *CAH* et *CHS* comme marqueurs de la voie de l'acide jasmonique. Dans l'ensemble les tendances décrites pour l'analyse sur feuille entière sont retrouvées, puisque la voie de signalisation de l'acide jasmonique est plus réprimée chez MM106 que chez Everest, tandis que celle de l'acide salicylique est plus fortement induite chez MM106. Ces différences sont surtout visibles au temps 48 h. Etant donnée la faiblesse des réponses à 6 h chez Everest, il se peut qu'il y ait eu un problème soit dans l'infiltration soit dans l'état physiologique des plantes, et ceci a probablement déclenché un léger décalage dans la cinétique des réponses, par rapport à l'étude sur feuille entière.

Le principal résultat de cette étude, bien qu'il soit à valider avec une autre répétition biologique, est la très forte similarité des réponses entre limbe et nervure pour les gènes étudiés ici. Le groupage hiérarchique rassemble les réponses du limbe et de la nervure dans chaque condition (Fig.I.23.B). Les principaux marqueurs de chaque voie (*ACCO*, *PR-1* et *LOX2*)

sont exprimés à des niveaux similaires entre les deux tissus, suggérant que l'ensemble de ces voies n'est pas modulé différemment entre le limbe et la nervure. Ces données valident donc l'analyse sur feuille entière puisqu'*a priori*, il n'y a pas d'effet de dilution sur les gènes étudiés. Toutefois, l'étude mériterait par la suite d'être approfondie avec le suivi d'autres gènes de défense, pour confirmer totalement ce résultat.

### **II.3.2. LTP15 est très fortement induit chez Evereste au cours de l'interaction**

Une partie du projet CoSaVe avait pour objectif le clonage et la caractérisation chez le Pommier de petites protéines de défense, telles que les LTP et les défensines. Ces protéines sont intéressantes dans l'interaction avec *Ea*, car potentiellement antibactériennes. Un seul représentant de ces deux familles était jusqu'à présent suivi dans les analyses moléculaires, et tous les deux se montraient réprimés par la bactérie dans les deux génotypes. Afin d'explorer un plus grand nombre de représentants, un clonage de défensines et de LTP a été entrepris chez les génotypes Evereste et MM106, pour obtenir le plus de séquences possibles codant ces protéines et pour pouvoir ensuite suivre leur expression au cours de l'interaction. Trois LTP ont pu être clonées dans leur intégralité, dont *LTP15* qui présente une homologie avec une LTP de *Pisum sativum* (AAF61436.1, 59% d'identité en tBlastx,  $e\text{-value}=3 \times 10^{-28}$ ). Les principales caractéristiques de la séquence protéique prédite de *LTP15* sont présentées dans la figure I.24.A. La comparaison avec d'autres séquences protéiques révèle que les 8 cystéines caractéristiques impliquées dans des ponts disulfures sont conservées, ainsi qu'un certain nombre d'autres motifs, notamment impliqués dans le site actif des LTP formant une cavité hydrophobe (de Oliveira Cavalho et Gomes, 2007). *LTP15* est *a priori* une LTP de type I car elle présente le plus de ressemblances avec les LTP de cette famille. Un deuxième séquençage du transcrit dans son ensemble sera nécessaire pour confirmer la séquence et vérifier que les différences dans les motifs ne sont pas liées à des erreurs lors du premier séquençage.

L'expression de *LTP15*, ainsi que celle des deux autres LTP dont les ARNm ont été clonés intégralement *LTP2* et *LTP3*, ont été suivies dans des feuilles d'Evereste et de MM106 infiltrées par la bactérie (Fig.I.24.B). Une autre LTP, dont seule l'extrémité 3' a été obtenue, a été incluse, il s'agit de *LTP16*. Il s'avère que le gène codant *LTP15* est très rapidement et fortement induit chez Evereste, de manière durable, par la bactérie. L'infiltration par de

l'eau provoque également un effet non négligeable sur son expression, ce qui suggère qu'il répond rapidement en cas de stress. Il n'y a pas de différence d'expression constitutive entre les deux génotypes. En revanche, chez MM106, ce gène est également induit, mais bien moins fortement que chez Evereste (près de 16 fois moins). Avec la forte prédiction d'être adressée dans les espaces extracellulaires (WoLF Psort Prediction, <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>), *LTP15* est tout particulièrement intéressant puisqu'il pourrait être un bon candidat pour la résistance d'Evereste, qu'il agisse dans les voies de signalisation ou bien comme défense directe contre *Ea*. Concernant les autres LTP, *LTP3* n'est pas modulée chez Evereste, tandis qu'elle est réprimée chez MM106. Les deux autres LTP sont exprimées à un niveau constitutif élevé chez MM106 (*LTP2* et *LTP16*, exprimées 16 et 8 fois plus constitutivement que chez Evereste). Au cours de l'interaction, elles sont très réprimées chez MM106 et sont induites chez Evereste, et leur niveau d'expression chez ce dernier à partir de 24 h après infiltration semble être plus élevé que chez MM106. L'étude des LTP révèle donc une importante diversité des comportements au cours de l'interaction, *LTP15* constituant un bon marqueur pour la résistance. A l'opposé, la forte répression des 3 autres LTP chez MM106, à des niveaux d'expression plus bas que ceux observés chez Evereste, pourrait constituer des facteurs de sensibilité. Concernant *LTP2* et *LTP16*, leur forte expression constitutive chez le génotype sensible est plutôt en défaveur de leur implication dans la résistance à *Ea*.

### **III. Discussion sur les données histologiques et transcriptionnelles**

Le pathosystème *Ea*-Evereste/MM106 a été utilisé pour tenter de comprendre les mécanismes tissulaires/cellulaires et moléculaires associés à la résistance et la sensibilité. Une seule étude globale et transcriptionnelle a été publiée à ce jour sur l'interaction compatible Pommier-*Ea*. Il s'agit d'un travail récent sur l'interaction *Ea*-Gala Gala, une variété de Pommier très sensible au feu bactérien, réalisée par hybridation suppressive soustractive SSH avec pour objectif de déterminer les variations transcriptomiques associées à la maladie (Norelli et al., 2009). Dans ce système utilisant un inoculum fort ( $10^9$  cfu/mL) déposé par blessure, des modulations ont été observées très rapidement, dans les métabolismes primaire et secondaire, le métabolisme des protéines et la photosynthèse notamment. Cependant beaucoup d'EST obtenus dans cette étude n'ont pas pu être identifiés, faute d'homologie significative avec d'autres séquences déjà connues. Dans le

travail présenté ici, l'étude sur feuille entière est validée par le fait que des résultats sur le suivi d'expression de gènes entre le limbe et la nervure des feuilles infiltrées montrent qu'il n'y a pas de différence de réponse entre ces deux tissus. Bien que le nombre de gènes soit limité, l'étude histologique et transcriptionnelle présentée dans ce chapitre apporte de nouveaux marqueurs potentiels des interactions compatible et incompatible entre *Ea* et le Pommier. Un des résultats principaux de ces deux approches est la ressemblance des réponses entre les deux génotypes, bien que leur phénotype au cours de l'interaction soit très différent (résistance/sensibilité). En effet, au niveau histologique, seules deux différences ont été observées, i.e. l'effondrement du parenchyme lacuneux chez MM106 et les occlusions vasculaires chez Evereste, et au niveau moléculaire, les modulations différentielles entre les deux génotypes sont essentiellement quantitatives.

- *L'expression des principaux gènes des voies de signalisation est fortement modulée au cours de l'interaction*

La figure I.22. illustre que l'infiltration de la bactérie provoque des réponses différentes entre les deux génotypes. Les deux principales différences sont (i) la très forte induction de la voie de signalisation de la voie SA et (ii) la forte répression de celle du JA chez MM106, cette différence étant particulièrement visible 48 h après infiltration. Dans le cas de l'étude de Norelli et al. (2009), seule l'induction de la PR-1 a été observée, comme marqueur de la voie de l'acide salicylique. L'induction d'autres PR-protéines (PR-2 et PR-5) avait déjà été retrouvée dans d'autres études (Venisse et al., 2002 ; Bonasera et al., 2006b). Les présents résultats suggèrent que la répression de la voie de l'acide jasmonique pourrait constituer un facteur de compatibilité dans l'interaction Pommier-*Ea*. Cette répression peut être soit directe soit liée à la forte induction de la voie SA car globalement ces deux voies s'opposent mutuellement (Fig.I.16.). Il serait tout à fait imaginable qu'*Erwinia amylovora* ait la capacité d'induire fortement la voie SA chez ses hôtes sensibles, pour réprimer la voie JA et les défenses qui y sont associées (par exemple la voie des phénylpropanoïdes, des PR-protéines type LTP/défensines). Le pathogène responsable de la moucheture de la tomate, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, utilise une toxine, la coronatine, un analogue structural du JA-Ile, pour induire les défenses JA-dépendantes et provoquer la répression des défenses SA-dépendantes (Uppalapati et al., 2007), suggérant que les bactéries phytopathogènes sont capables de manipuler les systèmes de défenses de leurs hôtes à leur avantage. Au cours de l'interaction avec *Ea*, le schéma inverse semble se produire, même si à l'heure actuelle il n'a

jamais été décrit qu'*Ea* était capable de synthétiser des homologues de l'acide salicylique qui seraient responsables de l'activation de cette voie chez l'hôte. La répression de la voie JA et l'induction de la voie SA ont été également observées dans l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Bemisia tabaci*, un insecte qui s'approvisionne sur les plantes par le phloème (Zarate et al., 2007). En effet, cet insecte est capable d'induire la voie SA pour réprimer la voie JA car les défenses associées à cette dernière lui sont préjudiciables. Ce schéma pourrait être transposable à l'interaction *Ea*-MM106. De plus, l'activation de la voie SA corrèle bien avec le choc oxydant qui est induit par la bactérie au cours de l'interaction. En effet, cette voie de signalisation est en partie dépendante des FAO, ces derniers participant à l'induction de la mort cellulaire (Overmeyer et al., 2003). L'hypothèse du rôle de la répression de la voie JA dans l'établissement de la compatibilité est d'ailleurs renforcée par le fait que le traitement de pommiers sensibles au MeJA leur confère une protection contre *Ea* (Fig.I.25.). Cette observation est très importante car elle suggère que la voie de signalisation de l'acide jasmonique joue un rôle primordial dans le devenir de l'interaction Pommier-*Ea*, et que sa répression par la bactérie peut être un facteur déterminant de la sensibilité.

La répression des gènes de méthyl transférases *JMT* et *SAMT* pourrait avoir son importance dans l'inhibition d'une éventuelle réponse systémique, dont la mise en place nécessiterait les hormones méthylées, MeJA et MeSA. Ce processus serait particulièrement bénéfique pour assurer la progression de la bactérie. En effet, le gène *JMT*, dont le produit catalyse la formation de méthyl-jasmonate, est fortement réprimé chez MM106 à 48 h et son niveau d'expression est significativement plus bas que chez Everest. En comparaison, la synthèse de MeSA en réponse au TMV et à *Pseudomonas syringae pv maculicola* est maximale 48 heures après le début de l'infection chez le tabac (Park et al., 2007). Cependant, l'implication du MeSA dans l'induction systémique de défenses ne semble pas être vérifiée, tout du moins chez *Arabidopsis* (Attaran et al., 2009). Ces auteurs montrent de plus que la méthylation de l'acide salicylique est stimulée par l'acide jasmonique et ce processus est confirmé par les résultats présentés ici puisqu'il semble que *SAMT* soit coréglé avec les gènes de la voie de l'acide jasmonique (cluster 4, Fig.I.21.). Les différences de modulation des voies SA et JA entre les deux génotypes sont encore plus claires en considérant ce mécanisme. Effectivement, à 48h, *SAMT* est très réprimé chez MM106, assurant un maintien du pool de SA présent, probablement alimenté par la voie des phénylpropanoïdes (*PAL* n'étant pas réprimé). De plus, les données histologiques montrent

que MM106 est capable de mettre en place plusieurs modifications structurales, telles que le renforcement des parois des vaisseaux du xylème, des cellules du sclérenchyme (Fig.I.8.). Bien qu'*a priori* non suffisante pour arrêter la progression du pathogène, l'activation précoce de ces défenses par un signal systémique pourrait être défavorable pour la bactérie.

La forte et rapide induction du gène *WRKY*, homologue à *WRKY30*, appuie l'existence du choc oxydant dans les deux génotypes, dans la mesure où ce gène a été retrouvé induit par un traitement au paraquat, qui provoque la production d'anions superoxydes par blocage de la photosynthèse chez *Arabidopsis* (Scarpeci et al., 2007). Venisse et al. (2002) ont effectivement montré que le choc oxydant est produit aussi bien dans l'interaction avec Everest qu'avec MM106. De plus cette activation est à corrélérer avec la modulation de la voie de signalisation de l'éthylène qui est, au bout de 48 h, induite dans les deux génotypes, mais plus faiblement chez Everest, et ceci de manière significative. Il se pourrait que la perception des FAO induise la synthèse d'éthylène (rapidement puisque le gène *ACCO* est induit dès 6 h chez MM106), qui en retour stimule leur production (Overmyer et al., 2003), favorisant le développement de la nécrose chez MM106. Cette hypothèse est renforcée par les importantes cavités lysogéniques observées 48 h après infiltration dans le parenchyme lacuneux des feuilles infectées de MM106, indiquant que la nécrose se développe vite chez ce génotype (Fig.I.4.G). Le modèle d'Overmyer et al. (2003) est par ailleurs très intéressant, puisqu'il implique les trois hormones SA, JA et ET dans le contrôle de la mort cellulaire. Ce modèle indique que localement, un stress dû à l'ozone provoque une mort cellulaire qui subit une boucle d'autoactivation par les hormones SA et ET, induites par ce stress, et qui stimulent la production de FAO. L'acide jasmonique est synthétisé en réponse à la mort cellulaire et s'accumule dans les cellules voisines, inhibant les voies de l'acide salicylique et de l'éthylène, ce qui bloque la propagation de la mort cellulaire. Une hypothèse intéressante serait que l'induction de la mort cellulaire dans les deux génotypes suit un processus précoce similaire, mais que dans le cas de MM106, la bactérie parvienne à réprimer la voie de l'acide jasmonique pour assurer le développement de la nécrose, *via* les voies de signalisation de l'acide salicylique et de l'éthylène (Fig.I.26.). Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Cohn et Martin (2005) sur l'interaction tomate-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, qui montrent que l'induction T3SS-spécifique de la synthèse d'éthylène participe à l'expression des symptômes sur feuilles. A l'inverse chez Everest, en plus de la présence éventuelle d'antioxydants forts comme supposé précédemment (Fig.I.9.), le maintien de l'activité de la voie JA assurerait le contrôle de la mort cellulaire, ce qui expliquerait

pourquoi les plages lytiques sur les coupes histologiques sont très restreintes. Toutefois, à l'heure actuelle, toutes les données accumulées sur Everest ne permettent pas de comprendre comment la voie JA arrive à être maintenue.

La non-répression des défenses JA-dépendantes dans le génotype résistant pourrait être liée à la perception de DAMPs (Heil, 2009), qui sont connus pour induire de telles défenses. La non-répression résulterait d'un équilibre entre les effets de répression liée à l'action de DspA/E et HrpN et à l'effet promoteur de ces DAMPs libérés par l'endommagement des cellules hôtes. Ceci implique que les cellules d'Evereste soient endommagées au moins similairement à celles de MM106, ce qui semble être le cas, au moins précocement, puisque la peroxydation des lipides a été observée avec la même intensité chez les deux génotypes (Venisse et al., 2002 ; Pontais et al., 2008). La dégradation des membranes liées à la mort cellulaire et au choc oxydant pourrait générer des molécules-signal reconnues chez Everest et permettant une induction de la voie JA. L'hypothèse est que le QTL de résistance contiendrait des récepteurs fonctionnels susceptibles de reconnaître un tel signal, tandis qu'ils seraient absents ou non fonctionnels chez MM106. Le séquençage et l'étude du QTL sont actuellement en cours et devraient apporter des éléments d'information concernant cette hypothèse. Des résultats préliminaires montrent effectivement qu'un certain nombre de gènes codant des récepteurs sont présents dans ce QTL.

#### - *La reprogrammation du métabolisme primaire*

Plusieurs transporteurs de sorbitol (SOT) et de sucrose (SUT) ont été étudiés et quelques modulations intéressantes ressortent. Les transporteurs de sorbitol SOT1, SOT4 et SOT5 sont induits dans les deux génotypes mais sont plus exprimés chez MM106, à 24 h pour le premier et 48 h pour les deux autres. Norelli et al. (2009) ont remarqué que SOT5 était induit précocement dans la variété sensible Gale Gala et constituerait une défense basale destinée à appauvrir les espaces intercellulaires en favorisant la rentrée d'eau et de sorbitol dans les cellules hôtes. Toutefois, le transport du sorbitol se fait majoritairement par voie symplastique, *via* les plasmodesmes (Reidel et al., 2009). Les transporteurs de sorbitol auraient donc davantage un rôle de récupération du sorbitol ayant « fui » dans l'apoplaste, vers le mésophylle ou bien le phloème. Le sens de transport du sorbitol par SOT1, SOT4 et SOT5 reste à déterminer mais leur induction dans le génotype sensible suggère qu'ils sont manipulés par la bactérie, peut-être pour enrichir les espaces intercellulaires. Concernant les transporteurs de sucrose, ils sont plus exprimés chez le génotype résistant, de manière

séquentielle puisque SUT1.3 est plus exprimé 24 h après infiltration et SUT1.2 à 48 h. Ces résultats peuvent être reliés à la sensibilité des feuilles jeunes et la résistance des feuilles matures. Ces dernières expriment une résistance constitutive, probablement ontologique, et sont des organes sources. A l'inverse, les jeunes feuilles, dans lesquelles la photosynthèse n'est pas encore optimale et leur développement étant en cours, sont plutôt des organes puits, vers lesquels les substrats carbonés sont préférentiellement distribués par la plante. L'ensemble de ces résultats suggère que la sensibilité est liée à des modifications du métabolisme des sucres et à la disponibilité en eau et en sorbitol. Par exemple, le passage d'une jeune feuille d'Evereste du statut de puits à statut de source, *via* la reprogrammation des transporteurs de sucres notamment, pourrait être un des facteurs de la résistance.

L'ATP:citrate lyase étudiée ici n'est pas différenciellement exprimée entre les deux génotypes, bien qu'il semble qu'elle soit précocement plus induite chez Evereste (Fig.I.21.A). Suh et al. (2001) ont montré que lorsque *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* est inoculé sur un cultivar résistant de *Capsicum annuum*, il induit l'expression d'une ACL alors que ce n'est pas le cas sur un cultivar sensible. Ces auteurs suggèrent que la plante cherche à établir ses défenses le plus rapidement possible, ce qui nécessite la synthèse de précurseurs métaboliques (cette enzyme appartenant au cycle de Krebs).

La photosynthèse semble plus réprimée dans le génotype sensible à en juger par l'expression des gènes *CBP* et *CYTB6*, d'autant plus que le marqueur *CBP* est significativement moins exprimé chez MM106 que chez Evereste à 48 h. Une diminution de la photosynthèse a déjà été mesurée dans le porte-greffe sensible M9 au cours de l'infection par *Ea* (Heyens et Valcke, 2004) et cette diminution est corrélée au fait que DspA/E interagit *in vitro* avec une pré-ferredoxine (impliquée dans le PSII), interrompant sa translocation dans les chloroplastes (Bonasera et al., 2006a). Il existe probablement un lien entre cette diminution de l'activité photosynthétique induite par la bactérie et le fait que ce pathogène n'attaque que le parenchyme lacuneux. Il est envisageable que les FAO produits en marge de la photosynthèse constituent un obstacle pour *Ea*, bien que celle-ci soit particulièrement résistante à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparaison à *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, et ce grâce à son sidérophore, la desferrioxamine (Venisse et al., 2003). La présence de flavonoïdes antibactériens et antioxydants dans ces tissus pourrait également être défavorable à la bactérie (Agati et al., 2007). La répression de l'activité photosynthétique est couramment observée dans les interactions plante-pathogène, en corrélation avec la répression du gène codant la protéine de liaison à la chlorophylle a/b (*CBP*) (Berger et al., 2007). Etonnamment,

cette répression de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la photosynthèse est beaucoup plus forte et rapide au cours de l'HR induite par un *Pseudomonas syringae* pv *glyciniae* avirulent sur soja qu'en situation compatible (Zou et al., 2005), ce qui ne semble pas être le cas au cours de l'interaction entre *Ea* et le Pommier. Encore une fois, le modèle Pommier-*Ea* met en jeu des processus différents des modèles couramment utilisés. Le rôle de la lumière et de la photosynthèse dans l'interaction Pommier-*Ea* est renforcé par l'observation qu'à l'obscurité, les hôtes sensibles sont plus sensibles (Suleman et Steiner, 1994) et que la résistance d'Evereste est réduite (données non montrées). Il serait intéressant de voir si l'extinction de l'activité photosynthétique dans le parenchyme palissadique permet à la bactérie d'attaquer ce tissu, ce qui signifierait que la répression de la photosynthèse est effectivement importante pour le développement de la maladie. La sensibilité d'Evereste lorsqu'il est incubé à l'obscurité est caractérisée par des symptômes évoluant lentement, suggérant que les systèmes de défense ne sont pas totalement inactivés. Il est connu que les défenses (type PR-protéines), et notamment la voie SA, sont moins activées par les agents pathogènes à l'obscurité (Greibel et Zeier, 2008). La diminution de la concentration en SA produite en réponse à *Ea* chez le Pommier incubé à l'obscurité, pourrait avoir pour effet la non-inhibition de la voie JA, comme chez Evereste, ce qui devrait renforcer la résistance. Il est probable que l'obscurité modifie de plus les flux de carbohydrates (comme les modulations observées sur les transporteurs de sorbitol) ou bien altère le métabolisme secondaire qui serait moins actif à l'obscurité (Hartmann et al, 2005).

- *Le métabolisme secondaire et les défenses*

Les données d'expression de gènes candidats décrites ci-dessus montrent l'induction T3SS-dépendante de gènes codant PR-1, PR-2, PR-4 et PR-5, probablement de manière SA-dépendante. Norelli et al. (2009) rapportent des inductions similaires pour une PR-1, PR-2, PR-3 et PR-8 dans le génotype sensible Gale Gala. L'ensemble de ces résultats suggèrent que cette induction constitue une réponse à la présence d'une souche virulente d'*Ea* mais que ce type de défense n'est pas efficace contre ce pathogène. Étonnamment, l'acibenzolar-S-méthyl, analogue structural de l'acide salicylique, induit de manière forte l'expression de ces PR-protéines (Brisset et al., 2000 ; Brisset, données non publiées). Cette molécule confère cependant au Pommier une résistance à *Ea*, ce qui suggère qu'il existe probablement d'autres mécanismes de défenses induit par cet éliciteur, ou bien que l'expression forte induite de ces PR-protéines suffit pour contrôler l'infection par *Ea*. Dans ce dernier cas, la

résistance d'Evereste ne reposerait pas sur ce principe, puisque ni les niveaux constitutifs ni l'induction des gènes codant ces PR-protéines ne sont différentiels entre les deux génotypes. De manière intéressante, DspA/E exprimé transitoirement dans le tabac provoque un retard de l'induction de *PR-1* provoquée par l'agroinfiltration (Boureau et al., 2006), suggérant ainsi que cet effecteur est reconnu différenciellement entre le Tabac et le Pommier, mais aussi que l'action de DspA/E en combinaison avec les autres effecteurs diffère de celle de DspA/E seul. Un second groupe de PR-protéines, *LTP* et *DEF*, est à l'inverse réprimé dans le génotype sensible et non modulé dans le résistant Evereste, suggérant qu'elles sont sous la dépendance de l'acide jasmonique. L'expression du gène *LTP* codant l'allergène Mal d3 (accession n°AY792997) a également été suivie par Norelli et al. (2009). Il semble qu'il soit induit dans Gale Gale très rapidement (en 1h après coupure) alors qu'il est réprimé chez MM106. Etant donné les différences du mode d'inoculation et de la cinétique étudiée, il est difficile de conclure sur un rôle pour Mal d3, mais il serait intéressant de comparer les niveaux d'expression de cette LTP entre Gale Gala et les deux génotypes utilisés ici. A l'inverse, la LTP analysée par Norelli et al. (2009) suit plutôt le profil d'expression de *LTP15*, qui est très induit. Les résultats présentés ici indiquent que ce gène serait un bon marqueur de la résistance d'Evereste étant donnée son induction précoce et très forte au cours de l'interaction avec *Ea*. D'autres travaux devront être entrepris pour confirmer l'implication de *LTP15* dans la résistance (expression de la protéine recombinante et activité antimicrobienne, interférence ARN transitoire dans les feuilles).

Concernant le métabolisme secondaire, la voie des isoprénoïdes est induite dans les deux génotypes, et plus fortement dans le sensible, dès 6 h (expression de *FPPS*), tandis que la voie des phénylpropanoïdes et celle des anthocyanes sont très réprimées chez ce même génotype. Toutefois, seul le gène *CHS* est différenciellement exprimé entre les deux génotypes. Pontais et al. (2008) ont mis en évidence que les flavonoïdes présents constitutivement dans ces deux génotypes subissent d'importantes altérations, qui seront détaillées dans le chapitre II. Cependant ces modifications sont assez similaires entre les deux génotypes et sont caractérisées par une forte diminution de la teneur en dihydrochalcones (DHC) et une accumulation d'acides hydroxycinnamiques. Ces derniers pourraient par ailleurs servir de substrats pour la CAD dont le gène est induit dans les deux génotypes pour synthétiser de la lignine, ce qui semble le cas étant donnée la forte fluorescence des vaisseaux du xylème et des parois des cellules du sclérenchyme sous le cylindre central (Fig.I.5. et Fig.I.8.). La disparition des DHC peut être corrélée avec l'induction

dans les deux génotypes (et plus fortement chez Evereste) du gène *PPO*, qui code une polyphénol oxydase impliquée dans les processus de transformation des DHC (Pourcel et al., 2006), notamment en polymères qui auraient pu ne pas être détectés par Pontais et al. (2008). L'approche histologique est cohérente avec ces données, puisqu'à plusieurs reprises des cellules vraisemblablement riches en tannins ou en polyphénols condensés ont été observées dans les nervures notamment (Fig.1.5.). Dans tous les cas, le métabolisme secondaire subit un fort remaniement et une approche de profilage métabolique par GC-MS voire GCxGC/MS couplée à l'utilisation de différents systèmes d'extraction pourrait permettre de mesurer l'ampleur de ce remaniement et détecter des composés potentiellement impliqués dans la résistance.

Bien que toutes ces modulations d'expression soient *a priori* similaires entre le limbe et la nervure des feuilles infectées, il serait envisageable d'étudier de manière plus précise les réponses transcriptionnelles des cellules du parenchyme lacuneux par micro-dissection laser. En effet, dans les deux génotypes, ce type cellulaire est différenciellement attaqué par la bactérie. Chez MM106, ce tissu est particulièrement sensible et les cellules le composant sont rapidement lysées. A l'inverse, chez Evereste, les cellules semblent beaucoup plus résistantes à la bactérie. Il se pourrait que des modulations d'expression de certains gènes, très localisées, soient plus différentielles à ce niveau.

- *La réponse moléculaire de MM106, une « hypersensibilité » ?*

Etant donné que les défenses SA-dépendantes chez MM106 sont globalement très induites mais peu efficaces, une hypothèse peut être émise quant au comportement de MM106 face à *Ea*. Les modulations plus intenses et plus durables chez MM106 suggèrent une « hypersensibilité », au sens de la physiologie animale, de ce génotype à la bactérie. L'allergie chez les animaux se définit comme une maladie accompagnée d'une activation du système immunitaire contre un antigène, normalement non reconnu et inoffensif. Brièvement, l'activation du système immunitaire provoque dans ce cas une réaction inflammatoire, induite par la production rapide d'histamine et de FAO, ainsi que du facteur pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B et de l'interféron  $\gamma$  (Mora et al., 2008). Ainsi la présence de l'antigène dont la reconnaissance est altérée et conduit à ce type de réaction s'accompagne de dommages cellulaires et tissulaires. Les expressions de gènes chez MM106 sont très fortes et prolongées, et accompagnées d'importantes nécroses. Bien que dans le cas

présent, *a priori*, *Ea* ne puisse être considérée comme un antigène inoffensif, il existe des similarités entre la réaction de MM106 et l'allergie. Effectivement, il est imaginable de transposer ce type de réaction à l'interaction MM106-*Ea* : la reconnaissance de la bactérie, par un de ses effecteurs par exemple, chez MM106 conduit à l'activation exagérée et non-appropriée de défenses, et s'accompagne de la fragilisation des cellules environnantes, notamment en raison de la forte production de FAO. Chez Everest, le niveau de reconnaissance de la bactérie serait soit de moindre intensité, soit dirigé vers d'autres cibles (effecteurs différents, cibles intracellulaires modifiées par DspA/E, DAMPs), conduisant à des réponses plus appropriées (par exemple l'occlusion vasculaire). Toujours pour continuer l'analogie et renforcer une des hypothèses concernant la résistance d'Evereste, il a été rapporté (Mora et al., 2008) que la présence d'antioxydants (en l'occurrence, les vitamines C et E) permet de diminuer la production de FAO par les cellules immunitaires et ainsi de limiter l'inflammation. Par analogie, la présence d'antioxydants constitutifs ou induits chez Everest pourrait avoir le même effet, rendant les tissus non favorables à la propagation de la bactérie.

Selon ce modèle, *Ea* entre en contact avec les cellules hôtes, sensibles ou résistantes, et induit leur mort (Fig.I.26.) dans les phases précoces de l'interaction. La bactérie elle-même et/ou les conséquences de la nécrose localisée qu'elle induit sont perçues différemment entre les deux génotypes. Dans le cas de MM106, les défenses SA-dépendantes sont activées fortement, avec une production accrue de FAO et l'induction de la mort cellulaire de cellules avoisinantes, au bénéfice de la progression du pathogène en sensibilisant davantage les cellules végétales situées en aval de la bactérie. D'un autre côté, Everest répond plus passivement à l'agression, ou bien de manière différente par reconnaissance de DAMPs comme suggéré dans les paragraphes précédents, ne rendant possible qu'une mort cellulaire localisée, ralentissant considérablement l'avancée de la bactérie. Il n'est pas possible d'affirmer cependant qu'Evereste réagit de manière passive à l'infection, étant données les différentes modifications tissulaires et modulations transcriptionnelles observées.

#### - Analogie avec d'autres pathosystèmes

Au vu des résultats sur les expressions de gènes, le pathosystème *Ea*/MM106-Evereste se comporte de manière totalement différente du modèle classique *Arabidopsis thaliana*/*Pseudomonas syringae* (Tao et al., 2003). Selon ce modèle, les défenses induites

sont les mêmes d'une situation compatible à une situation incompatible de type R-Avr, bien que l'induction soit plus forte et plus précoce dans le cadre de l'interaction incompatible. Toutefois, l'interaction Pommier-*Ea* n'est pas unique puisque dans le cadre des interactions incompatibles *Erysiphe necator/Vitis aestivalis* (oïdium ; Fung et al., 2008) et *Venturia inaequalis/Malus domestica cv. Remo* (tavelure ; Degenhardt et al., 2005), des processus similaires ont été retrouvées. Dans le premier cas, la résistance de *Vitis aestivalis* à l'oïdium n'est pas corrélée à de fortes activations de gènes, mais plutôt à des niveaux de transcrits de défense (par exemple *EDS1*) élevés au niveau constitutif, assurant une résistance rapide au niveau de l'épiderme contre le champignon (Fung et al., 2008). A l'inverse, l'interaction avec l'espèce sensible *Vitis vinifera* est caractérisée par l'activation de nombreux gènes de défenses, tels que les PR-protéines PR-1, PR-4 et PR-10, ainsi que l'activation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, et notamment la stilbène synthase. Dans le second cas, la variété Rémo, résistante à la tavelure du Pommier, exprime de manière constitutive plusieurs PR-protéines (PR-2, PR-3, PR-5, cystéines protéinases et LTP) qui pourraient être à l'origine de cette résistance (Gau et al., 2004 ; Degenhardt et al., 2005). Dans le cas d'Evereste, résistant au feu bactérien, aucun gène, parmi ceux étudiés dans la présente étude, n'est spécifiquement exprimé à un niveau constitutif élevé.

L'ensemble des données de ce chapitre suggère que la résistance d'Evereste pourrait provenir de la combinaison de facteurs histologiques (occlusions vasculaires, renforcement pariétal) et transcriptionnels (induction de LTP, mobilisation des défenses JA-dépendantes). La sensibilité de MM106 pourrait assez bien s'expliquer par la forte répression de la voie de l'acide jasmonique, bien que les mécanismes néfastes à la bactérie qui sont réprimés ne soient pas encore élucidés (ces derniers devraient être très différentiels entre les deux génotypes). La similarité des réponses tissulaires et transcriptionnelles entre les deux génotypes suggèrent aussi l'implication de composés constitutifs dans la résistance et/ou la sensibilité. Ces composés, ou bien leurs produits de transformation au cours de l'interaction, pourraient bloquer efficacement la progression d'*Ea* chez Evereste, et leur absence chez MM106 serait une des causes de la sensibilité de ce génotype. Le chapitre suivant se focalise sur des métabolites particuliers du Pommier, les dihydrochalcones, une sous-famille de flavonoïdes, pour tenter de déterminer si ces composés, présents en forte quantité dans les jeunes feuilles, peuvent intervenir dans le devenir de l'interaction Pommier-*Ea*.

## **IV. Matériel et méthodes**

### **IV.1. Matériel biologique**

Les diverses souches d'*E amylovora* utilisées pour les infiltrations des génotypes MM106 et Evereste sont présentées dans le tableau I.3. Les souches sont cultivées sur milieu KB solide (King *et al.*, 1954) supplémenté en antibiotique (chloramphénicol, kanamycine, streptomycine et/ou spectinomycine) à 20 µg/mL. Les cultures sont incubées dans une étuve maintenue à 26°C et les inocula préparés dans de l'eau stérile à une concentration d'environ 10<sup>7</sup> cfu/mL (DO à 600 nm comprise entre 0,7 et 0,8).

Deux génotypes ont été utilisés dans les expérimentations. Le génotype Evereste présente une résistance totale à la souche sauvage CFBP1430 tandis que le génotype MM106 y est extrêmement sensible. Le matériel végétal se présente sous forme de plants greffés, le génotype MM106 servant de porte-greffe (génotype Evereste ou MM106 sur MM106) et est cultivé en serre (photopériode et lumière naturelles, 70% d'humidité relative et températures comprises entre 17 et 22°C).

### **IV.2. Produits chimiques**

Tous les produits chimiques et solvants ont été commandés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). L'eau ultra-pure est produite par un système Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

### **IV.3. Inoculation par infiltration**

Cette technique d'inoculation permet d'infecter les feuilles de manière homogène, afin que les réponses de la plante puissent être les plus homogènes possibles au sein des tissus. Les infiltrations sont réalisées sur de jeunes pousses en croissance des pommiers greffés. Le principe est basé sur la rupture d'un vide créé préalablement (30 hPa) assurant la rentrée de bactéries en suspension dans les espaces intercellulaires des feuilles *via* les stomates.

Dans un premier temps, les jeunes plants sont placés à l'intérieur de mini-serres fortement humidifiées durant 8h à l'obscurité et à 23°C puis 8h à la lumière à 26°C dans une enceinte climatique. Le but est d'obtenir une ouverture maximale des stomates pour

faciliter la pénétration des bactéries. L'infiltration se fait de la manière suivante : les pommiers sont placés dans une enceinte à vide et les feuilles des jeunes pousses en croissance sont immergées dans la suspension bactérienne ou l'eau. Le vide est créé à l'aide d'une pompe et maintenu pendant 4 min. Une fois la pression rétablie, les feuilles bien infiltrées sont identifiées et les plants sont replacés en cellule climatique dans une atmosphère non saturée en eau jusqu'au prélèvement, avec des cycles de 16 heures de jour à 23°C et 8 heures de nuit à 17°C. Pour une souche et un temps de prélèvement donné, 3 plantes sont infiltrées à la fois pour disposer de suffisamment de biomasse. Les tissus prélevés sont stockés à -80°C jusqu'au broyage, ou bien utilisés rapidement pour la microscopie.

#### **IV.4. Dénombrements bactériens**

Pour déterminer les populations bactériennes au sein des feuilles infiltrées, un disque foliaire est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce (0,5 cm de diamètre) à cheval sur la nervure et à 1 cm de la base du pétiole, désinfecté en surface par un bain d'1 min dans du chlore actif (1,25%), puis rincé deux fois de suite dans de l'eau distillée stérile. Le disque foliaire est ensuite broyé à sec dans un microtube avec deux billes d'acier stérile et un broyeur à billes (30 Hz pendant 2 fois 15 s, MM301, Retsch, Haan, Germany). Le broyat est repris par 1 mL de tampon phosphate pH 7 0,1M froid contenant 20% de PVP-10, 1% de mannitol, 0,2% d'acide ascorbique. Après 1 min d'homogénéisation au broyeur à billes (10 Hz). L'homogénat obtenu est dilué en série par un facteur 10 jusqu'à  $10^{-5}$  et 20  $\mu$ L de chaque dilution sont déposés sur milieu KB solide. Les colonies bactériennes sont dénombrées après 48 h d'incubation à 26°C.

#### **IV.5. Microscopie optique**

Des fragments de tissus (environ 0,5 cm de côté) ont été infiltrés par une solution de glutaraldéhyde à 4% dans un tampon phosphate à pH 7,2 et maintenus sur une couche de glace durant l'infiltration. Les prélèvements une fois infiltrés sont placés à 4°C pendant 2 h dans une solution neuve du glutaraldéhyde 4 %. Après 3 rinçages avec du tampon phosphate pH 7,2, les échantillons sont stockés à 4°C dans ce même tampon. Ils sont alors déshydratés dans des bains d'alcool de degrés croissants (50°, 70°, 80°, 95°, 100°) pendant 10 minutes chacun, excepté le bain d'alcool à 100° effectué 3 fois pendant 15 minutes. Après

déshydratation, les échantillons sont mélangés à un tampon (Technovit 7100, Kulzer, Wehrheim, Allemagne) dans de l'éthanol absolu, qui est infiltré dans les tissus pendant 2 h sous vide d'air, sur de la glace. Les échantillons sont laissés dans la solution et sont maintenus à 4°C pendant une nuit. Ils sont alors infiltrés avec une solution durcissante constituée de résine (Technovit 7100) pendant 20 minutes sous vide d'air puis pendant au moins 12 h à 4°C. L'inclusion proprement dite se fait avec une seconde solution durcissante, qui est déposée dans des moules en silicone et dans laquelle sont immergés les échantillons. La résine polymérise ensuite pendant 2 h à température ambiante. Les blocs sont alors séchés en les maintenant dans une étuve à 40°C.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome (RM2165, Leica, Nussloch, Allemagne), réglé pour des sections de 3 µm d'épaisseur. Les observations microscopiques ont été faites à l'aide d'un microscope BH2-RFCA (Olympus, Rungis, France) équipé d'une caméra numérique DP71 (Olympus, Rungis, France), d'une source UV USH-102 (Olympus, Rungis, France) et de trois filtres pour la fluorescence (UV UG1 ex./em. 334/365 nm, GFP ex./em. 395/504 nm et Bleu BP490 ex./em. 405/490 nm). Les photos ont été enregistrées par le logiciel Cell\* (Olympus, Münster, Allemagne) puis analysées si besoin à l'aide du logiciel libre ImageJ (v1.42i, NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Pour la coloration au bleu de toluidine, les coupes réalisées au microtome ont été déposées sur des lames puis immergées dans une solution de bleu de toluidine O (0,01%) pendant environ 15 s et rincées abondamment avec de l'eau distillée.

## **IV.6. Analyse d'expressions de gènes**

### **IV.6.1. Extraction d'ARN**

Le protocole utilisé repose sur la précipitation des ARN au LiCl suivie d'une purification par un mélange phénol-chloroforme et similaire à celui utilisé par Venisse et al. (2002). Trois demi-feuilles sont prélevées, placées dans un microtube de 2 mL, plongé ensuite dans l'azote liquide. Les feuilles sont broyées au broyeur à billes (30 Hz pendant 2 fois 15 s, MM301, Retsch) après ajout de 2 billes en tungstène (3 mm, Qiagen, Courtaboeuf, France). Un mL de tampon d'extraction (Tris pH 7,5 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, SDS 5%) préchauffé à 60°C est ensuite ajouté au broyat. Après homogénéisation, le tout est incubé à 60°C pendant 10 min. Les suspensions sont ensuite placées 5 min à température ambiante et 500 µL d'acétate de potassium 3 M pH 5 sont ajoutés. Après 2 minutes d'incubation à

température ambiante, le tout est centrifugé durant 15 min à 16000 g et à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et un volume d'isopropanol froid y est additionné. La première étape de précipitation se fait à -20°C pendant au moins 1h puis les culots sont recueillis après 15 min de centrifugation à 15000 g à 4°C et resuspendus dans 160 µL d'eau ultra pure stérile. Quarante µL d'éthanol absolu froid sont ajoutés puis les suspensions sont de nouveau centrifugées à 15000 g pendant 5 min après 5 min d'incubation dans la glace. La précipitation des ARN se fait par addition de 100 µL de LiCl 10 M au surnageant durant une nuit à -20°C. Les culots sont obtenus après 30 min de centrifugation à 16000 g à 4°C. Ceux-ci sont lavés avec 200 µL de LiCl 3 M et une centrifugation de 5 min à 10000 g à 4°C. Après élimination du surnageant, les culots sont lavés deux fois de suite avec de l'éthanol froid à 80%. Une fois le deuxième lavage effectué, les culots sont mis à sécher pendant environ 10 min à température ambiante puis resuspendus dans 60 µL d'eau ultra pure stérile. Un traitement à la DNase est réalisé dans les conditions suivantes : aux échantillons sont rajoutés 10 µL de tampon de réaction 10X, 30 µL d'eau ultra pure stérile et 0,07 µL de DNase RNase-Free à 140 U/µL (Eurogentec, Liège, Belgique). La dégradation des ADN se fait par incubation du mélange à 37°C pendant au moins 45 min. Une purification par un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique froid (25:24:1) est ensuite effectuée. La phase supérieure obtenue après 10 min de centrifugation à 10000 g est lavée avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Les phases supérieures sont de nouveau conservées et 50 µL d'acétate d'ammonium 7,5 M y sont rajoutés ainsi que 2 volumes d'éthanol 100%. La précipitation se fait durant au moins 2 heures à -80°C. Les ARN sont ensuite centrifugés pendant 30 minutes à 10000 g et à 4°C. Les culots obtenus sont ensuite rincés par 200 µL d'éthanol 80% puis laissés à sécher 10 min à température ambiante. Ils sont finalement repris par 55 µL d'eau ultra pure stérile et dosés par spectrophotométrie (Nanodrop, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Le rapport DO260nm/DO280nm est déterminé pour évaluer la qualité de l'extraction. Les ARN sont conservés à -80°C.

#### IV.6.2. Rétro-transcription

Dans un premier temps, des solutions d'ARN à 0,5 µg/µL sont préparées pour que les quantités de matériel de départ soient similaires. La rétro-transcription est faite à partir d'oligonucléotides dT(15), dont l'attachement se fait dans les conditions suivantes : à 2 µg d'ARN sont ajoutés 9 µL d'eau ultra pure stérile et 1 µL d'oligonucléotides dT(15)

(Eurogentec). Le tout est porté à 75°C pendant 5 min après homogénéisation puis placé rapidement dans la glace pendant 5 min. Dans un second temps, la rétro-transcription proprement dite est réalisée par addition du mélange suivant aux ARN : 4,3 µL d'eau ultra pure stérile, 6 µL de tampon de rétro-transcriptase 5X, 5 µL de dNTP RNase Free 2,5 mM (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et 0,7 µL de rétro-transcriptase M-MLV à 200 U/µL (Promega). La synthèse des ADNc se fait durant 75 min à 42°C. Les produits obtenus sont conservés à -20°C. La réaction est contrôlée pour vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique par PCR à l'aide d'amorces amplifiant une partie du gène codant pour *EF-1α* située de part et d'autre d'un intron (Rosati et al., 1997).

#### IV.6.3. Suivi de l'expression de gènes par PCR quantitative

La réaction se prépare dans les conditions suivantes : 6,25 µL de mastermix (qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green I with fluorescein ; Eurogentec), 0,5 µL de chaque amorce à 10 µM (pour une concentration finale à 200 nM) et 12,75 µL d'eau ultra pure stérile. La PCR est réalisée sur ICycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) selon un programme comportant 2 min à 50°C, 10 min à 95°C pour l'activation de la Taq puis 35 cycles de 15 s à 95°C, 45 s à la température d'hybridation et 30 s à 72°C. Une courbe de fusion permettant de visualiser la spécificité de l'amplification est réalisée en fin de PCR, avec des cycles de 10 s en incrémentant la température de 0,5°C à chaque étape à partir de la température d'hybridation jusqu'à atteindre 98°C. Chaque échantillon est analysé en double. Les valeurs de Ct sont données par le logiciel ICycler IQ Optical System Software 5.1 (Bio-Rad). Le Ct est défini comme le nombre de cycles nécessaires à l'obtention, pour un couple d'amorces et un échantillon donnés), d'un signal supérieur au bruit de fond. L'expression brute des gènes a été calculée selon la formule du  $\Delta Ct$  ( $\text{exp.brute} = 2^{(\text{Ct calibrateur} - \text{Ct échantillon})}$ ). Ces expressions brutes alors été normalisées via trois gènes de référence, *Gapdh*, *Tua* et *Act2* (voir Tableau I.2), dont la stabilité a été vérifiée comme proposé par Vandesompele et al. (2001). La moyenne géométrique des expressions brutes de ces trois gènes pour un échantillon donné a été utilisée comme facteur de normalisation ( $\text{exp.normalisée} = \text{exp.brute}/\text{facteur de normalisation}$ ). L'ensemble des couples d'amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Beacon Designer (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA), en respectant une longueur d'amorce comprise entre 18 et 24 pb, une taille d'amplicon comprise entre 50 et

200 pb, une température d'hybridation égale à  $58^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , et en évitant les structures secondaires (calculées par l'algorithme Mfold).

#### IV.6.4. Analyses statistiques

Les analyses en composantes principales ont été construites avec le logiciel Statbox v6.4 (Grimmer Logiciels, Paris, France). Des tests de comparaison de médianes ont été utilisés pour déterminer si les différences d'expressions de gènes entre traitements sont significatives. Ce test non paramétrique repose sur la comparaison des intervalles de confiance de la médiane sur une représentation en boîtes-à-moustaches des données (construite avec le logiciel libre R ; R Development Core Team, 2008). Sur cette représentation, les boîtes correspondent au premier et au troisième quartile, la médiane et la moyenne étant représentées par un trait et une croix respectivement. Les moustaches s'étendent jusqu'au point le plus extrême qui ait une valeur inférieure à 1,5 fois l'écart interquartile. Lorsque les intervalles de confiance ne se superposent pas, les deux traitements sont significativement différents à 95% (Chambers et al., 1983).

### IV.7. Manipulations de l'ADN : amplification et clonage

#### IV.7.1. Clonage

Chaque fragment amplifié par PCR quantitative a été cloné dans le but de confirmer l'identité de la séquence à laquelle ils appartiennent. Les clonages sont effectués à partir de produits PCR dont la qualité est vérifiée après séparation sur gel d'agarose à 2%. Le kit de clonage pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega) a été utilisé pour la préparation des vecteurs dans les conditions suivantes : 1,45  $\mu\text{L}$  de tampon de ligation 2X, 0,25  $\mu\text{L}$  de plasmide pGEM-T et 0,3  $\mu\text{L}$  de ligase. Aux 2  $\mu\text{L}$  de ce mélange est ajouté 1  $\mu\text{L}$  de produit PCR ; le tout est ensuite incubé durant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  après homogénéisation. Le protocole de clonage dans la souche DH5 $\alpha$  d'*Escherichia coli* (Hanahan, 1983) est celui donné par le fournisseur. La vérification du clonage se fait par PCR avec des amorces spécifiques du fragment cloné et les amorces SP6 et T7 du plasmide. Les plasmides recombinants valides sont extraits avec le kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System selon les

recommandations du fabricant (Promega). Les inserts sont séquencés par GATC Biotech (Konstanz, Allemagne) à partir de l'amorce T7.

#### IV.7.2. Amplification par PCR

Les amplifications spécifiques de séquence par PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 40  $\mu$ L dans les conditions suivantes : 32  $\mu$ L d'eau ultra pure stérile, 4  $\mu$ L de tampon de polymérase 10X, 2,4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25 mM, 1  $\mu$ L de dNTP à 2,5 mM chacun (Promega), 0,5  $\mu$ L de chaque amorce ainsi que 0,1  $\mu$ L de GoTaq Flexi (Promega). Le programme utilisé comprend une première étape de dénaturation de 5' à 95°C puis de 40 cycles de 45'' à 95 °C, 45'' à la température d'hybridation des amorces et 45'' à 72°C. Une extension finale est prévue pendant 15' à 72°C. Ce programme est réalisé sur iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Les produits d'amplification sont séparés par migration sur un gel d'agarose à 2% et visualisés par marquage au bromure d'éthidium à l'aide d'une caméra (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad).

#### IV.7.3. RACE-PCR

Le clonage de la séquence entière d'ARNm codant des LTP s'est tout d'abord faite par obtention des séquences 5' et 3' de ces ARNm. Une étude exhaustive sur NCBI a permis de dessiner plusieurs amorces permettant d'amplifier des LTP potentiellement présentes chez Everest et MM106, à partir de séquences d'EST de *Malus* non complètes. La RACE-PCR a été réalisée avec l'aide du kit SMART™ RACE cDNA Amplification (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique) et le dessin des amorces s'est fait, dans la mesure du possible, selon les recommandations de ce kit. Leur séquence est indiquée dans le tableau I.4. Les amplifications ont été faites avec des programmes courts (3' à 95°C, puis 35 cycles de 15 s à 95°C, 30 s à 60°C pour la 3'RACE ou 62°C pour la 5'RACE et 3' à 72°C, puis une étape d'élongation de 15' à 72°C), selon les mêmes conditions réactionnelles que celles décrites dans le paragraphe « amplification par PCR ». Les PCR nichées (nested PCR) ont été faites dans les mêmes conditions, pour vérifier les spécificités d'amplification. Après clonage et séquençage des fragments 5' et 3', les ARNm entiers ont été reconstitués par assemblage (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>; Huang et Madan, 1999).

## **CHAPITRE II.**

**CARACTERISATION DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES ET ANTIOXYDANTES D'UNE  
SOUS-FAMILLE DE FLAVONOÏDES, LES DIHYDROCHALCONES (DHC), DANS LES  
FEUILLES DE POMMIER**

—

**IMPLICATION DES DHC ET DE LEURS PRODUITS DE TRANSFORMATION, DANS  
L'INTERACTION EA-POMMIER**

Les métabolites secondaires du Pommier, dans leur ensemble, sont relativement bien étudiés, dans la mesure où beaucoup sont impliqués dans la qualité des fruits, que ce soit par la couleur (anthocyanes), les arômes (esters volatiles), la résistance aux pathogènes et aux parasites (terpénoïdes et produits phénoliques/flavonoïdes). De plus, un nombre croissant d'études *in vitro* ainsi qu'*in vivo* suggèrent que ces composés sont bénéfiques pour la santé, grâce à leurs activités générales mais aussi anti-cancéreuses, anti-hypertensives, anti-inflammatoires, antivirales et antimicrobiennes. Les principaux métabolites secondaires du Pommier seront décrits dans l'étude bibliographique de ce chapitre.

Les données d'expression de gènes décrites dans le chapitre I illustrent également à quel point le métabolisme secondaire est sollicité et reprogrammé en cas de stress : au cours de l'interaction avec *Erwinia amylovora* par exemple, le métabolisme des isoprénoïdes est stimulé tandis que celui des phénylpropanoïdes est plutôt réprimé, et ce davantage dans une variété sensible, MM106, qu'une résistante, Evereste. De plus, étant donné qu'assez peu de différences ont été observées aussi bien en microscopie qu'en analyse d'expression de gènes, l'existence d'une barrière chimique constitutive potentielle dans le génotype résistant, Evereste, est envisageable. Cette barrière chimique pourrait être efficace par (i) une action antimicrobienne directe, mais s'exprimant tardivement puisque les populations bactériennes augmentent dans les zones infiltrées de manière peu différente dans les deux génotypes pendant 48 h ou bien (ii) par une activité antioxydante, comme suggéré dans le chapitre I, qui aurait pour conséquence le blocage de la propagation de la mort cellulaire induite par les FAO. La biosynthèse des flavonoïdes étant différentiellement modulée entre les deux génotypes Evereste et MM106 au cours de l'infection par *Ea*, une analyse des métabolites issus de cette voie a été conduite dans un premier temps.

Dans les feuilles de Pommier, les flavonoïdes sont représentés essentiellement par une seule sous-famille de composés, présents en grande quantité, les dihydrochalcones (DHC). Les profils de produits phénoliques solubles constitutifs ont été établis chez Evereste et MM106 et ils ont permis de mettre en évidence l'existence de deux DHC additionnelles chez Evereste, en collaboration avec Sylvain Guyot, de l'Unité de Recherches Cidricoles de l'INRA de Rennes. Elles ont donc été extraites, puis caractérisées pour leur pouvoir antibactérien et leurs propriétés antioxydantes. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication acceptée dans *Phytochemistry*. Deux tests basés sur des mécanismes FAO-dépendants, la formation de produits avancés de glycation (AGEs, en collaboration avec l'équipe SONAS de l'Université d'Angers) et la contraction d'artères mésentériques de rat

(en collaboration avec l'équipe BNVI de la Faculté de Médecine d'Angers), ont été utilisés pour compléter et valider les résultats de tests antioxydants *in vitro*. Les AGEs et l'hypertension participent, en autres, aux complications associées au diabète, telles que l'athérosclérose et certaines néphropathies (Singh et al., 2001), et ces deux tests offrent donc des renseignements sur l'utilisation potentielle des composés en tant que médicament ou additif alimentaire.

Les résultats qui seront présentés dans la première partie de ce chapitre sont plutôt en défaveur d'un rôle direct des DHC dans la résistance d'Evereste. Il a alors été envisagé d'étudier l'implication des produits de transformation des DHC dans cette résistance, puisqu'il a été précédemment montré qu'au cours de l'interaction, les DHC disparaissent de manière importante (Pontais et al., 2008) et qu'une PPO, une enzyme catalysant l'oxydation des flavonoïdes, a été trouvée fortement induite dans l'analyse transcriptionnelle présentée dans le chapitre I. Les mécanismes responsables de la transformation des DHC ont par conséquent été analysés, avec une approche plus complète sur les PPO. Les produits résultant de ces réactions ont également été étudiés, notamment quant à leur activité antibactérienne contre *Ea*. L'ensemble de ces résultats montrent que les deux génotypes Evereste et MM106 transforment la phloridzine, une DHC commune, de manière différentielle en produits dont les propriétés sont spécifiques, suggérant qu'ils pourraient être impliqués dans la résistance.

## ***I. Etude de métabolites secondaires constitutifs du Pommier***

Cette étude bibliographique a pour objectif de présenter les principales voies du métabolisme secondaire connues chez le Pommier : la voie de biosynthèse des flavonoïdes, lesquels feront l'objet de l'étude présentée dans ce chapitre, celle des terpénoïdes (= isoprénoïdes), et celle des cystéines sulfoxydes. Les deux premières voies commencent à être bien élucidées chez le Pommier, en particulier grâce à l'obtention récente de nombreux EST codant des enzymes appartenant à ces voies (Newcomb et al., 2006). La troisième sera brièvement décrite car, bien qu'encore non connue chez le Pommier, un gène codant une enzyme importante de cette voie (alliinase, *ALLI*) est fortement induit au cours de l'interaction (cf. Chapitre I).

### **I.1. Etude bibliographique**

#### **I.1.1. Les produits phénoliques**

Les produits phénoliques et les flavonoïdes constituent un groupe de métabolites secondaires très importants, bien que la diversité des composés issus de cette voie soit moins importante que celle observée pour les terpénoïdes. A l'image de ces derniers, les produits phénoliques sont impliqués dans une large gamme de processus physiologiques (Yu et Jez, 2008), allant du renforcement pariétal (monolignols ; Hüchelhoven, 2007) à la protection contre le stress oxydant (Hernandez et al., 2008), en passant par la défense contre les pathogènes (Treutter, 2006), l'initiation de la nodulation (Subramanian et al., 2007) et la pigmentation des fleurs (Williams et Grayer, 2004).

##### ***I.1.1.a) Biosynthèse***

La biosynthèse des produits phénoliques est cytosolique, vraisemblablement organisée en métabolons (Jorgensen et al., 2005) et peut être artificiellement découpée en plusieurs parties (Fig.II.1). La première constitue plusieurs étapes qui aboutissent à la production d'un précurseur commun à la plupart des flavonoïdes, le *p*-coumaroyl-CoA. Ce dernier est produit après désamination de la phénylalanine par la PAL en acide cinnamique, puis par l'hydroxylation de ce dernier sur le noyau benzène par une enzyme cytochrome P450-dépendante (C4H ou CAH, acide cinnamique hydroxylase), suivie de l'activation de

l'acide *p*-coumaroylique ainsi produit par conjugaison au coenzyme A, par la 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL). Ce premier groupe de réactions est appelé voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (un groupement phénol substitué par une chaîne en C3 ; Ferrer et al., 2008). Le *p*-coumaroyl-CoA est un précurseur très important, car il constitue un carrefour essentiel à partir duquel peuvent être synthétisés les monolignols d'une part, et les flavonoïdes d'autre part. La synthèse des monolignols /acides hydroxycinnamiques a déjà été abordée dans le chapitre précédent et ne sera pas retraitée ici. Concernant les flavonoïdes, il y a deux sortes de composés qui peuvent être issus du *p*-coumaroyl-CoA mais qui sont tous les deux synthétisés de manière similaire : les stilbènes et les chalcones. Ces réactions sont catalysées par des polykétide synthases (Yu et Jez, 2008) et consistent en l'élongation du précurseur par condensation de 3 molécules de malonyl-CoA, puis d'une cyclisation. Dans le cas des stilbènes, l'ensemble de la réaction est catalysée par une stilbène synthase (STS) et implique une perte d'eau au cours de la cyclisation. Dans le cas des chalcones, la réaction est assurée par une chalcone synthase (CHS) et forme la naringénine. Alors que le resveratrol qui est un stilbène produit par l'action de la STS, n'est présent que dans quelques espèces végétales comme la vigne ou la cacahuète (Yu et Jez, 2008 ; Chong et al., 2009), les flavonoïdes dérivés de la naringénine sont beaucoup plus ubiquistes. Il existe plusieurs sous-familles de composés finaux chez les plantes (Fig.II.1. ; Lepiniec et al., 2006 ; Ferrer et al., 2008) : (i) les flavan-3-ols et les procyanidines, dont la catéchine, l'épicatéchine et les oligomères associés (Xie et Dixon, 2005), (ii) les isoflavonoïdes dont la genisteine, la daidzine et la médicarpine (Dhaubhadel et al., 2003), (iii) les flavonols, dont le kaempferol et la quercétine (Lepiniec et al., 2006), (iv) les anthocyanes (Williams et Grayer, 2004), (v) les phlobaphènes (Winkel-Shirley, 2001), (vi) les auronés (Ono et al., 2006) et (vi) les dihydrochalcones (DHC ; Gosch et al., 2009). La diversité des produits finaux est générée par les nombreux processus faisant notamment appels à des protéines cytochrome P450-dépendantes (Ayabe et Akashi, 2006) parmi lesquels hydroxylation, réduction ou oxydation, glycosylation, les profils de substitution étant très variés (Fig.II.1). Parmi ces transformations, les glycosyltransférases, par exemple, jouent un rôle très important dans la biosynthèse des flavonoïdes (Gachon et al., 2005), puisqu'elles exhibent de hautes spécificités de substrat (Aksamit-Stachurska et al., 2008), et qu'elles sont nécessaires pour convertir de nombreux flavonoïdes sous leur forme de stockage, i.e. glycosylée (cas des anthocyanes par exemple ; Lepiniec et al., 2006). D'ailleurs, la glycosylation des flavonoïdes vise probablement à diminuer leur toxicité et à augmenter leur solubilité. Tous ces composés ne sont pas

présents ensemble dans une seule et même espèce, par exemple les isoflavonoïdes sont plutôt spécifiques des légumineuses, chez lesquelles ils participent à la formation de nodules fixant l'azote atmosphérique avec certaines bactéries symbiotiques (Dhaubhadel et al., 2003).

En ce qui concerne le Pommier, les principaux produits phénoliques détectés dans les fruits et dans les feuilles sont regroupés dans le tableau II.1., d'après les données de Treutter (2001) et Pontais et al. (2008). Dans les feuilles, les DHC sont les plus importantes quantitativement (jusqu'à 5% du poids sec), et ne sont représentées que par la phloridzine, dans la plupart des variétés cultivées (Hunter et Hull, 1993 ; Treutter, 2001). Concernant la phloridzine, sa voie de biosynthèse a récemment été élucidée (Gosch et al., 2009). Elle implique une étape d'hydrogénation du *p*-coumaroyl-CoA avant son extension par la CHS. La phlorétine, libérée à la suite de cette réaction, est très rapidement glucosylée par une glucosyltransférase qui a été récemment caractérisée (Judgé et al., 2008), pour former de la phloridzine. Bien que les DHC aient été longtemps considérées comme spécifiques du genre *Malus*, elles ont maintenant été rapportées dans plusieurs autres genres comme *Balanophora* (Tanaka et al., 2005), *Fragaria* (Hilt et al., 2003) et *Symplocos* (Ling et al., 2004).

#### *1.1.1.b) Régulations et rôles*

La régulation de la biosynthèse des flavonoïdes est intimement liée à leurs propriétés physico-chimiques (en particulier, leurs activités antibactériennes, Cushnie et Lamb, 2005 ; et antioxydantes, Heim et al., 2000). Dans de nombreux cas, leur synthèse est activée en cas de blessure ou d'attaque par les pathogènes (Treutter, 2001). La régulation transcriptionnelle des gènes codant les enzymes de biosynthèse est essentiellement assurée par des facteurs de transcription de type MYB/bHLH répondant à l'acide jasmonique (Vom Endt et al., 2002 ; LaCamera et al., 2004), bien que certains produits phénoliques soient présents constitutivement et par exemple activés par déglycosylation sous l'action de  $\beta$ -glucosidases (Morant et al., 2008a). Des travaux réalisés sur les graines germées d'*Arabidopsis* révèlent que l'expression de chacun des gènes de la voie de biosynthèse des produits phénoliques est régulée de manière spatio-temporelle par des facteurs MYB spécifiques, qui ont un profil d'expression bien défini (Stracke et al., 2007). La régulation de la synthèse des anthocyanes chez le Pommier se fait également sous le contrôle de facteurs de transcription de type MYB. De plus, la surexpression du facteur de régulation *Lc* (un

facteur de type MYB) du Maïs chez le Pommier par transgénèse induit spécifiquement l'expression du gène codant l'ANS, résultant en une accumulation de procyanidines composées d'épicatéchine (Li et al., 2007). La pigmentation de la peau des fruits en rouge, ainsi que la coloration de leur chair par l'accumulation d'anthocyanes est sous le contrôle du facteur *MdMYB10*, qui agit en association avec un facteur bHLH (bHLH33 ; Espley et al., 2007). La surexpression de *MdMYB10* est corrélée avec une plus forte expression des gènes codant les enzymes de biosynthèse des flavonoïdes, ainsi qu'avec une forte pigmentation rouge des tissus dans lesquels il est exprimé. La pigmentation, ainsi que l'accumulation des flavonoïdes de la pomme en général, sont stimulées par l'action synergique de l'éthylène et de l'acide jasmonique dans la variété Fuji (Rudell et Matheis, 2008). De plus, la composition phénolique des feuilles de Pommier est qualitativement influencée par l'alimentation en azote (Strissel et al., 2005). Toutefois, bien que l'expression des gènes codant les enzymes de biosynthèse soit très influencée par la nutrition azotée, l'impact sur les teneurs dans les tissus peut différer selon les variétés, et en fonction des classes de produits phénoliques.

Etonnamment, bien que les flavonoïdes soient étudiés depuis longtemps, leur rôle physiologique premier est incertain (Ferrer et al., 2008). Ceci est d'autant plus vrai pour les DHC, qui sont présentes en très forte concentration dans les feuilles de Pommier. Elles pourraient jouer un rôle de filtre UV (Treutter, 2006). Plusieurs travaux ont tenté d'étudier leur rôle dans la résistance à la tavelure (Hunter, 1975 ; Picinelli et al., 1995 ; Mayr et al., 1997) ainsi qu'au feu bactérien (Pontais et al., 2008), sans clairement démontrer leur implication.

De nombreux flavonoïdes sont connus pour leur activité antioxydante remarquable (Rice-Evans et al., 1997 ; Heim et al., 2000) et cette activité pourrait avoir une signification biologique, i.e. les flavonoïdes pourraient participer à l'homéostasie du potentiel rédox dans les cellules de la plante (Hernandez et al., 2008). L'activité antioxydante de quelques DHC a déjà été rapportée, mais dans la plupart des cas, les études portent sur les fruits et non les feuilles (Lu et Foo, 2000 ; Lee et al., 2003 ; Khanizadeh et al., 2008 ; Wojdylo et al., 2008). Dans ces organes, les DHC sont peu présentes (Treutter, 2001) et ne participent que faiblement au potentiel antioxydant total. Des propriétés biologiques remarquables ont été décrites pour la phloridzine. Ainsi, il a été montré précédemment qu'elle inhibe l'absorption intestinale et rénale du glucose, ce qui a pour effet de normaliser la glycémie dans des modèles animaux (Ehrenkranz et al., 2005). La phloridzine et la phlorétine peuvent également prévenir la perte osseuse liée à l'inflammation chronique dans un modèle de

rattes ovariectomisées, ce qui suggère une bioactivité antioxydante et anti-inflammatoire pour ces deux composés (Puel et al., 2005).

## I.1.2. Les isoprénoïdes

### *I.1.2.a) Biosynthèse*

Les isoprénoïdes ou terpénoïdes constituent une grande famille de métabolites secondaires (Bohlmann et Keeling, 2008), caractérisée par une grande diversité de structures, bien que basée sur un même squelette à 5 carbones, l'isopentényl di-phosphate (IPP) ou son isomère le diméthylallyl di-phosphate (DMAPP ; Fig.II.2.). Ces précurseurs sont synthétisés selon deux voies : la voie du DXP (1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate), chloroplastique et également appelée voie du MEP (2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate), et la voie du mévalonate, cytosolique (Kirby et Keasling, 2009). La localisation spécifique de chacune de ces voies est liée à la production de composés différents entre ces deux voies. La voie chloroplastique est effectivement impliquée dans la synthèse de monoterpènes et des diterpènes, tandis que la voie cytosolique catalyse la formation de sesquiterpènes et de triterpènes (à 30 C), bien que cette différence basée sur la compartimentation soit de plus en plus remise en question. En effet, il y a de nombreuses interactions entre ces voies, dont des flux de précurseurs, et en fonction des espèces l'une ou l'autre des voies peut être dominante dans la synthèse de l'ensemble des terpénoïdes (Yu et Utsumi, 2009). Au niveau de la plante entière, une grande partie des terpénoïdes volatiles sont produits dans des trichomes glandulaires situés à la surface de l'épiderme (Bohlmann et Keeling, 2008).

Les enzymes-clé de la biosynthèse des isoprénoïdes, les prényltransférases, catalysent la condensation des sous-unités isopentényl (Cheng et al., 2007). Les trois principales prényltransférases sont la GPPS (géranyl-pyrophosphate synthase), la FPPS (farnésyl-pyrophosphate synthase) et la GgPPS (géranyl-géranyl-pyrophosphate synthase). La première catalyse la première étape de la formation de monoterpènes (condensation de deux sous-unités isopentényl, C<sub>10</sub>), la seconde celle des sesquiterpènes (condensation de trois sous-unités, C<sub>15</sub>) et la troisième celle des diterpènes (condensation de quatre sous-unités, C<sub>20</sub>). Les chaînes monoterpène, sesquiterpène et diterpène sont les précurseurs d'une très large diversité de molécules (Fig.II.2. ; Kirby et Keasling, 2009). Ces précurseurs peuvent subir plusieurs transformations enzymatiques (oxydations, réductions, cyclisations)

en partie catalysées par les terpène synthases, des enzymes cytochromes P450-dépendantes (Cheng et al., 2007 ; Bohlmann et Keeling, 2008). Les terpène synthases ont également la propriété de produire différents stéréoisomères, ce qui est crucial dans l'activité biologique des composés finaux (Gerschenzon et Dudareva, 2007), comme par exemple le gossypol, un terpène des feuilles de coton, qui est plus toxique pour les cellules animales sous sa conformation (-).

La voie chloroplastique, *via* les diterpènes, est notamment responsable de la biosynthèse des chlorophylles, des caroténoïdes et des tocophérols. La voie cytosolique quant à elle, conduit à la production de stérols membranaires notamment, ainsi que de triterpénoïdes volatiles, produits dans les fleurs et qui ont pour rôle d'attirer les insectes pollinisateurs. Certains isoprénoïdes constituent donc des composés vitaux pour la plante. A ce titre, plusieurs hormones dérivent de ce métabolisme : l'acide abscissique et les gibbérélines sont produits à partir de diterpènes, et les brassinostéroïdes à partir de sesquiterpènes (Kirby et Keasling, 2009).

La diversité de ces composés implique une régulation fine des voies de biosynthèse. Cette régulation est en partie assurée par la séparation des voies chloroplastique et cytosolique. Des enzymes clé, telles que l'HMGR, sont sujettes à des régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles (Chappell, 1995). De plus, l'expression d'isoformes spécifiques et leur association en métabolons, véritables chaînes de production (Jorgensen et al., 2005), permettraient de coordonner la production de composés particuliers (Chappell, 1995).

Les EST codant les enzymes de biosynthèse de la voie du mévalonate sont maintenant connus chez le Pommier (Newcomb et al., 2006). Toutefois, les terpènes synthases situées en aval de la synthèse des précurseurs restent à être caractérisées. Les principaux isoprénoïdes synthétisés par les feuilles de Pommier sont des sesquiterpènes (Bengtsson et al., 2001) : le  $\beta$ -caryophyllène, plusieurs énantiomères du farnesène et le germacrène D ont été détectés dans les feuilles de la variété Discovery, et sont potentiellement détectés par le carpocapse (voir paragraphe suivant).

#### *1.1.2.b) Régulation et rôles*

Les voies de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP qu'elles soient cytosoliques ou chloroplastiques, sont régulées de manière précise. Selon les espèces ou les organes

considérés, ces deux voies peuvent interagir et, par exemple chez la tomate, l'IPP produit dans le chloroplaste par la voie du DXP est le seul précurseur de la synthèse des monoterpènes et des sesquiterpènes (Yu et Utsumi, 2009). La contribution de chacune des voies à la production de précurseurs de terpènes est donc régulée par la plante et probablement liée aux conditions environnementales. Ainsi, la biosynthèse des isoprénoïdes est régulée en fonction du rôle des composés finaux (Cheng et al., 2007 ; Yu et Utsumi, 2009). Par exemple, la synthèse des composés destinés à attirer les insectes pollinisateurs est régulée par la lumière, et l'émission des composés eux-mêmes est fonction de la période d'activité de ces insectes (nocturnes ou diurnes).

Comme mentionné ci-dessus, la régulation de la synthèse d'IPP par la voie du mévalonate est essentiellement faite au niveau de la HMGR, aussi bien sur le plan transcriptionnel que post-traductionnel (Rodriguez-Concepcion, 2006). Concernant les voies du DXP, les régulations concernent seulement certaines enzymes. Le gène codant la LYTB (hydroxyméthylbutyrate-diphosphate réductase) est par exemple fortement exprimé lors la maturation des fruits de tomate ou bien dans le processus de dé-étiolement chez *Arabidopsis* (Rodriguez-Concepcion, 2006). De plus, il apparaît que les quantités cellulaires en intermédiaires réactionnels sont aussi à l'origine des régulations de l'expression des enzymes. Les régulations sont très variables selon les espèces étudiées, et en fonction de l'état physiologique des plantes. Les travaux de Numm et al. (2008) sur *Phaseolus lunatus* dans un système tritrophique (la plante, un insecte parasite et un insecte prédateur) montrent l'importance de la voie du DXP dans la production de monoterpènes en réponse au parasite, pour attirer l'insecte prédateur. Ce type de résultat n'est cependant pas observé sur *Brassica oleracea*, infesté par des lépidoptères du genre *Pieris*. Le MeJA est capable d'induire la production de terpénoïdes, ainsi que les attaques par les herbivores (Yu et Utsumi, 2009), par exemple le linalool et le farnésène chez plusieurs conifères (Keeling et Bohlmann, 2006), ce qui montre bien que la production de terpénoïdes peut être régulée et constituer une réponse des plantes à certains bioagresseurs.

Effectivement, la défense contre les herbivores est un des rôles les plus évidents pour les terpénoïdes, en dehors de ceux impliqués dans des fonctions basales (photosynthèse, stérols membranaires), à en juger par la présence de sesquiterpènes insecticides (cardenolides) dans le latex de certains arbres ou bien encore l'effet répulsif de certains mono- et diterpènes induits par l'acide jasmonique chez l'épicéa (Gerschenzon et Dudareva, 2007). L'ajout de linalool sur les feuilles de tabac permet de diminuer significativement

l'oviposition et la survie des œufs du lépidoptère *Manduca sexta* (Kessler et Baldwin, 2001). Il est important de noter tout de même, que dans la plupart des cas, c'est un ensemble de composés émis par la plante qui est efficace contre un parasite donné. En revanche, assez peu de données sont disponibles sur le rôle des terpénoïdes dans la résistance des plantes aux pathogènes bactériens, ou tout simplement sur leur activité antibactérienne. Il a été montré cependant dans le cadre de l'interaction entre *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* et le coton, que la résistance d'une variété est fortement corrélée à la production très localisée de sesquiterpènes (le 2,7-dihydroxycadalène et de ses formes oxydées) à des concentrations similaires à celles actives *in vitro* sur le pathogène, et avec une cinétique en accord avec l'arrêt de la croissance de la population bactérienne (Pierce et al., 1996). A l'inverse, la variété sensible étudiée dans cette espèce n'émet qu'une faible quantité de ces produits. Dans un autre cas, la transformation du menthone en néomenthol par une menthone réductase, très inductible en situation incompatible, est très corrélée avec la résistance du piment à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Choi et al., 2008). L'activité du néomenthol est très forte sur cette bactérie pathogène ainsi que sur *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, et l'extinction du gène codant cette menthone réductase provoque une plus grande sensibilité des plantes à *Xanthomonas*. Dans le cas décrit précédemment, l'accumulation constitutive de néomenthol provoque l'accumulation des PR-protéines PR-1 et PDF1.2, suggérant également un rôle d'activation de défense pour ce monoterpène (Choi et al., 2008). Une étude a montré qu'un diterpénoïde isolé de feuilles de tabacs infectés par le TMV est également capable d'induire la kinase WIPK ainsi que l'expression de plusieurs gènes de défenses, tels que *PR-1* et *PR-2*, sans induire la production d'acide salicylique (Seo et al., 2003). Ces deux résultats suggèrent que certains terpénoïdes participent à l'induction des défenses. De manière similaire, plusieurs phytostéroïdes et dérivés ont des fonctions de signalisation (Chappell, 2002), en particulier les brassinostéroïdes qui sont des régulateurs de croissance. Parmi les autres terpénoïdes ayant des propriétés antimicrobiennes, certaines saponines, qui proviennent de triterpénoïdes chez la plupart des angiospermes, sont actives contre les bactéries, mais cette activité est dans l'ensemble relativement faible et non efficace sur de fortes densités de population (Sparg et al., 2004).

Plusieurs terpénoïdes ont été identifiés dans les feuilles de Pommier. Les sesquiterpènes volatiles (farnésène, caryophyllène) produits par ces organes sont potentiellement responsables de l'attraction du carpocapse, car ce lépidoptère répond fortement à ces volatiles (Bengtsson et al., 2001). De manière intéressante, He et Liu (2007)

ont isolé certains triterpénoïdes de la peau de pommes de la variété Red Delicious montrant différents profils de substitution (hydroxylations, estérification par l'acide *p*-coumarylique). Plusieurs de ces composés ont une forte activité cytotoxique sur des cellules cancéreuses *in vitro*. Comme décrit ci-dessus, le MeJA induit la synthèse des terpénoïdes chez plusieurs espèces végétales. Dans le cas du Pommier, les données de transcriptomique du chapitre I suggèrent plutôt que les gènes codant les enzymes de cette voie sont régulés par l'acide salicylique.

### I.1.3. Les cystéines sulfoxydes

Les cystéine sulfoxydes sont des métabolites secondaires initialement identifiés chez l'oignon et dans toutes les espèces du genre *Allium* (Jones et al., 2004). Les cystéine sulfoxydes sont tous des dérivés de la cystéine, et sont issus d'une substitution sur le groupement thiol d'un radical alkyl (méthyl/propyl) ou alkenyl (propényl). Parmi, eux l'alliine, la S2-propénylcystéine sulfoxyde, est présente chez l'ail et bien caractérisée. Elle est un des principaux précurseurs responsables de l'odeur et de la saveur typiques de l'ail et de l'oignon. Sa synthèse comporte plusieurs étapes et le précurseur principal est le glutathion. Celui-ci est alkylé ou alkénylé et, par perte d'un résidu glycine suivie d'une oxydation, est transformé en  $\gamma$ -glutamyl S-alkyl cystéine sulfoxide (Jones et al., 2004). Après libération du groupement glutamyl, l'alkyl cystéine sulfoxide est finalement libéré et stocké dans le cytosol. La forme alkylée est une forme de stockage, non volatile, qui peut être activée par une alliinase ou cystéine lyase vacuolaire (Ramirez et Whitaker, 1998), suite à la rupture des compartiments intracellulaires. Cette enzyme (qui fonctionne comme une hydrolase) clive l'alkyl cystéine sulfoxide en ammonium, pyruvate et un thiosulfinate (R-SOH). Ce dernier, en fonction de la chaîne alkyl, peut avoir des propriétés lacrymales et, après diverses réactions, essentiellement par décomposition thermique (Rose et al., 2005), être responsable de l'odeur caractéristique (Jones et al, 2004), tel l'allicine de l'ail (un diallylthiosulfinate) issu de la transformation de l'alliine par l'alliinase. Les dérivés des cystéines sulfoxydes issus de leur transformation par des cystéines lyases ont des propriétés antibactériennes aussi bien contre les bactéries à Gram négatif, que positif, et il semble que cette activité antibactérienne varie selon les genres bactériens considérés (Harris et al., 2001), probablement en raison des perméabilités différentielles des parois bactériennes à ces produits. D'autres produits de transformation des cystéine sulfoxydes sont également actifs sur des pathogènes viraux et fongiques humains (Harris et al., 2001). De plus, il a été montré

que l'alicine exhibe une forte activité antioxydante, ainsi qu'une activité antihypertensive par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, un puissant vasoconstricteur dans les modèles animaux, et est également capable de prévenir la formation de certaines tumeurs (Rose et al., 2005).

Les cystéines sulfoxydes ne sont pas limitées au genre *Allium*. Effectivement, elles ont pu être détectées entre autres chez les légumineuses et les brassicacées, ainsi que d'autres familles botaniques (Ramirez et Whitaker, 1998 ; Jones et al., 2004 ; Rose et al., 2005). Des extraits chauffés de feuilles de chou exhibent une activité antimicrobienne contre *S. aureus*, essentiellement liée aux produits de dégradation de l'alicine (Kyung et al., 1997), ce qui suggère que les cystéines sulfoxydes des genres autres que *Allium* sont également bioactives. Ces métabolites secondaires, dont les données suggèrent un rôle dans la défense des plantes, n'ont jamais été identifiés jusqu'à présent chez le Pommier. La présence d'une alliinase fortement induite chez Evereste et MM106 au cours de l'interaction avec *Ea*, suggère cependant leur présence dans le genre *Malus* et ils pourraient également participer aux mécanismes de défense.

## **I.2. Résultats**

### **I.2.1. Profils des flavonoïdes solubles**

L'objectif de cette étude est d'identifier les flavonoïdes solubles présents dans les feuilles des deux génotypes Evereste et MM106. Comme décrit dans la littérature (Hunter et Hull, 1993 ; Treutter et al., 2001, Pontais et al., 2008), les jeunes feuilles des deux génotypes contiennent des dihydrochalcones en quantité importante (Fig.II.3. et 4.). Les profils foliaires en polyphénols des deux génotypes présentent un ou trois pics majeurs (Fig.II.3.). Le temps de rétention du pic **2** ( $R_t = 26,85$  min) correspond parfaitement avec celui d'un standard de phloridzine, ce qui est confirmé par son spectre de masse qui indique un ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  de rapport  $m/z = 435$ , ainsi qu'un fragment de rapport  $m/z = 273$ , correspondant à la perte d'un groupement glucose ( $[M-163]^-$ ). Ce composé est commun aux deux génotypes. Deux autres pics majeurs ont également été détectés dans les feuilles d'Evereste. Le pic **1**, correspondant au temps de rétention  $R_t = 24,95$  min, montre un ion pseudo-moléculaire  $m/z = 451$ , ce qui suggère qu'il est une forme hydroxylée de la phloridzine. Le pic **3** ( $R_t = 28,30$  min) pourrait correspondre à un isomère de la phloridzine

car son spectre de masse, similaire à cette dernière, montre un ion pseudo-moléculaire  $m/z = 435$ . Un pic mineur, détecté chez Evereste, dont le spectre de masse donne un ion  $[M-H]^-$   $m/z = 289$ , pourrait être attribué à une forme hydroxylée de la phlorétine. D'autres composés, présents en très faible quantité sur les chromatogrammes, exhibent des ions pseudo-moléculaires correspondant à la perte de deux atomes d'hydrogènes par rapport aux rapports  $m/z$  des composés majeurs. Cette perte de deux unités de masse suggère que ces composés sont des produits d'oxydation ou les formes chalcones des produits majeurs. La phlorétine n'est présente sur les chromatogrammes qu'à l'état de traces, à la différence des travaux de Pontais et al. (2008) dans lesquels cet aglycone a été détecté dans des échantillons lyophilisés. Ceci s'explique probablement car l'analyse décrite ici a été conduite sur des feuilles fraîches, limitant ainsi la libération de phlorétine à partir de la phloridzine, processus qui semble se produire au cours de la lyophilisation. D'autres flavonoïdes, tels que des flavanols, sont aussi présents à l'état de traces, ce qui est en accord avec le fait que ces derniers s'accumulent plutôt dans les fruits matures (Khanizadeh et al., 2008 ; Wojdylo et al., 2008).

Les composés **1**, **2** et **3** ont ensuite été isolés avec un rendement avoisinant les 60% pour chacun (par exemple, 600 mg du composé **1** à partir de 10 g de masse sèche de feuille). Leur structure chimique ont été déterminées par des analyses spectroscopiques, i.e. par RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , en utilisant les assignements précédemment décrits pour les DHC (Hilt et al., 2003 ; Ling et al., 2004). Comme expliqué ci-dessus, le composé **2** est caractérisé par un ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  de rapport  $m/z = 435$  qui peut être associé à la formule brute suivante,  $C_{21}H_{24}O_{10}$ . Les analyses  $^1H$  et  $^{13}C$ , accompagnées des données de la littérature (Hilt et al., 2003), ont permis d'identifier le composé **2** comme étant la phloridzine. Le produit **3** possède la même formule brute que le **2** mais son spectre RMN  $^1H$  révèle un profil de substitution différent de l'aglycone (phlorétine) sur le noyau A. En effet, les protons H-5' et H-3' apparaissent comme des ions singlets (2H), indiquant une O-glucosylation sur le carbone C-4'. Ceci a pu être confirmé après une étude détaillée de son spectre RMN  $^{13}C$  (Tableau II.2.), ainsi que des corrélations HMBC. Le composé **3** a pu être ainsi identifié comme étant la trilobatine (phlorétine-4'-O-glucoside ; Ling et al., 2004). En comparaison des composés **2** et **3**, l'ion pseudo-moléculaire du composé **1** exhibe une augmentation de 16 unités de masse ( $m/z = 451$ ), suggérant la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire. Dans son spectre RMN  $^1H$ , les protons aromatiques du noyau B sont caractérisés par un système ABX de spins (absence d'équivalence au point de vue

déplacement chimique) à  $\delta$ H 6,39 (1H, d, J = 2,0 Hz), 6,33 (1H, d, J = 8,5 Hz) et 6.51 ppm (1H, dd, J = 8,5, 2,0 Hz) respectivement. Le composé **1** est donc supposé être un dérivé 3-hydroxylé de la trilobatine (**3**), soit la sieboldine (3-hydroxyphlorétine-4'-O-glucoside ; Ling et al., 2004), ce qui est encore une fois confirmé par le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Tableau II.2. ) et l'analyse des corrélations HMBC. La voie de biosynthèse de la phloridzine a été récemment caractérisée (Judgé et al., 2008 ; Gosch et al., 2009), mais la détection de la trilobatine et de la sieboldine à des niveaux constitutifs élevés suppose l'existence d'autres réactions enzymatiques dans la synthèse des DHC chez le Pommier. La trilobatine pourrait être issue de l'isomérisation de la phloridzine ou bien d'une glucosylation spécifique en 4' de la phlorétine. L'hydroxylation de la trilobatine sur le noyau B par une activité de type crésolase (cf. partie II de ce chapitre) aboutirait à la production de sieboldine. Une autre hypothèse est également envisageable, i.e. que la sieboldine puisse être issue de l'extension de l'acide caféique par la CHS, puis de la glucosylation en 4' de la 3-hydroxyphlorétine.

Les compositions phénoliques entre les feuilles d'âges différents sont qualitativement similaires au sein d'un même génotype, mais pas quantitativement (Fig.II.3. et 4.). En effet, la quantité en polyphénols solubles dans les feuilles les plus jeunes, calculée à partir de la somme de chaque composé isolé, est plus grande que celle des feuilles âgées, en particulier chez MM106, dont les jeunes feuilles contiennent trois fois plus de phloridzine que les feuilles matures (Fig.II.4.). De plus, la quantification de chacun des composés confirme qu'il n'y a pas de grande différence dans la quantité totale en DHC entre les deux génotypes, comme montré précédemment (Pontais et al., 2008). La phloridzine représente plus de 95% des DHC présentes dans les feuilles de MM106, mais chez Evereste, la même quantité de DHC est représentée par les trois composés, i.e. sieboldine, phloridzine et trilobatine (Fig.II.4.). La trilobatine et la sieboldine ont été précédemment identifiées dans d'autres espèces de *Malus* (Williams, 1964 ; Hunter, 1975). Toutefois, leurs capacités antioxydantes n'ont jamais été décrites jusqu'à présent. Les tests de piégeage du DPPH, qui évalue une activité antiradicalaire globale (Sharma et Baht, 2009) et de l'ORAC, qui évalue la capacité antioxydante à bloquer les attaques en chaîne par les radicaux peroxydes (Ou et al., 2001) ont alors été testés sur les composés purs. L'hypothèse est que la présence constitutive de composés antioxydants chez Evereste pourrait permettre de contrecarrer le choc oxydant induit au cours de l'interaction, et ainsi de limiter la propagation de la mort cellulaire (cf. Chapitre I).

## I.2.2. Activités antioxydantes des DHC purifiées à partir des feuilles

Pour déterminer si les polyphénols solubles des feuilles de *Malus* peuvent participer de manière significative au potentiel antioxydant total, les tests de piégeage du DPPH et de l'ORAC ont été appliqués aux composés purs (Fig.II.5.). La phlorétine, l'aglycone de la phloridzine, a également été incluse, pour tenter de déterminer quels pharmacophores influencent l'activité antioxydante. Les deux tests ont donné des résultats différents. La sieboldine s'est révélée être la DHC la plus efficace dans la réduction du DPPH, à la fois par une forte activité équivalente au Trolox (TEAC, 3  $\mu\text{mol}$  de Trolox par  $\mu\text{mol}$  de sieboldine, environ 10 fois plus que les autres DHC) et une cinétique de réduction très rapide. Cette très forte activité est très certainement due à la présence du groupement hydroxyle porté par le carbone 3 du noyau A, conférant la structure *o*-diphénol, bien connue pour conférer de fortes propriétés antioxydantes (Rice-Evans et al., 1997). Pour ce même test, la phloridzine montre la plus faible activité, et aucune différence significative n'est observée entre la trilobatine et la phlorétine, ces deux composés étant néanmoins 2 fois plus actifs que la phloridzine. De plus, les cinétiques de réduction du DPPH par ces composés sont lentes, puisqu'en 40 minutes, moins de 50% de la quantité initiale de DPPH a été réduite. En revanche, la phloridzine s'est révélée être la plus active des DHC dans le test ORAC (activité équivalente à 15  $\mu\text{mol}$  de Trolox/ $\mu\text{mol}$  de phloridzine). Deux autres antioxydants bien connus chez les plantes, le glutathion et l'acide ascorbique (Noctor et Foyer, 1998), ont été utilisés dans les mêmes conditions, en tant que références. Leur activité est cependant faible dans les deux tests antioxydants utilisés. Ceci est probablement dû au fait que les formes radicalaires de ces deux composés ne sont pas régénérées *in vitro*, alors qu'*in vivo*, cette régénération est assurée par des activités enzymatiques spécifiques, i.e. les déhydroascorbate et monodéhydroascorbate réductases et la glutathion réductase (Hernandez et al., 2008). Toutefois, la cinétique de réduction du DPPH par l'acide ascorbique est similaire à celle de la sieboldine, c'est-à-dire très rapide. La figure II.5.C compare l'activité de piégeage du DPPH de la sieboldine à celle d'autres produits phénoliques. Son activité est similaire à celle des composés ayant le même profil de substitution, i.e. un groupement *o*-diphénol (catéchine, épicatechine et l'acide caféique). La quercétine, qui possède une substitution additionnelle sur le noyau C, exhibe une très forte activité dans ce test. Les activités antioxydantes des DHC isolés des feuilles de Pommier peuvent être ainsi classées différemment selon le test utilisé : phloridzine > sieboldine > trilobatine > phlorétine pour le

test ORAC et sieboldine > phlorétine = trilobatine = phloridzine pour le test DPPH. Une étude récente montre que plusieurs autres DHC ont des capacités antioxydantes spécifiques et qu'elles inhibent plus efficacement la peroxydation des lipides que les flavanones qui leur sont analogues (Nakamura et al., 2003). De plus, il a été montré que l'activité antioxydante de la phloridzine est faible en comparaison des autres polyphénols présents dans la pomme, mais qu'elle est toutefois légèrement plus active que l'acide ascorbique dans le piégeage de l'anion superoxyde (Lu et Foo, 2000). Ces données sont donc en accord avec les résultats présentés ici, qui indiquent que certaines dihydrochalcones, telles que la phloridzine et la sieboldine, ont de fortes activités antioxydantes qui peuvent être spécifiques d'un radical donné.

### 1.2.3. Activités antioxydantes des feuilles d'Evereste et de MM106

#### *1.2.3.a) Activité des extraits méthanoliques de feuilles*

Les activités antioxydantes des extraits de feuilles jeunes et âgées prélevées sur les deux génotypes ont été déterminées par les tests DPPH et ORAC, et les résultats sont présentés dans la figure II.6.A. Dans le test de réduction du DPPH, les extraits des jeunes feuilles d'Evereste exhibent la plus forte activité, environ 5 fois plus que celle des extraits de MM106, qui ont une activité très faible. Concernant l'activité des feuilles âgées d'Evereste, celle-ci est intermédiaire. Des résultats différents ont été observés avec le test ORAC, dans lequel les extraits de feuilles jeunes d'Evereste et les extraits de feuilles âgées des deux génotypes montrent des activités similaires (environ 500  $\mu\text{mol}$  de Trolox par g/MF). L'activité des extraits de feuilles jeunes de MM106 est la plus forte pour ce test (plus de 1000  $\mu\text{mol}$  de Trolox par g/MF).

Bien que la somme des activités antioxydantes de chacun des composés ne corresponde pas exactement à l'activité mesurée sur les extraits (Fig.II.6.B), il y a une forte corrélation entre celle de chacun des composés, leur concentration dans la feuille, et l'activité des extraits totaux. En effet, des calculs théoriques montrent que les DHC majeures identifiées dans cette étude représentent entre 70 et 140% de l'activité mesurée dans les extraits de feuilles, et ce dans les deux tests (Fig.II.6.B). Par exemple, les calculs d'activité totale théorique, basés sur les concentrations en DHC dans les jeunes feuilles d'Evereste et de l'activité individuelle de chacun de ces composés, donnent une activité de réduction du

DPPH équivalente à 170  $\mu\text{mol}$  de Trolox par g de MF, alors que la mesure expérimentale est de 250  $\mu\text{mol}$  de Trolox par g de MF dans ce même test. La phloridzine est présente en très forte concentration dans les jeunes feuilles de MM106 et participe à la capacité d'absorption de l'oxygène radicalaire des feuilles, car comme montré Fig.II.6.B, les activités antioxydantes calculées et mesurées sont très similaires (1700  $\mu\text{mol}$  de Trolox par g/MF). En outre, les feuilles d'Evereste ont de plus petites quantités de phloridzine que celles de MM106 mais contiennent en plus de la trilobatine et de la sieboldine (Fig.II.4.), cette dernière ayant une très forte activité de piégeage du DPPH. Sa présence corrèle donc fortement avec la capacité antioxydante des feuilles mesurée avec ce test. De manière similaire, la plus faible teneur en phloridzine dans les feuilles d'Evereste corrèle très bien avec l'activité ORAC plus faible que celle mesurée pour les extraits de MM106. Toutefois, il est important de noter que l'activité antioxydante des feuilles implique également d'autres systèmes antioxydants, notamment enzymatiques, tels que la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase.

### *1.2.3.b) Protection contre le choc oxydant induit par le paraquat*

Le paraquat est un herbicide connu pour bloquer le photosystème I et induire la production de FAO (anion superoxyde), conduisant à la mort cellulaire (Donahue et al, 1997). Les effets du choc oxydant induit par le paraquat peuvent être suivis *in vitro* en mesurant la conductivité du milieu dans lequel incubent des disques foliaires préalablement infiltrés avec l'herbicide. En effet, le choc oxydant et la mort cellulaire provoqués par le paraquat vont être à l'origine de perturbations membranaires et donc de fuites d'électrolytes vers le milieu extérieur. L'hypothèse est que la forte activité antioxydante constitutive des feuilles d'Evereste (Fig.II.6.A) puisse bloquer ou tout du moins limiter les effets de ce choc oxydant. Ainsi, les compositions phénoliques constitutives des jeunes feuilles d'Evereste et de MM106 (Fig.II.3.) pourraient avoir un effet sur la sensibilité des deux génotypes au paraquat. La conductivité de la solution d'incubation contenant les disques foliaires d'Evereste ou de MM106, pré-infiltrés avec du paraquat, est montrée dans la figure II.7. Les 10 disques utilisés dans cette expérience représentent environ 2,5 mg de DHC au total dans les deux génotypes, soit environ 6  $\mu\text{mol}$  d'équivalents phloridzine (calculs basés sur les données de la figure II.4.). Les fuites d'électrolytes à partir des tissus foliaires de MM106 infiltrés par le paraquat augmentent plus vite que dans ceux d'Evereste, pour les plus fortes concentrations en herbicide (10 et 100  $\mu\text{M}$ ). Le maximum de fuite pour les disques de feuilles de MM106 est

obtenu en moins de 5 et 15 h aux concentrations 100 et 10  $\mu\text{M}$  de paraquat respectivement, contre 12 et 20 h dans les disques de feuilles d'Evereste, aux mêmes concentrations. La plus faible concentration de paraquat testée (1  $\mu\text{M}$ ) n'a pas d'effet sur Evereste, alors qu'elle provoque toujours une augmentation des fuites dans les tissus foliaires de MM106 (Fig.II.7.). En conséquence, les jeunes feuilles d'Evereste sont moins sensibles que celles de MM106 au choc oxydant induit par le paraquat.

La forte activité de réduction du DPPH des jeunes feuilles d'Evereste, en corrélation avec la présence de sieboldine, correspond bien à la tolérance des disques foliaires de ce génotype au stress photooxydant. A l'inverse, la forte activité ORAC des jeunes feuilles de MM106, ainsi que les fortes concentrations de phloridzine qu'elles contiennent, ne corrélient pas avec une tolérance accrue au paraquat. Tabart et al. (2009) ont montré très récemment que les différents tests antioxydants *in vitro* disponibles ne sont pas nécessairement corrélés pour un même composé. Les résultats obtenus ici pour la sieboldine et la phloridzine illustrent très bien ce concept, et montrent l'importance d'utiliser plusieurs tests antioxydants pour caractériser un composé. De plus, l'interprétation de ces tests *in vitro* quant à une réelle signification biologique est parfois limitée, car la manière dont les activités sont évaluées ne reflète pas forcément les processus biologiques (Huang et al., 2005). Toutefois, dans le cas présent, les valeurs obtenues avec le test DPPH corrélient fortement avec le test de tolérance au paraquat, qui met en jeu la capacité de piégeage de l'anion superoxyde (Donahue et al., 1997).

La présence de sieboldine, très antioxydante, dans les feuilles d'Evereste, et le fait qu'elle soit absente des feuilles de MM106, suggèrent son implication dans la résistance d'Evereste à *Erwinia amylovora*. En effet, une des hypothèses présentées à l'issue du Chapitre I était la présence d'une activité antioxydante constitutive forte chez Evereste, impliquée dans le blocage de la propagation de la mort cellulaire induite par le choc oxydant, freinant ainsi l'avancée du pathogène. La sieboldine est donc, à ce stade, très prometteuse pour expliquer une partie de la résistance d'Evereste, et ce d'autant plus qu'elle semble conférer aux feuilles d'Evereste une forte tolérance à l'anion superoxyde (résultats du test au paraquat ; Fig.II.7.), lequel est effectivement produit au cours de l'interaction (Venisse et al., 2002). Les feuilles de MM106 contiennent une importante concentration de phloridzine qui confère tout de même une forte activité antioxydante d'inhibitions des attaques en chaîne par les radicaux peroxydes (résultats du test ORAC). Ainsi, ce génotype sensible n'est pas non plus dépourvu d'une activité antioxydante, et il se pourrait que cette propriété

participe à limiter la peroxydation des lipides au cours de l'interaction avec *Ea* (Fig.II.7.B ; Venisse et al., 2001). Effectivement, le test ORAC teste la capacité d'un produit à bloquer les oxydations en chaînes provoquées par les radicaux peroxydes  $ROO^{\bullet}$ . Ce processus est quelque peu similaire à celui de la peroxydation des lipides *in vivo* et implique deux étapes, une d'initiation par les FAO et une de propagation par les radicaux peroxydes, la lipoperoxydation aboutissant finalement à l'altération des membranes biologiques (Fig.II.8.). Les activités ORAC suggèrent que la sieboldine et la phloridzine sont capables de limiter l'étape de propagation. La sieboldine par contre, comme suggéré par sa forte activité antiradicalaire, pourrait également être efficace sur l'étape d'initiation, en bloquant les FAO avant qu'ils ne puissent initier le processus. Dans ce cas, la peroxydation des lipides chez Everest pourrait se produire de manière localisée mais serait très vite bloquée par la présence simultanée de sieboldine et de phloridzine. Chez MM106, le choc oxydant initierait la lipoperoxydation mais sa propagation serait contrôlée par la présence de phloridzine, avec pour conséquence le blocage seulement partiel du processus et une altération membranaire ménagée.

Pour continuer la caractérisation des DHC constitutives des feuilles de Pommier et déterminer leur rôle dans l'interaction avec *Ea*, leur pouvoir antibactérien contre ce pathogène a ensuite été testé.

#### I.2.4. Activités antibactériennes

Beaucoup de métabolites secondaires, en particulier les produits phénoliques et les flavonoïdes, sont connus pour avoir des activités antimicrobiennes (Cowan, 1999). Par exemple, plusieurs conjugués de l'épicatéchine et de l'acide gallique (appartenant à la famille des théaflavines présentes dans le thé) sont efficaces contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, à faibles concentrations (Hamilton-Miller, 1995). Une étude plus récente montre également que les bactéries à Gram-positif sont plus sensibles aux polyphénols que les Gram-négatives, et que différents flavan-3-ols et tannins sont plus efficaces contre le genre *Vibrio*, que contre *E. coli* ou encore le genre *Salmonella* (Taguri et al., 2004). Concernant les DHC, les données de Pontais et al. (2008) indique que la phlorétine a une forte activité antimicrobienne (à 1 mM) qui est pH-dépendante (plus efficace à pH acide).

L'activité de la sieboldine et de la phloridzine a été testée en mettant la bactérie en contact avec différentes concentrations de ces composés pendant 2 h. A l'issue de

l'incubation à pH 5,5, un prélèvement du milieu d'incubation est utilisé pour inoculer du milieu LB et la croissance de la bactérie est suivie en continu dans ce dernier. La gamme de concentrations a été choisie de manière à encadrer les concentrations physiologiques (entre 2,5 et 5 mM selon des calculs théoriques). La trilobatine n'a pas pu être testée car son extraction des feuilles d'Evereste n'a pas été suffisante. En revanche, elle devrait être testée rapidement car, à notre demande, elle a pu être synthétisée chimiquement par la société Extrasynthèse (Genay, France).

Les courbes de croissance de la bactérie montrent qu'aux fortes concentrations, les deux DHC sont efficaces, la sieboldine étant plus active que la phloridzine. A 5 mM, la sieboldine provoque toujours un retard de croissance de la bactérie alors que ce n'est pas le cas de la phloridzine (Fig.II.9). En dessous de cette concentration, les deux DHC n'ont plus d'effet sur *Ea*. A pH 7,5, aucune activité n'a été observé, quelle que soit la concentration utilisée (jusqu'à 10 mM, données non montrées). Ces résultats indiquent donc que la sieboldine et la phloridzine sont potentiellement actives contre *Ea* (à un pH proche de celui de l'apoplaste dans des tissus infectés ; Pontais et al., 2008) bien que leur effet semble davantage bactériostatique que bactéricide, et que la sieboldine est plus efficace que la phloridzine.

Ainsi, les jeunes feuilles d'Evereste contiennent, de manière constitutive, un composé, la sieboldine, qui est fortement antioxydante et également bactériostatique. En combinaison avec d'autres mécanismes de défenses (cf Chapitre I, par exemple les occlusions vasculaires, la reprogrammation du métabolisme primaire, ainsi que l'expression de LTP15), la sieboldine pourrait donc participer à la résistance d'Evereste à *Ea*. Pour tester cette hypothèse, il a été entrepris de phénotyper plusieurs descendants issus du croisement entre Evereste et MM106, choisis pour leur résistance ou leur sensibilité à *Ea*, et déterminer leur(s) DHC constitutive(s).

### I.2.5. Profilage métabolique de 18 descendants issus du croisement entre Evereste et MM106

Les données précédentes montrent clairement que la sieboldine pourrait être impliquée dans la résistance d'Evereste, (i) par ses fortes propriétés antioxydantes qui participeraient au contrôle du choc oxydant induit par la bactérie et au blocage de la peroxydation des lipides et (ii) par ses propriétés bactériostatiques, qui exerceraient un effet

inhibiteur sur la croissance bactérienne. Plus de 200 descendants issus du croisement entre Everest et MM106 ont été obtenus précédemment et les données concernant leur phénotypage pour la résistance à *Ea* sont disponibles (Durel et al., 2009). Ces descendants constituent un outil précieux pour mettre à l'épreuve les hypothèses formulées à partir de l'étude des parents Everest et MM106. Leur phénotypage pour la présence de sieboldine devrait donc indiquer si la présence de ce composé est indispensable à la résistance.

Dix-huit descendants ont été choisis parmi des individus résistants et d'autres sensibles. Des jeunes feuilles ont été prélevées sur ces individus à l'état constitutif (non infectés), les polyphénols ont été extraits comme pour Everest et MM106 puis analysés par HPLC. Les descendants présentent soit le profil d'Everest (3 pics majeurs, sieboldine, phloridzine et trilobatine) soit le profil de MM106 (1 pic majeur, phloridzine), et la sieboldine est détectée aussi bien chez des individus résistants que chez des individus sensibles (Fig.II.10.). Les concentrations montrent une grande variabilité entre les différents individus ayant un même profil, et suggèrent que la quantité de DHC est vraisemblablement gouvernée par des facteurs génétiques.

Plus de la moitié des descendants sensibles possèdent la sieboldine, et dans des quantités similaires à celles observées chez les individus résistants. Seuls deux de ces descendants résistants n'ont que la phloridzine, ce qui suggère que la sieboldine pourrait jouer un rôle dans la résistance, sans être suffisante. Ces données de phénotypage ont été transformées (présence/absence de sieboldine) pour tenter de cartographier ce caractère sur un des groupes de liaison d'Everest. Le résultat montre que la région codante pour la synthèse de sieboldine (GL7) n'est pas sur le même groupe de liaison que le QTL majeur de résistance au feu bactérien (GL12) (Durel, com. pers.), renforçant l'observation que la sieboldine ne participe pas directement à la résistance contre le feu bactérien. Des travaux de phénotypage d'une collection de souches d'*Erwinia amylovora* sur MM106, Everest et Robusta, un autre génotype résistant, indiquent que globalement Everest est quantitativement plus résistant que Robusta. En effet, certaines souches très agressives provoquent le feu bactérien sur Robusta tandis que ces mêmes souches induisent des symptômes moins importants sur Everest. Par contre, MM106 est toujours très sensible quelle que soit la souche. Ces observations sont tout à fait intéressantes car Robusta ne possède que la phloridzine (données non montrées), similairement à MM106. En conséquence, la sieboldine pourrait participer de manière quantitative à la résistance. Pour vérifier cette hypothèse, plusieurs souches d'agressivités différentielles devront être testées

sur les descendants sensibles possédant la sieboldine pour déterminer si la présence de cette dernière permet de diminuer la sévérité des symptômes.

Il serait également intéressant de déterminer si la sieboldine ou la trilobatine peuvent être associées à la résistance à d'autres bioagresseurs, tels *Venturia inaequalis* ou le puceron cendré par exemple. En effet, une étude a montré que la trilobatine diminuait l'infestation par le puceron vert *Schizaphis graminum* (Kubo et Matsumoto, 1985).

Ainsi, les données obtenues par l'analyse des descendants est plutôt en défaveur d'un rôle de la sieboldine dans la résistance du Pommier contre *Ea*. D'autres études sont à réaliser pour compléter ces résultats, et déterminer la signification biologique de ce composé, antibactérien et fortement antioxydant, dans les feuilles de Pommier. De manière plus générale, la résistance à d'autres stress biotiques et abiotiques sera étudiée pour tenter de comprendre le rôle des DHC, ces flavonoïdes présents en très forte concentration chez le Pommier. De plus, la détermination de la localisation tissulaire et cellulaire de la sieboldine devrait permettre de comprendre pourquoi ce composé n'est pas impliqué dans la résistance, malgré ses propriétés antioxydantes et antibactériennes. Il se pourrait que sa localisation diffère de celle des tissus préférentiellement attaqués par la bactérie (parenchyme lacuneux entre autres). La localisation de la sieboldine est actuellement en cours de détermination à l'aide de coloration sur des coupes histologiques, et fait également l'objet d'une collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de la Technopôle de Metz, pour une analyse par imagerie par spectrométrie de masse.

Dans un but de valorisation de la sieboldine, deux autres tests ont été réalisés en collaboration avec l'équipe SONAS de l'Université d'Angers et BNVI de la Faculté de Médecine d'Angers. En effet, puisque ce composé exhibe une très forte activité antioxydante et que sa présence dans les feuilles corrèle très bien avec la résistance au choc oxydant induit par le paraquat, il semble qu'il dispose d'une bioactivité qui pourrait être intéressante *in vivo*.

### 1.2.6. Bioactivités des dihydrochalcones

Dans cette partie deux tests complémentaires ont été conduits sur la sieboldine et la phloridzine : (i) la capacité à prévenir la contraction de segments d'artères de rat par un vasocontractant, la phényléphrine et (ii) la capacité à inhiber la réaction de Maillard responsable de la formation de produits avancés de glycation (AGE). Le premier test est un

criblage pour évaluer les propriétés vasorelaxantes et donc antihypertensives d'un composé. Le second permet de déterminer la capacité d'un composé à empêcher la glycation des protéines, qui est à l'origine de nombreux dysfonctionnements (Singh et al., 2001 ; Goldin et al., 2006).

#### *1.2.6.a) Activité vasorelaxante de segments d'artères mésentériques de rat*

La résistance des artères contrôle le débit sanguin qui arrive jusqu'aux tissus, grâce à leur capacité à adapter leur diamètre en réponse à la pression sanguine et au débit. La contraction des artères peut être assurée par la formation d'anions superoxydes produits par des NADPH oxydases (Luscher et al., 1992 ; Alvarez et al., 2008). Cette contraction induite par l'anion superoxyde peut ainsi être prévenue par des antioxydants efficaces. Par conséquent, la capacité des DHC à bloquer les effets induits par la phényléphrine, qui provoque une contraction dépendante de l'anion superoxyde mais indépendante de facteurs de l'endothélium sur des cellules musculaires lisses (Alvarez et al., 2008), a été testée. Ce test a déjà été utilisé pour démontrer les propriétés vasorelaxantes de dérivés de la catéchine isolés du thé vert (Huang et al., 1998). Comme montré dans la figure II.11.A, la phényléphrine à  $5 \times 10^{-5}$  M provoque la contraction des artères mésentériques de rat (contrôle). Cette contraction ne peut être prévenue par la pré-incubation de la phloridzine à  $10^{-5}$  M, alors qu'avec la pré-incubation de la sieboldine à la même concentration, la contraction est diminuée d'environ 50 % par rapport au contrôle. La concentration utilisée ici correspond à une quantité finale de 50 nmol dans la cuve du myographe, soit à une quantité trouvée dans environ 1 mg de feuille fraîche. L'apocynine (un inhibiteur des NADPH oxydases) et le Tempol (un mimétique de l'activité superoxyde dismutase ; Wilcox et Pearlman, 2008) sont tous les deux plus efficaces dans la prévention de la contraction que les deux DHC. Des courbes dose-réponse cumulatives de sieboldine ou de phloridzine sur des artères pré-contractées (par de la phényléphrine à  $10^{-6}$  M) montrent que ces deux composés n'ont pas d'effet une fois que l'artère est contractée, aux concentrations utilisées ici. Bien que l'implication des NO synthases et d'autres facteurs vasorelaxants ne puisse être rejetée, la forte activité antioxydante mesurée *in vitro* pour la sieboldine suggère qu'elle peut piéger l'anion superoxyde de manière efficace dans un modèle *ex vivo*. Toutefois, étant donné que la phloridzine est rapidement convertie en phlorétine *in vivo* et qu'elle est principalement sécrétée dans les urines (Ehrenkranz et al., 2005), il est possible qu'il en soit de même pour

la sieboldine et que ses concentrations tissulaires après administration sur un modèle animal ne seront significatives *in vivo* que dans le cadre d'administrations prolongées. La sésamine, un lignane (dimère de monolignols) isolé de graines de sésame et de leur huile, est active *in vivo* sur l'hypertension. Elle est rapidement convertie en d'autres métabolites par le foie, et les concentrations plasmatiques qu'elle atteint sont d'environ 0,2  $\mu\text{mol/L}$  (Nakano et al., 2006). A cette concentration, la sieboldine ne serait peut-être pas assez active pour produire des effets physiologiques, mais son action dépendra grandement de sa biodisponibilité et de son métabolisme *in vivo*.

#### *1.2.6.b) Inhibition de la formation des produits avancés de glycation (AGEs)*

La capacité de la phloridzine et de la sieboldine à bloquer le processus de formation des AGEs a été estimée à partir d'un protocole adapté de Vinson et Howard (1996), en comparaison avec celle de l'acide ascorbique, du glutathion, du Trolox et du composé de référence, l'aminoguanidine. La formation des AGEs se fait selon le processus de la réaction de Maillard qui résulte d'une attaque nucléophile non-enzymatique d'un groupement carbonyle sur un groupement amine. Typiquement, cette réaction peut intervenir entre un aldose comme le D-glucose dont le cycle est ouvert et un groupement aminé d'une protéine (par exemple celui porté par une L-lysine). De manière plus générale, n'importe quel sucre réducteur dont le groupement carbonyle est libre peut interagir et se condenser avec un groupement amine, tel qu'il y en a dans certains lipides et dans les acides nucléiques, processus dénommé glycation. Le premier intermédiaire réactionnel est une base de Schiff, qui peut subir de manière réversible une déshydratation puis un réarrangement pour former un groupement 1-amino-1-deoxycétose qui est le lien entre les deux molécules initiales. La molécule résultante est également appelée produit d'Amadori (Zhang et al., 2009). Le produit de réaction entre le D-glucose et la L-lysine par exemple est la fructoselysine. Alors que l'aldose ouvert peut subir une cyclisation, il peut également y avoir clivage et libération par rétro-aldolisation d'espèces dicarboxylées comme le glyoxal, le méthylglyoxal et le 3-déoxyglucosone. De tels composés sont susceptibles d'être formés également par auto-oxydation du D-glucose, sans intervention d'un groupement aminé (Thornalley et al., 1999) et sont responsables du stress carbonyle. Ces espèces, appelées IGP (Intermediates Glycation Products) peuvent réagir à leur tour avec des groupements amines des protéines. La conjugaison des protéines avec les IGP peut conduire à des phénomènes de cross-linking

intra et inter-molécules, altérant ainsi leur structure et leur activité. Certains produits d'Amadori non cycliques sont capables d'interagir avec le groupement guanidyl des arginines pour former, de manière non-oxydative, du glucosepane ou, par oxydation, de la pentosidine. Ces deux molécules sont considérées comme des AGEs. Ces interactions sont, elles aussi, à l'origine de cross-link intra- et inter-protéiques (Biemel et al., 2001), responsables de désordres physiologiques (Goldin et al., 2006). Les AGEs sont associés à plusieurs complications du diabète, car l'hyperglycémie résultante de cette pathologie favorise la glycation des protéines et est également responsable d'un stress oxydant (Singh et al., 2001 ; Reddy et Beyaz, 2006).

Les résultats du test d'inhibition de la formation des AGEs (Fig.II.11.B) indiquent qu'en comparaison avec le composé de référence, l'aminoguanidine qui est récemment entré dans les phases II des essais cliniques mais qui a été éliminé en raison de ses effets secondaires (Reddy et Beyaz, 2006), les deux DHC sont clairement plus efficaces. La sieboldine a une concentration inhibitrice de 50% de la formation des AGEs ( $IC_{50}$ ) 40 fois plus faible (0,2 mM) que celle de l'aminoguanidine, et 10 fois plus faible que celle de la phloridzine. Cette concentration en sieboldine équivaut à celle trouvée dans 5 g environ de feuille fraîche. Les propriétés anti-AGE sont liées au blocage de la réaction de Maillard, directement par interférence avec le sucre ou le groupement amine, ou bien encore par le blocage de la dégradation des produits d'Amadori par les FAO, ou bien encore par la neutralisation des espèces carbonyles et dicarboxyles par conjugaison. Les AGEs peuvent également être dégradés par certains composés capables de rompre les liaisons résultant du cross-linking (Reddy et Beyaz, 2006). Le test d'inhibition de formation des AGEs utilisé dans la présente étude ne permet pas de conclure sur le(s) mécanisme(s) précis lié(s) à la diminution de la formation de ces produits par la phloridzine et la sieboldine, mais une étude récente démontre que la phloridzine et la phlorétine sont capables de se conjuguer au glyoxal et au méthylglyoxal, des espèces dicarboxylées (Shao et al., 2008). La sieboldine, étant bien plus active que la phloridzine dans l'inhibition de la formation des AGEs, et étant donné ses puissantes propriétés antioxydantes, elle pourrait également agir sur la formation des IGP par piégeage des FAO.

### I.3. Conclusion sur les DHC constitutives

Les données présentées ci-dessus montrent que certaines DHC participent au potentiel antioxydant des feuilles de Pommier. Toutefois, ces données ne sont pas en faveur d'un rôle direct de la sieboldine ni des autres DHC étudiées dans la résistance d'Evereste à *Erwinia amylovora*. Des études complémentaires seront prochainement réalisées pour obtenir plus d'informations quant aux rôles des DHC dans les feuilles de Pommier. Ces composés sont présents en très fortes concentrations, mais malgré cela, aucun rôle évident ne peut leur être attribué, en dehors peut-être de leur capacité à absorber les UV, bien que cela n'ait pas été montré expérimentalement (Treutter, 2006). Les activités antioxydantes différentielles des DHC isolées de feuilles de Pommier suggèrent qu'elles participent à l'homéostasie du potentiel redox des cellules. Les données de tolérance au paraquat sont en accord avec cette hypothèse (Fig.II.7.A) et même si MM106 est moins tolérant qu'Evereste à cet herbicide, il semble probable que cette sensibilité serait exacerbée si MM106 contenait moins de phloridzine, qui a tout de même une forte activité antioxydante, mesurée avec le test ORAC.

En plus de démontrer la bioactivité de la sieboldine, les résultats mettent en évidence le potentiel et les propriétés complémentaires thérapeutiques de cette DHC, (i) dans la prévention de l'hypertension (Fig.II.11.A) et (ii) dans la diminution des complications liées à la formation d'AGEs (Fig.II.11.B). Les troubles de l'endothélium, l'hypertension et le risque d'athérosclérose sont non seulement associés avec une forte activité NADPH oxydase et une production accrue d'anion superoxyde dans les vaisseaux humains, mais également avec une augmentation de la concentration en AGEs circulants (Goldin et al., 2006 ; Guzik et al., 2000). Ainsi, il serait très intéressant de doser la capacité de la sieboldine à prévenir l'hypertension *in vivo* et à limiter les risques d'athérosclérose. De plus, la phloridzine est déjà bien connue pour augmenter la glycosurie et contribuer à la diminution de la glycémie chez les animaux (Ehrenkranz et al., 2005). En synergie avec les effets hypoglycémisants de la phloridzine, un traitement avec de la sieboldine pourrait être prometteur pour limiter les complications associées au diabète. Les deux derniers tests présentés ici (Fig.II.11) renforcent le fait que la sieboldine a une activité antioxydante très forte, et suggèrent qu'elle puisse être utilisée en tant que médicament ou additif alimentaire pour diminuer les risques de maladies liées au stress oxydant. Ainsi, la sieboldine pourrait être qualifiée d'antioxydant « multi-usage » (Zhang et al., 2006). Ces résultats prometteurs encouragent la

poursuite des études de la sieboldine sur des modèles *in vivo*. De plus, toujours en collaboration avec l'équipe SONAS de l'Université d'Angers, un protocole de purification de la sieboldine par chromatographie de partage centrifuge a été mis au point, ce qui facilitera grandement son extraction, avec un meilleur rendement. Ceci était une étape indispensable pour pouvoir mettre en place une large batterie de tests visant à mieux caractériser cette DHC.

Concernant l'interaction entre le Pommier et *Ea*, les DHC constitutives ne semblent pas directement associées à la résistance au pathogène. Il se pourrait en revanche qu'elles interviennent, et la sieboldine en particulier, dans la résistance quantitative d'Evereste. Cette résistance quantitative pourrait être reliée à une capacité différentielle de certaines souches à exprimer des pompes d'efflux, conférant une résistance à certains xénobiotiques. Il a été montré qu'*Ea* possède un tel système, et qu'il est de plus fortement induit par la phlorétine (Burse et al., 2004). Il est donc tout à fait envisageable qu'*Ea* ait pu évoluer sur ses hôtes pour mettre en place des pompes d'efflux spécifiques, efficaces contre la phloridzine et la sieboldine, mais qu'il puisse y avoir des niveaux d'inductions différentielles entre souches d'agressivités différentielles. La pompe d'efflux AcrAB fonctionne avec une protéine de la membrane externe, TolC, pour constituer un système MDE (multidrug efflux), qui confère une résistance accrue à de nombreux polyphénols du Pommier (dont la phlorétine, la quercétine et la catéchine ; Al-Karablieh et al., 2009). Des mutants d'*Ea* déficients pour TolC ou AcrAB sont totalement avirulents. Toutefois, si les DHC peuvent être associées à la résistance des feuilles jeunes à certaines souches d'*Ea*, elles ne sont vraisemblablement pas responsables de la résistance ontologique des feuilles matures, qui contiennent beaucoup moins de DHC que les jeunes feuilles. De plus, étant donné qu'il existe d'autres métabolites secondaires chez le Pommier, par exemple les terpénoïdes, il n'est pas impossible que ces composés interviennent également dans la résistance.

Une autre hypothèse qui devra être vérifiée est la compartimentation tissulaire des DHC chez le Pommier. En effet, étant donné le fort pouvoir antioxydant de la sieboldine et le fait que la bactérie induise un choc oxydant chez ses hôtes sensibles et résistants, il paraît étonnant qu'il n'y ait pas d'interaction entre ces deux facteurs au cours de l'infection, sauf si la localisation de la sieboldine la sépare physiquement du lieu d'infection et de propagation de la bactérie. Des données préliminaires ont été obtenues par microscopie et coloration de coupes de nervures et de pétioles de Pommier à la vanilline-HCl pour tenter de localiser les DHC dans ces tissus. Les résultats semblent indiquer que les DHC se situent dans les

épidermes et le parenchyme palissadique du limbe, et essentiellement dans le parenchyme sous-jacent aux vaisseaux du xylème dans les nervures et les pétioles. Les données du Chapitre I montrent que la bactérie se développe préférentiellement dans le parenchyme lacuneux et le parenchyme sous-cortical des tiges. *A priori* donc, les DHC ne seraient pas en contact direct avec la bactérie, et celle-ci cherche visiblement à les éviter. Il se pourrait toutefois que les DHC produites dans le parenchyme palissadique puissent être transloquées vers les zones d'infection. Ces résultats sont en cours de confirmation, et une collaboration va être très prochainement entreprise avec J.-F. Müller, du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie laser de la Technopôle de Metz, pour tenter de localiser la phloridzine et la sieboldine par imagerie assistée par MS.

Il est envisageable également que l'implication des DHC dans l'interaction avec *Ea* soit indirecte et implique leurs produits de transformation (Fig.II.12.). Le point de départ de cette hypothèse est l'étude de Pontais et al. (2008) qui démontre que les DHC constitutives subissent une importante altération au cours de l'interaction, aussi bien chez le génotype résistant (Evereste) que chez le génotype sensible (MM106). Toutefois le mécanisme sous-jacent à cette transformation n'avait pas été décrit. Les données du chapitre I apportent des éléments de réponse, puisqu'une polyphénol oxydase est induite au cours de l'interaction, suggérant qu'il y a oxydation des DHC en *o*-quinones (Fig.II.12.). D'autre part, les résultats acquis dans ce chapitre montrent que la phloridzine est présente chez tous les génotypes. L'hypothèse qui peut être formulée est qu'une partie de la résistance à *Ea* réside dans la capacité différentielle des génotypes à transformer la phloridzine en produits soit antioxydants, soit antibactériens. Ce sont ces différents points qui seront abordés dans la partie suivante.

## **II. Analyse des produits de transformation des DHC**

Les parties précédentes ont révélé plusieurs caractéristiques concernant le pathosystème *Erwinia amylovora*-Evereste/MM106 : (i) les différences histologiques ainsi que les réponses moléculaires exprimées en réponse à la présence de la bactérie sont peu nombreuses, en comparaison à la très forte résistance d'Evereste et la très forte sensibilité de MM106, (ii) la sieboldine et la trilobatine, ont été identifiées chez Evereste uniquement, mais ces deux DHC ne semblent pas directement participer à la résistance, comme l'indique le criblage de plusieurs descendants issus du croisement Evereste x MM106, malgré le fort

pouvoir antioxydant et antibactérien de la sieboldine, (iii) la phloridzine est présente dans tous les génotypes étudiés jusqu'à présent (parents et descendants), (iv) cette DHC présente une activité antimicrobienne contre *Ea* à des concentrations physiologiques (> 5 mM) et (iv) la réponse moléculaire d'Evereste et MM106 s'accompagne de l'induction d'au moins un gène codant une polyphénol oxydase (*PPO*), potentiellement impliquée dans l'oxydation des DHC. A ces données, s'ajoutent également les résultats préalablement obtenus par Pontais et al. (2008) qui ont mis en évidence une transformation massive des DHC au cours de l'interaction. Ces différents points soulèvent ainsi plusieurs questions : (i) les produits de transformation de la phloridzine sont-ils préjudiciables à la progression de la bactérie (que ce soit par une activité antimicrobienne ou antioxydante, ou même une implication dans le renforcement pariétal) ? (ii) la résistance d'Evereste et de certains descendants est-elle basée sur une capacité à transformer différemment la phloridzine (quinones/produits insolubles), ou au contraire empêcher sa détoxification ? (iii) quels sont ces mécanismes de transformation et permettent-ils d'expliquer l'altération du pool de DHC constitutif rapportée par Pontais et al. (2008) ?

Pour répondre à ces questions, deux séries d'expériences ont été réalisées : (i) étude des enzymes de transformation des DHC chez Evereste et MM106, avec une caractérisation plus poussée des PPO et (ii) la caractérisation des produits de transformation des DHC.

## **II.1. Etude bibliographique : la transformation des flavonoïdes.**

A la différence de beaucoup d'autres stress (UV, blessures, pathogènes bactériens/fongiques) qui ont tendance à induire la synthèse de flavonoïdes chez les plantes (Dixon et Paiva, 1995 ; LaCamera et al., 2004), l'interaction compatible Pommier-*Ea* est caractérisée par une répression de cette voie de biosynthèse accompagnée d'une diminution de près de la moitié (>60 mg/g MS) du stock des DHC constitutives, ce stock étant très important quantitativement (Pontais et al., 2008). Mais les produits constitutifs ne semblent pas jouer un rôle direct dans la résistance à l'infection. L'intervention de leurs produits de transformation peut en revanche être envisagée, dans la résistance, ou au contraire la sensibilité, par exemple par la transformation en substrats pour la bactérie. Cette hypothèse implique deux études complémentaires: (i) la détermination des mécanismes, enzymatiques ou non, de transformation des DHC et (ii) l'identification et la caractérisation des produits résultants.

Les données concernant la transformation des dihydrochalcones sont plutôt éparses. Des travaux préliminaires, initiés il y a plus de 30 ans, ont permis de mettre en évidence des phénomènes d'oxydation enzymatique de la phloridzine par des extraits enzymatiques de feuilles ou de bourgeons de Pommier (Fig.II.13. ; Neumann et Arnon, 1967 ; Raa et Overeem, 1968 ; Sarapuu, 1971 ; Sarapuu et Kheinaru, 1971). L'oxydation de la phloridzine dans ces conditions, catalysée par des polyphénol oxydases, est caractérisée par deux étapes, une hydroxylation sur le carbone 3 du noyau A (catalysée par l'activité crésolase), suivie d'une oxydation des deux groupements hydroxyles, placés en *ortho* sur ce même noyau, en semi-quinone (catalysée par l'activité catécholase). Il a été proposé que ces composés radicalaires ainsi formés soient capables de réagir entre eux pour former des oligomères (Sarapuu, 1971). La déglucosylation (assurée par des  $\beta$ -glucosidases) de la phloridzine en phlorétine a également été observée dans ces conditions (Raa et Overeem, 1968). Ces deux réactions sont donc a priori les principales susceptibles d'intervenir lorsque les substrats et les enzymes se retrouvent en confrontation. Ces réactions ne sont pas exclusives aux dihydrochalcones. La plupart des autres flavonoïdes peuvent aussi subir des méthylations et des prénylations (Yu et Jez, 2008), bien que ces modifications n'aient, *a priori*, jamais été rapportées chez le Pommier. De même, Sakihama et al. (2003) ont montré que l'acide *p*-coumarylique pouvait être nitrosylé *in vitro* en présence de peroxy-nitrite par une peroxydase, mais cela n'a jamais été constaté pour une dihydrochalcone.

Un système a été décrit il y a quelques années, sur la transformation de l'arbutine, un produit phénolique majoritaire du poirier, en composés potentiellement actifs contre *Ea*. Le modèle implique la déglucosylation de l'arbutine en hydroquinone puis son oxydation subséquente par une PPO en quinhydrone (Hildebrand et Schroth, 1963 ; Hildebrand et al., 1969), selon un schéma similaire à celui décrit pour la phloridzine par Raa et Overeem (1968 ; Fig.II.13.). Toutefois l'implication de l'arbutine dans la résistance à *Ea* a été partiellement écartée à cause de l'absence de corrélation entre l'activité  $\beta$ -glucosidase et la résistance, en raison de la localisation tissulaire inappropriée de cette enzyme, i.e. dans des tissus pauvres en arbutine (Hildebrand et al., 1969). Toutefois, d'autres travaux ont suggéré l'implication de couplages entre hydroquinone et produits d'oxydation de l'arbutine (Powell et Hildebrand, 1970). De plus, les données concernant le rôle de la déglucosylation sont assez contradictoires, car Smale et Keil (1966) et Hildebrand (1970) ont remarqué une forte corrélation entre présence d'hydroquinone (l'aglycone) et pouvoir antibactérien, dans des

homogénats de feuilles. L'ensemble de ces données montrent la difficulté de l'étude d'un tel système, qui semble très influencé par les conditions expérimentales.

### II.1.1. L'oxydation

#### *II.1.1.a) Les polyphénol oxydases*

Les polyphénol oxydases regroupent trois classes d'activités enzymatiques (Fig.II.14.): (i) l'activité crésolase (EC 1.14.18.1 ; monophénolase, monophénol oxydase), (ii) l'activité catécholase (EC 1.10.3.1 ; *o*-diphénolase, catéchol oxydase,) et (iii) l'activité laccase (EC 1.10.3.2 ; *p*- et *o*-diphénolase). Ce sont des enzymes distribuées dans l'ensemble du règne vivant (Selinheimo et al., 2007). Elles ont toutes la particularité d'utiliser l'oxygène moléculaire comme cofacteur. L'activité crésolase catalyse l'hydroxylation en *ortho* d'un groupement phénol (Marusek et al., 2006). Les activités catécholase et laccase sont similaires dans le sens où elles catalysent l'oxydation d'un diphénol, cependant la différence majeure réside dans la spécificité de substrat puisque les catécholases ne sont capables d'oxyder que des *o*-diphénols et les laccases, à la fois des *p*-diphénols et des *o*-diphénols (Mayer et Staples, 2002 ; Mayer, 2006). De plus, l'oxydation par une activité catécholase consiste à un transfert direct de deux électrons, de l'oxygène vers le substrat tandis que l'activité laccase n'en implique qu'un seul (Klabunde, 1998). L'activité laccase est portée par une enzyme du même nom, bien spécifique. En revanche, concernant les activités crésolase et catécholase, la nomenclature est plus délicate (Fig.II.14. ; Gerdemann et al., 2002 ; Decker et al., 2006).

#### *- Les catéchol oxydases et les tyrosinases*

Deux enzymes sont à discerner bien que leurs séquences et structures soient tout à fait comparables: les catéchol oxydases (CO), ne présentant que l'activité catécholase, et les tyrosinases (TYR), possédant à la fois l'activité crésolase et l'activité catécholase, (Matoba et al., 2006 ; Marusek et al., 2006). Dans le reste de cette étude, le terme de PPO sera employé pour désigner soit des CO soit des TYR mais pas les laccases. Les CO et TYR sont des métalloprotéines portant deux atomes de cuivre, CuA et CuB, couplés et impliqués dans la fixation de l'oxygène moléculaire. Ce site catalytique est très conservé entre les bactéries, les champignons, les arthropodes et les plantes, à l'inverse du reste de la séquence

(Gerdemann et al., 2002 ; Mayer, 2006), à l'exception du site CuA, stabilisé par une cystéine uniquement chez les CO de plantes. Plusieurs structures cristallines ont été obtenues, dont celle de la catécholase de pomme de terre douce (Fig.II.15.A ; Klabunde et al.,1998 ; Gerdemann et al., 2002) et de la tyrosinase de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006), apportant ainsi beaucoup d'information sur la disposition du site actif. Pour ces deux enzymes, chaque atome de cuivre est coordonné par trois histidines (Fig.II.15.B), et il existe trois états conformationnels, *met*, *oxy*, et *deoxy*, le premier correspondant à une forme oxydée (Cu(II)), le second à un état intermédiaire lié à l'oxygène et le troisième à une forme réduite (Cu(I)) (Gerdemann et al., 2002). L'activité crésolase des TYR ne peut débuter que lorsque l'état conformationnel *oxy* est atteint, tandis que l'activité catécholase peut se faire aussi bien en *oxy* qu'en *met*. La capacité des TYR à catalyser l'hydroxylation des monophénols pourrait venir en partie de l'accessibilité et de la flexibilité du site CuA, partiellement masqué chez les CO par un résidu phénylalanine, générant un encombrement stérique, et rigidifié par la liaison thioether entre une cystéine et une tyrosine à proximité de ce site (Decker et al., 2006 ; Matoba et al., 2006). Les CO et TYR sont organisées en trois domaines, (i) le domaine II porte le site actif avec les deux centres Cu (Gerdemann et al., 2002), (ii) le domaine I, N-terminal, porte un peptide signal d'adressage au chloroplaste, et plus précisément, confère la translocation vers le lumen des thylakoïdes (Koussevitzky et al., 2008), ce qui semble être le cas pour de nombreuses PPO (Mayer, 2006), et (iii) le domaine III, C-terminal, de taille comprise entre 15 et 20 KDa, joue un rôle dans la régulation de l'activité (Marusek et al., 2006). Les enzymes possédant un tel domaine seraient donc inactives constitutivement et leur activation nécessiterait un clivage protéolytique, dont le site se situerait dans la région intermédiaire entre le domaine N-terminal portant le site actif et le domaine C-terminal (Marusek et al., 2006). Cette région est localisée dans la structure tridimensionnelle à la surface de la protéine, favorisant l'activité des protéases. Ce type d'activation par protéolyse a été montrée pour une PPO de *Vicia faba* qui peut être activée par dénaturation partielle en présence de SDS ou encore par traitement protéolytique de la partie C-terminale (Robinson et Dry, 1992). C'est également le cas pour la vigne, chez qui la production de la forme active d'une PPO par clivage d'un précurseur a été suggérée (Rathjen et Robinson, 1992). Il est intéressant de noter que les phénoloxydases d'insectes peuvent subir ce type d'activation par clivage d'un précurseur (Cerenius et al., 2008), ce qui suggère un mécanisme conservé d'activation inductible de l'activité polyphénol oxydase, chez les plantes et les insectes. De plus, il semblerait que l'activation protéolytique soit régulée par

l'état de phosphorylation de la PPO, car un site putatif de phosphorylation est présent dans la région intermédiaire (Marusek et al., 2006). Cependant, ces processus de régulation par clivage et/ou phosphorylation manquent encore de validation, puisqu'ils n'ont été décrits que pour de rares cas chez les PPO de plantes (par exemple chez l'épinard ; Sokolenko et al., 1995). Pourtant les PPO ont pu être clonées chez beaucoup d'espèces végétales (Flukey et Inlow, 2008), parmi lesquelles : la tomate (Thipyapong et al., 1997), la pomme de terre (Thygesen et al., 1995), le peuplier (Constabel et al., 2000) et la banane (Gooding et al., 2001). De plus, sans qu'il soit question de la maturation des protéines, seule l'activité catéchol oxydase a été dosée dans ces différentes études, en utilisant des *o*-diphénols comme substrat (4-méthylcatéchol ou L-DOPA), ne permettant pas de savoir si ces enzymes sont également des tyrosinases. Ces différents points illustrent bien que les caractéristiques spécifiques de chaque PPO de plante n'ont pas encore été suffisamment déchiffrées. Les sites de clivage sur les PPO ont pu être déduits sur plusieurs PPO fongiques et végétales, par analogie avec les sites démontrés expérimentalement par séquençage protéique. En se basant sur des homologies de séquences protéiques, Flukey et Inlow (2008) suggèrent que la plupart des PPO de plantes sont effectivement sujettes au clivage des extrémités N- et C-terminales, la coupure de cette dernière permettant l'activation. Ce type d'activation offre donc un système de régulation de l'activité PPO, qui sous-entend également l'implication de protéases dans ce processus.

Chez le Pommier, plusieurs PPO ont été caractérisées dans le fruit des variétés Bramley's Seedling, Amasya, Jonagored, Jonathan, Starking, Rome Beauty, Winesap et Cortland (voir réf. dans Rocha et al., 1998 ; Rocha et Morais, 2001 ; Ni Eidhin et al., 2006). Ces différents travaux indiquent qu'il existe souvent des isoformes de PPO et que les pH optimum varient d'une PPO à une autre mais qu'il en existe deux grandes catégories : les PPO ayant un seul pH optimum, situé vers 6, et celles ayant deux pH optimum situés vers 5 et vers 7. De plus, selon les PPO, les affinités de substrats sont différentes, et certaines, telle que celle purifiée de la variété Bramley's Seedling, sont *a priori* des catéchol oxydases (à activité catécholase ; Ni Eidhin et al., 2006). Cependant, ces travaux ne font pas état de l'existence de formes latentes, potentiellement activées par protéolyse. En revanche, Mari et al. (1998) ont montré qu'une PPO de la variété de Granny Smith existe sous deux formes, la plus petite correspondant à la forme active de la PPO, et présente une perte d'un peptide de 15 KDa par rapport à la plus grande. De plus, il s'avère que la forme active de la PPO est très stable car plus résistante à la protéolyse (Mari et al., 1998). A ce jour, les séquences de

quelques ADNc codant des PPO ont été obtenues chez les variétés Granny Smith (Boss et al., 1995) et Fuji (Haruta et al., 1998), et il semblerait que les PPO existent sous plusieurs isoformes chez le Pommier. De plus, celles-ci possèdent des profils d'expression spécifiques de chacune (Kim et al., 2001), à l'image de ce qui a pu être observé chez la tomate par exemple (Thipyapong et al., 1997). Haruta et al. (1998) ont par ailleurs montré que la PPO dans la variété Fuji est présente dans des extraits de fruits sans son peptide signal N-terminal, indiquant que la maturation du peptide a bien lieu. A ce titre, cette PPO a été localisée, par immunofluorescence, dans les chloroplastes majoritairement (Murata et al., 1997). Les auteurs suggèrent qu'elle est libérée au cours de la maturation des fruits.

La fonction physiologique des PPO TYR et CO chez les plantes n'est toujours pas clairement élucidée, par opposition avec les études sur les systèmes animaux, dans lesquels ces PPO participent à la mélanisation (Selinheimo et al., 2007), et en particulier chez les insectes, à la défense et la sclérotisation (Cerenius et al., 2008). Les substrats potentiels des PPO de plantes sont très diverses (acide chlorogénique, acide caféique, catéchines, procyanidines,...) et leur affinité pour ces substrats varie d'une enzyme à l'autre (Robards et al., 1999 ; Pourcel et al., 2007). D'une part, les PPO sont considérées plutôt comme néfastes dans la conservation des fruits, dans la mesure où la production de quinones, *via* leur activité, donne un aspect brun à leur chair, entraînant de sérieuses pertes économiques (Robards et al., 1999 ; Mayer, 2006). Cependant, le brunissement des fruits n'est pas uniquement liée à l'activité des PPO, mais pourrait également impliquer la présence de métaux réagissant avec les polyphénols (Robards et al., 1999) et/ou de peroxydases (Richard-Forget et Gaillard, 1997), utilisant directement les quinones formées par l'oxydation catalysée par les PPO ou bien du peroxyde d'hydrogène produit en marge de cette même réaction. Il semblerait que chez les plantes les PPO participent également à la mise en place de défenses contre les pathogènes, bien que le mécanisme d'action reste encore incertain (Thipyapong et al., 2007). Cette implication a pu être mise en évidence par surexpression ou ARN interférence. La surexpression constitutive d'une PPO chez la tomate rend les plantes beaucoup plus résistantes à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) en terme de développement de nécroses et de croissance bactérienne (Li et Steffens, 2002), sans qu'il n'y ait d'altération des produits phénoliques constitutifs. Par contre, l'extinction de son expression provoque le phénotype inverse, caractérisée par une plus grande sensibilité à *Pst* accompagnée d'une augmentation des nécroses et de la taille de populations bactériennes (Thipyapong et al., 2004). Ainsi, cette PPO confère non seulement la tolérance

au pathogène mais participe activement à la défense de la plante. Toutefois, la modification de son expression, toujours sur tomate, ne change pas la sensibilité à *Ralstonia solanacearum*, (Thipyapong et al., 2007), suggérant ainsi que les PPO interviennent dans la résistance à certains types de pathogènes seulement. De manière intéressante et en lien avec ce qui a été décrit plus haut, les tomates n'exprimant plus cette PPO possèdent une morphologie et un développement similaire aux plants sauvages, mais ne possèdent plus de corps protéiques situés dans les thylakoïdes des chloroplastes. Ces corps protéiques présents chez les plants sauvages et qui apparaissent noirs en microscopie, révèlent la localisation et l'activité de la PPO, mais la signification physiologique de cette observation reste indéterminée (Thipyapong et al., 2004). L'influence de la PPO sur l'interaction entre la tomate et *Pst* est similaire à celle sur l'interaction entre la tomate et le lépidoptère *Spodoptera litura*, puisque la surexpression de la PPO affecte sévèrement le développement des larves de ce parasite et au contraire son extinction le favorise (Mahanil et al., 2008). La résistance conférée par la surexpression de la PPO est probablement due dans ce cas à une baisse de la qualité nutritive des feuilles pour le parasite (cross-linking entre acides aminés lié à l'activité des quinones, voir ci-dessous). Wong et Constabel (2004) ont montré de manière similaire que la surexpression d'une PPO de peuplier diminue le développement d'une chenille arpeuteuse (*Malacosoma disstria*). Ainsi, sur deux espèces végétales différentes, les PPO participent de manière évidente, probablement en synergie avec les autres défenses de la plante, à la lutte contre les parasites herbivores. Cependant, l'extension de ces observations est à nuancer car Barbehenn et al. (2007) ont montré que des niveaux élevés d'activité PPO chez le peuplier ne sont pas corrélés à la résistance à deux autres parasites herbivores, probablement plus résistants aux formes radicalaires ou bien moins exigeants sur la qualité des substrats végétaux. De nombreux travaux montrent que les PPO sont très souvent induites dans les interactions plante/pathogène (Constabel et Ryan, 1998). De plus, elles sont induites par un traitement au méthyl-jasmonate ainsi qu'en réponse aux blessures par exemple chez le peuplier (Constabel et al., 2000) mais également dans de nombreuses autres espèces (Constabel et Ryan, 1998). En complément de ces observations, des travaux récents sur *Taraxacum* sp. montrent l'existence d'une activité PPO impliquée dans la coagulation et le brunissement du latex, participant probablement à la cicatrisation des plaies et la protection contre les pathogènes (Wahler et al., 2009).

Certaines PPO ont également été impliquées dans la biosynthèse de métabolites secondaires, dont l'aureusidine d'*Antirrhinum* (impliquant une PPO vacuolaire, Ono et al.,

2006) et certains lignanes de *Larrea tridentata* (arbuste du désert américain ; Cho et al., 2003). Dans ces deux cas, c'est la propriété de certaines PPO de pouvoir catalyser l'hydroxylation de flavonoïdes précurseurs de manière énantio-spécifique qui est importante. Une activité PPO serait également impliquée dans la biosynthèse des bétalaines de *Portulaca grandiflora* et interviendrait à la fois dans l'hydroxylation et l'oxydation de précurseurs (Steiner et al., 1999). La formation des procyanidines (oligomères de (+)-catéchine et/ou de (-)-épicatéchine) est également catalysée par une activité PPO, via la fonction catécholase (Guyot et al., 1996a ; Lepiniec et al., 2006). L'implication dans la biosynthèse de métabolites secondaires est donc une fonction spécifique de certaines PPO. La sieboldine, présentée dans la partie précédente, est hypothétiquement issue de l'hydroxylation directe de la trilobatine. Au vu de ce qui est mentionné ci-dessus, il est donc possible qu'il existe une PPO, à activité crésolase, spécifique chez *Evereste* capable de catalyser l'oxydation de la trilobatine en sieboldine.

#### - Les laccases

Les laccases catalysent l'oxydation des *p*-diphénols ainsi que des *o*-diphénols, toutefois la signification de l'activité *p*-diphénolase est plutôt hypothétique étant donnée, *a priori*, l'absence de *p*-diphénols chez les plantes. Il y a beaucoup moins de données dans la littérature concernant les laccases que les PPO, tout du moins en ce qui concerne ces enzymes chez les plantes (Mayer et Staples, 2002). Les laccases constituent une sous-famille d'enzymes appelée LMCO (laccase-like multicopper oxidase) et sont présentes chez les bactéries, champignons, plantes et insectes (Hoegger et al., 2005). A l'intérieur du règne des plantes, les séquences protéiques sont très variables, à l'exception des « centre-cuivre » (Fig.II.15.C). La plupart sont supposées être sécrétées dans l'apoplaste bien que certaines (par exemple chez le pin) aient été localisées dans la mitochondrie (McCaig et al., 2003). Elles possèdent 4 atomes de cuivre, chacun coordonné par deux ou trois résidus histidine (Nitta et al., 2002). La principale fonction physiologique des laccases chez les plantes serait l'initiation de la lignification par oxydation de monolignols (cf. chapitre I pour les détails sur ces composés et la lignine). Cependant, certains travaux suggèrent que cette fonction est plutôt assurée par des peroxydases car ces dernières ont une affinité plus grande pour ces monolignols. Certaines laccases, telle que celle isolée chez *Rhus vernicifera*, qui est disponible commercialement, sont incapables d'oxyder l'acide coniférylique (Ranocha et al., 1999 ; Gavnholt et Larsen, 2002). De plus, les isoformes de laccases présentent des profils

d'expression qui leur sont propres, soit tissu-spécifique, soit généralisé à toute la plante (McCaig et al., 2003), ce qui suggère que les laccases peuvent jouer d'autres rôles physiologiques ou que tout du moins, leur rôle dans la lignification est plus subtil. Deux laccases associées à la paroi cellulaire des vaisseaux du xylème ont pu être caractérisées chez le peuplier et fonctionnellement rattachées à la production de lignine (Ranocha et al., 1999). De plus, plusieurs études portant sur les genres *Pinus* et *Acer* ont permis d'isoler et de purifier des laccases capables de produire de la lignine *in vitro*, en l'absence de peroxyde d'hydrogène et donc sans faire intervenir d'activité peroxydase (Gavnholt et Larsen, 2002). L'extinction de l'expression d'une laccase chez le peuplier n'aboutit pas à un changement de teneur en lignine, mais s'accompagne d'une augmentation de monolignols solubles ainsi que d'un aspect plus lâche et déformé des parois lignifiées (Ranocha et al., 2002). De même, Koutaniemi et al. (2007) ont étudié l'expression d'EST impliqués dans la synthèse de lignine au cours de la maturation du xylème de l'épicéa et ont montré qu'une laccase était particulièrement exprimée dans ce système, bien que des peroxydases soient également très présentes. Toutes ces données suggèrent donc que si les laccases ne sont pas les principaux catalyseurs de la production de lignine, elles participent tout de même à la formation et à la cohérence des fibres de lignines, vraisemblablement par des phénomènes de cross-linking (Ranocha et al., 2002). Récemment, Pourcel et al. (2005) ont apporté de nouveaux éléments sur la fonction physiologique des laccases. Ces auteurs ont cloné un gène codant une laccase apoplastique chez *Arabidopsis* exprimée dans les téguments de la graine et responsable du brunissement de ceux-ci. Les graines des mutants déficients pour cette laccase sont effectivement plus blanches que celles des plantes contrôles et accumulent plus de flavonoïdes (dont épicatechine et quercétine-3-rhamnoside) libres. Cette laccase d'*Arabidopsis* serait donc responsable de l'oxydation  $H_2O_2$ -indépendante des flavonoïdes présents dans les téguments en quinones réactives, se polymérisant entre elles (Pourcel et al., 2005), offrant un modèle différent de celui impliquant les monolignols. Le génome d'*Arabidopsis* ne contient pas de gènes codant de PPO (Pourcel et al., 2007), c'est pourquoi il est supposé que la fonction de flavonoïde oxydase soit déléguée aux laccases dans cette espèce. L'observation que l'oxydation *in vitro* de la catéchine par une laccase commerciale aboutit à la formation de dimères similaires à ceux obtenues par l'oxydation catalysée par une PPO (liaison entre les noyaux A d'une molécule et B de l'autre) conforte ces observations (Guyot et al., 1996a ; Osman et al., 2007). Des travaux portant sur une laccase de peuplier ont montré que celle-ci présente une activité de ferroxidase, c'est-à-dire

qu'elle est capable d'oxyder le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ , et l'hypothèse est faite qu'elle puisse participer à limiter la production de FAO par inhibition de la réaction de Fenton (Hoopes et Dean, 2004).

#### *II.1.1.b). Les peroxydases*

Les peroxydases (EC.1.11.1.7) catalysent des transferts d'électrons et de protons ayant pour but principal la réduction du peroxyde d'hydrogène par un cofacteur hémique de type protoporphyrine IX, qui est régénéré en fin de réaction par un donneur d'électron (Passardi et al., 2004). L'hème est coordonné par deux résidus conservés, une histidine et un aspartate, et le site de fixation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est constitué de 3 résidus, une arginine, une phénylalanine et une histidine (Schuller et al., 1996). Les peroxydases sont soit sécrétées vers l'apoplaste ou la paroi (peroxydases de classe I), soit intracellulaires (classe III). Leur structure secondaire est bien conservée et consiste en une série d'au moins 10 hélices  $\alpha$  formant une protéine globulaire (Schuller et al., 1996). Elles participent à différents processus physiologiques, dont la régulation de l'élongation, le renforcement pariétal par cross-linking, la lignification et la subérisation, la nodulation et la sénescence, ou bien encore la dégradation de l'auxine (Passardi et al., 2005). Le processus de lignification implique à la fois des laccases et des peroxydases, bien qu'il semble que ces dernières soient prépondérantes (Gross, 2008). Elles catalysent l'oxydation des monolignols en formes radicalaires en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui polymérisent spontanément (Passardi et al., 2004). Les peroxydases sont capables de transférer des électrons du peroxyde d'hydrogène vers différents accepteurs (ascorbate, flavonoïdes, ...), processus appelé cycle peroxydant, mais elles peuvent également catalyser la formation du radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$  via la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxide, par l'intermédiaire du centre  $\text{Fe}^{3+}$ , cette étape formant le cycle hydroxylique (Liszky et al., 2003 ; Passardi et al., 2004). De cette manière, les peroxydases peuvent participer au cross-linking de la paroi cellulaire, avec par exemple l'acide férulique ou à l'inverse participer à son relâchement par la production de radicaux hydroxyles (Passardi et al., 2004). Le choc oxydant qui se produit lors des interactions plante-pathogène est généralement attribué à des NADPH oxydases membranaires (cf. Chapitre I). Cependant, des travaux récents suggèrent que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit de manière peroxydase-dépendante peut jouer un rôle tout aussi important. Par exemple, des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* déficientes pour une peroxydase apoplastique impliquée dans la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , sont plus sensibles à *Pseudomonas syringae* pv.

*maculicola* (Bindschedler et al., 2006). Malheureusement, il n'a pas été établi précisément si la résistance conférée par cette peroxydase est liée à une action antibactérienne directe du peroxyde d'hydrogène ou bien à l'activation de la HR, ou bien les deux. La production d' $H_2O_2$  par les peroxydases apoplastiques est pH-dépendante et nécessite une alcalinisation chez le haricot (Bolwell et al., 2002).

Les peroxydases sont très souvent induites dans les interactions pathogènes, probablement par leur participation à la production de radicaux hydroxyles très antimicrobiens dans l'apoplaste ou bien à la lignification des papilles (Hückelhoven, 2007). Par exemple, Dai et al. (1996) ont mis en évidence la présence d'une activité peroxydase forte au niveau des parois cellulaires et des espaces intercellulaires dans les feuilles de coton infectées par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Cette activité n'a été détectée qu'en situation incompatible et est corrélée avec la présence de flavonoïdes dans les parois. Les auteurs suggèrent que l'activité peroxydase est en partie responsable de cette imprégnation. De la même manière, il a été montré qu'une activité peroxydase augmente très fortement dans les parois de cellules de haricots confrontées à un mutant avirulent de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Brown et al., 1998). Cependant et de manière étonnante, Coego et al. (2005) ont montré que l'extinction de l'expression d'une peroxydase chez la tomate confère la résistance à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (moins de symptômes et populations bactériennes plus faibles), bien que le mécanisme sous-jacent ne soit toujours pas élucidé. L'absence de l'expression de cette peroxydase, normalement induite par l' $H_2O_2$ , n'est, de plus, pas corrélée avec l'expression de défenses connues. A l'inverse, les travaux de Hilaire et al. (2001) corrélient la résistance du riz à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avec l'expression forte d'une peroxydase dans les cellules du parenchyme adjacent aux vaisseaux du xylème, ainsi qu'avec le renforcement pariétal de ces cellules. Ainsi, selon l'interaction considérée, les peroxydases peuvent être différemment impliquées dans les processus de sensibilité ou de résistance.

Les donneurs d'électrons peuvent être de différentes natures et ces enzymes sont connus pour avoir une faible affinité de substrat, mais le mécanisme de transfert séquentiel d'électrons reste identique (Schuller et al., 1996). La réduction du peroxyde d'hydrogène se fait par oxydation du centre  $Fe^{3+}$ -protoporphyrine, qui sera réduit à son tour par deux transferts séquentiels d'un électron provenant de deux molécules de substrat donneur. Ces donneurs peuvent être le glutathion, l'acide ascorbique ainsi que divers métabolites secondaires, parmi lesquels les flavonoïdes (Passardi et al., 2004). Yamasaki et al. (1997) ont

montré que les deux principaux flavonoïdes vacuolaires de *Schefflera* (des flavonols glycosylés, quercétine-3-glucoside et kaempferol-3-glucoside) peuvent être oxydés par une glutathion peroxydase également vacuolaire en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sa translocation dans la vacuole, par l'intermédiaire de certaines aquaporines (Bienert et al., 2006), permettrait son élimination *via* l'activité flavonol-peroxydase. Dans cette étude, la peroxydase catalyse beaucoup plus efficacement l'oxydation des molécules aglycones. Il est proposé que dans la vacuole s'établisse un cycle flavonoïde peroxydase/acide ascorbique pour piéger le peroxyde d'hydrogène en utilisant un flavonoïde vacuolaire comme donneur d'électrons (Takahama, 2004). Le flavonoïde radicalaire est alors réduit de manière non-enzymatique par de l'acide ascorbique qui devient du dehydroascorbate, réduit en présence de glutathion après translocation dans le cytosol. Cependant, il semble que ce processus antioxydant soit davantage pertinent lorsque le tonoplaste et les autres compartiments cellulaires sont lysés, comme dans le cas de stress biotiques, pour que la rencontre entre FAO et flavonoïdes soit facilitée (Hernandez et al., 2008). L'oxydation des produits phénoliques (flavonoïdes ou monolignols) par une peroxydase peut conduire au brunissement des tissus, comme c'est le cas au cours de la sénescence. Cependant dans des feuilles jeunes, il y a suffisamment d'acide ascorbique formé pour éviter l'auto-oxydation en chaîne et la polymérisation de cette manière (Takahama, 2004). Comme mentionné précédemment, le brunissement des fruits implique une action conjuguée entre l'oxydation catalysée par les PPO et celle catalysée par les peroxydases (Richard-Forget et Gaillard, 1997). Il a été rapporté que dans certaines conditions, la peroxydase de raifort (*Horsheradish peroxidase*) est capable d'hydroxyler des monophénols, mais en milieu non aqueux et dans ce cas, le processus relève davantage de réactions radicalaires que de la catalyse par une peroxydase (Ullrich et Hofrichter, 2007). Les monophénols (tels que la naringénine) peuvent être oxydés par la peroxydase pour former des radicaux phénoxyles ( $\text{RO}^\bullet$ ). Ces radicaux sont ensuite susceptibles d'oxyder le glutathion et par un ensemble de réactions radicalaires de produire l'anion superoxyde (Galati et al., 1999). Etant donnée les similarités structurales entre la naringénine et la phloridzine, il est tout à fait possible qu'elle puisse être oxydée de cette manière, d'autant plus qu'il a déjà été montré que les activités peroxydases sont fortement induites au cours de l'interaction Pommier-*Ea* (Venisse et al., 2002).

Des études portant sur l'oxydation *in vitro* de la quercétine par une peroxydase et en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  montrent que plusieurs produits peuvent être formés, en plus des formes quinones, comprenant des produits de clivage de la quercétine ainsi que des dimères et des

trimères résultant de couplages oxydatifs (Awad et al., 2000). De plus en présence de glutathion, le transfert de deux électrons à la quercétine catalysé par la peroxydase peut permettre un couplage entre le glutathion et les quinones-méthide de quercétine résultantes. Les couplages inter-molécules, qui se produisent en présence de formes radicalaires dont l'apparition est dépendante d'une peroxydase, joue également un rôle *in planta*. En effet, la production d'un alcaloïde terpénoïde indolique de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), est issue d'un couplage entre deux précurseurs catalysé par une peroxydase (Costa et al., 2008).

La figure II.16. montre que la phloridzine peut être oxydée de manière différentielle en fonction du système utilisé (PPO, peroxydase avec ou sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ceci renforce l'hypothèse de l'importance d'étudier et de comparer les processus de transformation existant chez Evereste et MM106.

#### *II.1.1.c) Autres réactions d'oxydation*

- les cytochromes P450 : ces enzymes forment une importante famille et catalysent notamment un certain nombre de réactions d'hydroxylation dans les voies de biosynthèses des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes (Ayabe et Akashi, 2006). Elles sont notamment impliquées dans la synthèse de différents pigments des fleurs (pelargonidine par exemple ; Tanaka, 2006). Les hydroxylations concernent essentiellement le noyau B des flavonols et flavanols.

- les dioxygénases : la dihydroxylation des flavonoïdes par incorporation d'une molécule de dioxygène peut être assurée par des dioxygénases (Burton, 2003). Cette incorporation peut aboutir à l'ouverture du cycle aromatique.

- les ions métalliques et le peroxy-nitrite – processus non-enzymatiques: alors que les flavonoïdes sont capables de s'auto-oxyder, préférentiellement à pH > 7, en composés similaires à ceux obtenus par l'oxydation catalysée par une PPO, bien qu'avec une cinétique beaucoup plus lente, le fer ferreux peut aussi catalyser cette auto-oxydation mais elle forme dans ce cas des produits différents. Effectivement, Oszmianski et al. (1996) se sont intéressés à l'oxydation de la catéchine dans des solutions modèles, en présence de fer ou non. Leurs travaux montrent effectivement que les produits de transformation de la

catéchine formés en présence ou en l'absence de fer en milieu acidifié (pH 3,8) sont différents et ont notamment des spectres d'absorption UV-Vis spécifiques : en présence de fer, les composés présentent un maximum d'absorption vers 450 nm tandis que dans un milieu dépourvu de fer, les composés présentent un maximum d'absorption vers 380 nm (Oszmianski et al., 1996). De la même manière, il a été montré que le cuivre II et le fer II participent à la dégradation de la quercétine en acide protocatéchuique et à l'oxydation de la rutine en produits bruns non identifiés (Makris et Rossiter, 2000). La coloration marron des produits de réactions est également due à la chélation des ions métalliques par les flavonoïdes, qui constitue un des modes d'action de l'activité antioxydante de ces derniers (Mira et al., 2002). De plus, Pollard et al. (2006) montrent que certains flavonoïdes, flavanols et flavonols notamment, sont capables d'empêcher la nitration des protéines par le peroxy-nitrite, en interagissant avec ce dernier. Les produits d'oxydation obtenus par cette réaction sont capables de former des conjugués avec le glutathion, et il est suggéré que les flavonoïdes participent donc à la protection des protéines contre la nitration.

### II.1.2. Glycosylation/déglycosylation

Comme décrit dans la partie I, beaucoup de produits terminaux de la voie de biosynthèse des flavonoïdes sont glycosylés de manière spécifique par des glycosyltransférases (Gachon et al., 2005). La conjugaison à un sucre permet de stabiliser la molécule cible et de la rendre plus hydrosoluble. Beaucoup de phytoanticipines et de composés insecticides ou répulsifs sont stockées dans la vacuole sous leur forme glucosylée pour prévenir une éventuelle phytotoxicité, car dans la plupart des cas, la glycosylation d'un composé provoque son inactivation (Morant et al., 2008a). La glucosyl transférase catalysant la glycosylation de la phlorétine en phloridzine chez le Pommier a été récemment caractérisée (Judgé et al., 2008). La phlorétine est environ 10 fois plus antibactérienne que la phloridzine sur *Ea* (Pontais et al., 2008 ; données de la partie I de ce chapitre), ce qui illustre parfaitement le concept d'inactivation par glucosylation. La phlorétine pourrait être toxique pour les cellules dans lesquelles elle est produite car elle peut altérer les mécanismes de transport de l'azote et des sucres sur des plantules d'*Arabidopsis* (Liu et al., 2003).

La déglycosylation apparaît par conséquent comme un mécanisme important de l'activation de produits phénoliques constitutifs, en réponse à un stress. La régulation de ce mécanisme est notamment assurée par une compartimentation sub-cellulaire différente

entre l'enzyme et le substrat (Morant et al., 2008a), et même parfois ces deux éléments peuvent être localisés dans des tissus spécifiques. L'activation ne se fait alors qu'en cas de mise en contact, i.e. lors d'une attaque par un pathogène accompagnée de la lyse des cellules, libérant leur contenu dans les espaces intercellulaires. Par exemple, deux  $\beta$ -glucosidases sont capables d'hydrolyser des  $\alpha$ -hydroxynitriles glucosides de *Lotus japonicus* (Morant et al., 2008b). Ces deux enzymes sont localisées dans le cytoplasme des cellules du parenchyme palissadique des feuilles, là où s'accumule leur substrat. L'hydrolyse des  $\alpha$ -hydroxynitriles glucosides ne génère pas de HCN, mais il est possible que l'aglycone libéré possède des propriétés antimicrobiennes ou bien répulsives pour les insectes. D'autre part, ces enzymes sont relativement spécifiques, dans la mesure où elles ne catalysent pas efficacement l'hydrolyse d'autres composés cyanogéniques de Lotus (Morant et al., 2008b).

Dans le cas du système arbutine/hydroquinone chez le Poirier, l'arbutine est localisée dans les tiges essentiellement autour des cellules du phloème et sous l'épiderme tandis que la  $\beta$ -glucosidase impliquée dans la conversion de l'arbutine en hydroquinone colocalise également avec les cellules du phloème ainsi que celle du parenchyme cortical (Hildebrand et al., 1969). Ces données suggèrent que dans la tige, l'enzyme et le substrat ont une compartimentation sub-cellulaire différente, mais qu'ils sont présents dans le même tissu. Cependant, il ne semble pas y avoir de corrélation directe entre l'intensité de l'activité  $\beta$ -glucosidase et l'activité antibactérienne contre *Ea*. Toutefois, les interprétations sont rendues délicates par le fait que d'autres enzymes, par exemple des PPO, peuvent transformer les aglycones, et donc l'expression du pouvoir antibactérien dépend de plusieurs facteurs (Powell et Hildebrand, 1970). L'existence d'une  $\beta$ -glucosidase responsable chez le Pommier de l'hydrolyse de la phloridzine en phlorétine a été mise en évidence par Raa et Overeem (1968), mais l'enzyme en question n'a pas été caractérisée à ce jour.

### II.1.3. Autres réactions de transformation

Les flavonoïdes, dont les DHC, peuvent subir d'autres réactions, concernant essentiellement les groupements hydroxyles, qui influencent leurs propriétés : la méthylation (Ibrahim et al., 1998), l'acylation (Chebil et al., 2006) et la prénylation (Heide, 2009). La méthylation de la phloridzine et de la phlorétine altère fortement leur capacité antioxydante *in vitro* et les rend plus cytotoxiques pour des cultures cellulaires humaines (Deng et al., 2006). Cependant, elles sont toujours capables de protéger ces mêmes cultures

cellulaires contre l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggérant que leur potentiel antioxydant *ex vivo* et *in vivo* n'est pas entièrement altéré. Dans cette étude, tous les groupements hydroxyles libre de la phloridzine et de la phlorétine ont été méthylés chimiquement (Deng et al., 2006). *In planta*, la méthylation des flavonoïdes ne concerne généralement qu'un seul groupement hydroxyle (Ibrahim et al., 1998). La méthylation peut également provoquer une diminution de l'activité antibactérienne du composé (Avila et al., 2008). Les formes méthylées des DHC du Pommier n'ont jamais été détectées jusqu'à présent. La prénylation des flavonoïdes sur le noyau A (liaison C-C) augmente significativement leurs propriétés antibactériennes (Avila et al., 2008), tout comme le nombre de substitution par des groupements hydroxyles. Une flavonoïde prényltransférase a été récemment isolée chez *Sophora flavescens* (Sasaki et al., 2008). Cette enzyme qui catalyse *in planta* la prénylation de la naringénine, est particulièrement induite par l'acide salicylique et le méthyl-jasmonate, suggérant qu'elle ait un rôle dans la résistance aux bioagresseurs. La prénylation des DHC, au même titre que la méthylation, n'a jamais été observée chez le Pommier. La structure des DHC est a priori compatible avec ces deux processus puisqu'il a été montré que les feuilles d'*Artocarpus lowii* contiennent de manière constitutive une DHC prénylée sur le noyau B et méthylée sur l'hydroxyl du noyau A (Jamil et al., 2008). L'acylation des DHC a été observée à plusieurs reprises chez le Pommier, sans que toutefois leur structure n'ait été élucidée (Leser et Treutter, 2005 ; Strissel et al., 2005). La quantité de ces composés dans les feuilles reste faible (de l'ordre de quelques mg/g de MS), en comparaison avec les formes non modifiées.

Comme indiqué dans le chapitre I, *Erwinia amylovora* provoque, sur ses hôtes sensible et résistant du genre *Malus*, l'induction d'un gène codant une polyphénol oxydase et comme écrit au début de cette partie, la phloridzine est un bon substrat pour les PPO de Pommier. Par ailleurs, les données précédentes montrent que les peroxydases sont activées au cours de l'interaction (Venisse et al., 2002). De plus, les DHC constitutives disparaissent massivement dans les feuilles de Pommier infectées par *Ea*, aussi bien en situation compatible (sur MM106) et incompatible (sur Evereste) (Pontais et al., 2008), et l'hypothèse est faite que leur disparition est liée à leur oxydation en produits non détectés dans cette analyse. Des travaux récents ont permis la caractérisation d'un produit d'oxydation de la phloridzine issu de la catalyse par une tyrosinase fongique (Guyot et al., 2007). Toutefois, la structure proposée dans ce cas est différente des polymères de phloridzine suggérés par Sarapuu (1971), obtenus au cours de l'incubation de la phloridzine en présence d'extraits

enzymatiques de Pommier. Pour tenter de comprendre les mécanismes responsables de la disparition des DHC dans les tissus infectés de Pommier, il a été entrepris d'analyser *in vitro* et dans des broyats les différents processus capables de transformer la phloridzine, DHC commune à tous les géotypes étudiés. L'objectif est de déterminer si les processus de transformation sont différentiels entre géotypes, et aboutissent à des produits impliqués dans le devenir de l'interaction, compatible vs incompatible.

## II.2. Etude enzymatique des réactions de transformation des DHC du Pommier et caractérisation moléculaire des PPO

Quatre activités enzymatiques potentiellement impliquées dans les processus de transformation de la phloridzine (crésolase, catécholase, peroxydase et  $\beta$ -glucosidase) ont été dosées dans des feuilles d'Evereste et de MM106 infectées par la bactérie. Une étude moléculaire sur la famille de gènes codant des PPO dans les deux génotypes a également été entreprise, pour mettre en évidence l'éventuelle présence d'isoformes différentielles.

### II.2.1. Activités des enzymes de transformation au cours de l'interaction

Les activités PPO crésolase et catécholase, mesurées par l'oxydation de la phloridzine et du 4-méthylcatéchol respectivement, ont été étudiées pour déterminer leur comportement au cours de l'interaction et avoir une idée de la nature des produits de transformation (formation de polymères insolubles catalysée par les PPO). L'activité laccase n'est pas rapportée ici car l'hypothèse principale de ce travail implique la transformation de la phloridzine, un monophénol non oxydable directement par une laccase. Les activités peroxydase et  $\beta$ -glucosidase ont également été étudiées. La figure II.16. illustre le fait que les produits d'oxydation de la phloridzine sont différents selon la nature du système oxydant utilisé. Le but de cette partie est aussi de pouvoir déterminer comment l'activité PPO se situe de manière temporelle par rapport à l'activité peroxydase et  $\beta$ -glucosidase, ce qui pourrait influencer la nature des produits de transformation.

#### *II.2.1.a) Détermination du pH optimal d'activité des PPO*

Il existe plusieurs isoformes de PPO chez le Pommier, pouvant exhiber des affinités de substrats ainsi que des pH optimaux spécifiques (Ni Eidhin et al., 2006). Pour déterminer l'activité PPO globale dans les feuilles de Pommier infectées par *Ea*, il a été nécessaire dans un premier temps de déterminer le pH optimal de la réaction dans des extraits enzymatiques totaux d'Evereste et de MM106. Ces extraits enzymatiques ont été préparés à l'aide de Triton X100 et de PVPP (cf. Matériel et Méthodes), ce qui permet, d'une part d'extraire les PPO potentiellement liées aux membranes, et d'autre part de piéger les produits

phénoliques contenus dans l'extrait et qui pourraient influencer sur les activités de transformation (Riley, 2000). Concernant les substrats, la phloridzine, qui est un monophénol (Fig.II.3.C pour sa structure), a été utilisée pour tester l'activité crésolase car cette DHC est présente chez Evereste et MM106 ainsi que dans tous leurs descendants (Fig.II.10.). L'hypothèse de cette étude est donc qu'une aptitude à transformer différenciellement la phloridzine pourrait être impliquée dans la résistance à *Ea*. La phlorétine n'a pas été utilisée en raison de sa très faible solubilité en milieu aqueux. L'activité catécholase a été dosée en utilisant le 4-méthylcatéchol car, bien qu'artificiel, il est généralement un bon substrat pour les PPO de Pommier (Ni Eidhin et al., 2006). Pour les mesures, la détection ne s'est pas faite par mesure directe de l'absorbance des quinones formées, mais par mesure indirecte après réaction avec un nucléophile, le MBTH, formant des adduits colorés avec les quinones (Espin et al., 1997). Concernant l'activité crésolase (Fig.II.17.A1), une importante différence de pH optimal apparaît entre MM106 et Evereste, puisque l'extrait enzymatique de MM106 est plutôt actif sur la phloridzine à pH 7,5 tandis que celui d'Evereste est actif à pH acide (maximum à pH 4). L'activité catécholase suit approximativement le même profil (Fig.II.17.A2), mais les résultats suggèrent que l'extrait enzymatique d'Evereste est également actif à pH 7,5, en plus d'être très actif à pH acide. Mocha et Morais (2001) ont montré que l'activité d'une PPO isolée de pommes de la variété Jonagored sur le catéchol est caractérisée par deux pH optimaux, l'activité la plus forte étant à pH neutre. Pour la suite des dosages, les activités crésolase et catécholase ont été systématiquement dosées à pH 4,5 et pH 7,5 car il a été établi qu'au cours de l'interaction le pH des espaces intercellulaires s'acidifie aux alentours de pH 5,5 et probablement plus bas de manière localisée (Pontais et al., 2008). Bien qu'à pH 4 les deux activités soient maximales pour l'extrait d'Evereste, le pH 4,5 a été retenu car il est peu probable que le pH 4 représente un pH physiologique *in planta*. Le pH 7,5 a également été utilisé pour rendre compte d'une activité PPO potentielle chez MM106.

### ***II.2.1.b) Erwinia amylovora induit fortement les activités crésolases et catécholases chez ses hôtes***

La moitié des feuilles utilisées pour l'analyse transcriptomique ont été broyées afin d'extraire les enzymes solubles totales. Pour rappel, un gène de PPO a été retrouvé particulièrement induit, dès 6h, au cours de l'interaction dans les deux génotypes (cf.

chapitre I). Au cours de l'interaction, l'activité catécholase est induite dans les deux génotypes et aux deux pH (Fig.II.17.B). Elle est maximale 48 hpi, cependant à pH 4,5, elle est significativement ( $p < 0,05$ ) plus forte chez Evereste (environ 5  $\Delta$ DO/mg de protéines, contre 2  $\Delta$ DO/mg de protéines chez MM106). A pH 7,5 en revanche, l'activité catécholase est similaire entre les deux génotypes, ce qui est en accord avec les pH optimaux décrits ci-dessus. En ce qui concerne l'activité crésolase, elle est plus faible que l'activité catécholase. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'oxydation des monophénols en quinones est plus lente car l'activité crésolase est limitante chez les tyrosinases (Riley, 2000), en raison du passage de la forme *met* à la forme *oxy* qui implique la fixation d'une molécule d'oxygène. A pH 7,5, l'activité crésolase augmente faiblement et est significativement plus forte chez MM106 à 48 h. A pH 4,5, l'augmentation est plus nette et semble plus précoce chez Evereste (à 24h) bien que la différence ne soit pas statistiquement significative ( $p > 0,05$ ). D'une façon générale, les activités catécholase et crésolase sont induites au cours de l'interaction, de manière significative dans les deux génotypes, par rapport au niveau constitutif (T0). Le fait que ces activités fonctionnent à deux pH éloignés implique soit l'existence d'au moins deux isoformes, soit d'une même enzyme capable de fonctionner aux deux pH. Cependant, il est possible que l'activité catécholase, active à pH 4,5 et différentielle entre les deux génotypes provienne d'une isoforme de catéchol oxydase qui serait présente chez Evereste mais absente chez MM106. Ces différences, bien que faibles, sont peut-être à l'origine de transformations différentielles au cours de l'interaction avec *Ea*. En effet, à pH acide, l'activité catécholase étant plus forte chez Evereste, pourrait être à l'origine d'une production plus importante de quinones que chez MM106, et ces quinones pourraient être directement actives contre *Ea*. Il est donc important de caractériser les PPO potentiellement impliquées dans ces processus.

L'activité peroxydase est induite par *Ea* dans les deux génotypes (Fig.II.17.B), de manière non différentielle, ce qui est en accord avec les données de Venisse et al. (2002). La production d' $H_2O_2$  dans les feuilles infectées de Pommier n'a pas encore été montrée à ce jour, mais il se pourrait que l'activité peroxydase mesurée ici participe à l'oxydation de la phloridzine en radical phénoxy. Concernant l'activité  $\beta$ -glucosidase, elle est présente dans les deux génotypes, mais elle ne semble pas affectée par *Ea*. De plus, il semble que le dosage soit très variable d'un échantillon à un autre, ce qui suggère que le substrat utilisé, l'*o*-nitrophénol-glucopyranoside n'est pas forcément approprié. Dans tous les cas, les deux

génotypes possèdent une telle activité, qui semble plus élevée chez MM106, bien que cette différence ne soit pas significative.

### II.2.3. Caractérisation moléculaire des PPO d'Evereste et de MM106

Afin de vérifier l'existence d'une catéchol oxydase uniquement chez Evereste, le clonage de gènes codant des PPO a été entrepris dans les feuilles d'Evereste et de MM106. Ce travail a été réalisé en collaboration avec E. Vergne-Gaillard au cours de son stage post-doctoral (projet collaboratif UMR GenHort/UMR PaVé). L'analyse présentée ci-dessous regroupe les principales caractéristiques des PPO obtenues.

#### *II.2.3.a) Obtention des transcrits de PPO et analyse des séquences protéiques*

Plusieurs EST codant hypothétiquement des PPO étaient disponibles au début de ce travail dans les banques de données. Des amorces adaptées à la RACE-PCR ont été dessinées pour cloner les extrémités 5' et 3' de chacun de ces EST. Sur les séquences complètes obtenues (après rassemblement des extrémités 5' et 3'), des PCR longue distance ont été réalisées pour confirmer la séquence. De cette manière, trois PPO ont pu être obtenues entièrement : il s'agit de PPOp, clonée chez MM106 (98% d'homologie avec MdPPO2, N° accession AF 380300, isolée de la variété Fuji par Kim et al., 2001), de PPO1, clonée dans les deux génotypes (98% d'homologie avec PPO1, N° d'accession L29450, isolée de feuilles de la variété Ganny Smith par Boss et al., 1995), et de PPO3, obtenue uniquement chez Evereste (84% d'homologie avec une PPO de *Prunus armeniaca*, N° d'accession AF 020786, Chevalier et al., 1999). Le fait que toutes les séquences n'aient pas pu être clonées dans tous les cas dans les deux génotypes suggère un polymorphisme nucléotidique suffisamment important pour avoir empêché certaines amplifications par PCR. Les séquences de PPO1 sont homologues à la PPO caractérisée par Boss et al. (1995), cependant elles doivent être confirmées car certaines délétions (originelles ou liées au clonage) ont été observées par alignements de ces séquences par Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/>). Pour les analyses suivantes, la séquence de PPO1 disponible dans les banques de données a été utilisée (N° d'accession, AAA69902).

Afin de déterminer les caractéristiques de ces PPO, leur séquence protéique hypothétique a été déterminée en fonction des homologies avec les séquences connues puis

l'ensemble des séquences a été aligné. Les motifs connus des PPO (peptide signal, centres cuivre,...) ont alors été recherchés, par analogie avec le travail de Marusek et al. (2006) et en s'appuyant sur des données obtenues sur les structures de PPO. De plus, les séquences d'une PPO de vigne (N° d'accèsion S 52629 ; Dry et Robinson, 1994) et de l'aureusidine synthase d'*Antirrhinum* (N° d'accèsion BAB60048 ; Ono et al., 2006), toutes deux bien caractérisées, ont été ajoutées à l'alignement pour la détection et la comparaison des motifs remarquables. L'aureusidine synthase, PPO biosynthétique, impliquée dans l'hydroxylation de chalcones, est particulièrement intéressante car la sieboldine pourrait être formée selon le même processus, par hydroxylation crésolase-dépendante de la trilobatine (cf. première partie de ce chapitre). La séquence homologue à une autre PPO détectée chez Evereste et MM106, mais qui n'a pas pu être clonée dans sa totalité, PPO2, a été incluse dans l'analyse (l'EST PPO2 est homologue à 72% à une PPO de *Prunus salicina*). L'alignement présenté dans la figure II.18.A met en évidence la présence de séquences conservées. Il s'agit principalement des sites CuA et CuB, portant chacun trois histidines coordonnant un atome de cuivre chacun (Marusek et al., 2006). Dans le site CuB se trouve un résidu phénylalanine (F) conservé, supposé limiter l'accès au site CuA dans le repliement de la protéine (Fig.II.15. A et B ; Klabunde et al., 2008). Un résidu cystéine conservé est retrouvé dans le site CuA et serait impliqué dans l'établissement de ponts disulfures avec l'extrémité N-terminale (Marusek et al., 2006). Le résidu conservé arginine (en rouge dans la Fig.II.18.A) interagit dans la structure secondaire de la protéine avec le motif tyrosine (en violet) situé juste avant le site de protéolyse du domaine C-terminal. Cette interaction est très importante car elle assure la cohérence des feuilletts  $\beta$  de la protéine (Flurkey et Inlow, 2008). Tous ces motifs décrits jusqu'à présent sont conservés entre toutes les PPO présentes dans l'alignement. Du côté N-terminal, un motif d'adressage au thylakoïde est retrouvé dans toutes les PPO (DRRNVLLGL avec des variations possibles) sauf pour l'aureusidine synthase qui est vacuolaire et porte le motif (NSLAY) d'adressage à la vacuole (Ono et al., 2006). Ainsi, les séquences indiquent que les PPO de *Malus* étudiées ici sont toutes chloroplastiques, ce qui est en partie confirmé avec la prédiction WoLF PSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) qui attribue une localisation chloroplastique à ces séquences. L'alignement ne permet pas de déterminer si les PPO de Pommier sont des tyrosinases ou des catécholases, étant donnée les fortes similarités des domaines actifs. Decker et al. (2006) font l'hypothèse que l'accès au site CuA pourrait être déterminant dans l'activité crésolase, car dans une tyrosinase fongique, le site CuB ne contient pas le résidu phénylalanine potentiellement impliqué dans

la restriction au site CuA. Toutefois, l'aureusidine synthase, qui a une activité crésolase fonctionnelle, porte un résidu phénylalanine dans son site CuB, ce qui suggère que ce résidu ne joue probablement pas de rôle dans l'activité crésolase. Les différentes PPO de *Malus* ont été alignées avec les séquences de PPO d'autres genres de plantes, parmi lesquels se trouvent le peuplier, la tomate, la fève et le blé. Le phylogramme présenté Fig.II.18.B. montre que les PPO du Pommier ne se ressemblent pas entre elles, sauf pour PPO2 et PPO3, qui sont par ailleurs différentes des autres. PPO1 est groupée avec les PPO du peuplier, tandis que PPOp est groupé avec les PPO de tomate. Cet arbre phylogénétique illustre la diversité des PPO aussi bien chez les autres plantes que chez le Pommier. Derrière cette diversité se cachent très certainement des profils d'expression et des affinités de substrats différents, comme cela a été démontré chez la tomate, par exemple (Thipyapong et al., 1997).

L'alignement permet toutefois de prédire la taille et le pI des peptides matures, tels qu'ils seraient après activation par protéolyse des extrémités N- et C-terminales (Flurkey et Inlow, 2008). Les pI et masses prédites (par l'outil Compute pI/MW sur le site ExpASy, [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)) pour les formes non-matures (non-protéolysées) et matures (hypothétiquement protéolysée aux domaines N-et C-terminaux) sont indiqués dans la figure II.18.C. Si les sites de protéolyse *in planta* correspondent bien à ceux attribués ici, les protéines changent considérablement de pI. Cependant, les masses des protéines matures sont probablement artificielles dans la mesure où le clivage de la partie C-terminale se fait certainement plus en aval (Flurkey et Inlow, 2008). De plus, le clivage de cette partie a été décrit dans d'autres espèces et résulte en une perte d'un peptide de taille inférieure à 20 KDa, comme par exemple chez *Vicia faba* (Robinson et Dry, 1992). Le site de clivage reste donc à être déterminé précisément.

### *II.2.3.a) Profils d'expression des PPO au cours de l'interaction*

La figure II.19.A rapporte les expressions des gènes des 4 PPO de Pommier (*PPO1*, *PPO2*, *PPO3* et *PPOp*) qui ont été identifiées chez Evereste et MM106, dans deux répétitions biologiques indépendantes. L'infection par la bactérie provoque une très forte induction du gène *PPO1*, comme précédemment rapporté dans le chapitre I (*PPO1*=PPO dans l'analyse transcriptionnelle). Cette induction est similaire dans les deux génotypes, mais il semble qu'elle se prolonge chez MM106 (environ 4x plus exprimé chez Evereste et 6x plus exprimé

chez MM106, par rapport au calibrateur d'Evereste). L'examen des données révèle tout de même d'autres différences entre les deux génotypes. Il apparaît que les gènes *PPO3* et *PPOp* sont constitutivement exprimés de manière plus forte chez Evereste (valeurs à t0 et au cours de l'infiltration par l'eau). Pour *PPO2*, l'inverse est observé car le gène codant cette PPO est très peu exprimé chez Evereste, par rapport à MM106. Cette étude d'expression montre que chaque PPO est régulée de manière spécifique, et ce, probablement de manière différentielle entre les deux génotypes. Pour déterminer toutes les isoformes existant chez Evereste et MM106 et établir leur profil d'expression au cours de l'interaction, les extraits enzymatiques de ces deux génotypes ont été soumis à une IEF (Iso-Electro-Focusing) qui sépare les protéines selon leur pI. Les activités catécholases ont été révélées *in situ* par addition du substrat 4-méthylcatéchol et du nucléophile MBTH. Globalement, les profils constitutifs et après infiltration par de l'eau sont très similaires entre les deux génotypes même s'il semble qu'il y ait quelques isoformes différentielles, notamment avec un pI d'environ 5,5 (Fig.II.19.B). Ces PPO pourraient être les PPO1, PPO2 et PPO3 sous leur forme mature dont le pI prédit est compris entre 5,16 et 5,6 (Fig.II.18.C). Des différences apparaissent clairement 24h après infection par *Ea*, avec notamment l'apparition de trois isoformes chez MM106 ayant des pI compris entre 6 et 7,5, ainsi que l'apparition d'une isoforme à pI proche de 5. Ces PPO ayant un pI > 6 pourraient correspondre à des formes non-matures des PPO identifiées ci-dessus. Chez Evereste, il n'y a pas vraiment d'apparition de nouvelles formes, si ce n'est quelques isoformes retrouvées d'ailleurs chez MM106 et qui ont un pI plus acide que celles trouvées constitutivement. Une PPO de pI inférieur à 5,1 est détectée avec une très forte intensité dans les deux génotypes. Il pourrait s'agir de la forme mature de PPOp, dont le pI prédit est de 4,9 (Fig.II.18.C). Etant donnée l'induction importante du gène *PPO1*, il est assez étonnant de ne pas retrouver un signal spécifiquement induit 24 h après infiltration dans les deux génotypes. Etant donné le grand nombre de PPO détectées sur ce gel, il reste cependant un nombre important de PPO et/ou isoformes à cloner et à caractériser chez Evereste et MM106. De plus, il serait particulièrement intéressant de mettre au point un protocole pour lequel la phloridzine servirait de substrat pour mettre en évidence les activités crésolases sur les gels IEF. La séparation d'extraits enzymatiques constitutifs par SDS-PAGE apporte également des informations complémentaires (Fig.II.19.C). Ceci a été possible car les PPO sont particulièrement tolérantes au SDS et celui-ci peut même augmenter leur activité (Robinson et Dry, 1992 ; Mari et al., 1997). Dans les deux génotypes, un signal majoritaire, mais de

taille différente (à 29 KDa chez Evereste et environ 35 KDa chez MM106), est détecté après coloration au 4-méthylcatéchol. Chez MM106, ce signal pourrait correspondre à l'une des PPO caractérisées ici sous sa forme mature car les masses moléculaires sont similaires. En revanche, chez Evereste, le peptide détecté à 29 KDa pourrait correspondre à une PPO encore non clonée chez le Pommier, ou bien une isoforme subissant une maturation plus importante. Toutefois, Mari et al. (1997) ont réussi à isoler une PPO de *Malus* (variété Granny Smith) existant sous différentes formes, dénaturée ou non, protéolysée ou non. Dans le cas de la forme protéolysée et non dénaturée, la taille observée de cette PPO en SDS-PAGE était de 27 KDa. Concernant Evereste, le signal obtenu à 29 KDa pourrait en réalité correspondre à une forme mature mais non dénaturée, ce qui devra être vérifié en faisant migrer de la même manière un extrait ayant subi un traitement dénaturant (chaleur ou réduction). De plus, un signal est détecté à 60 KDa environ et il pourrait s'agir de la forme non protéolysée de PPO1, sa forme mature non dénaturée étant observée à 29 KDa. Ceci n'est pas observé chez MM106, chez qui une seule protéine est détectée sur ce gel. Ainsi, il se pourrait qu'il y ait une forme « de réserve » chez Evereste, latente, qui n'existerait pas chez MM106.

L'ensemble de ces résultats montrent que dans leur globalité, les activités crésolase et catécholase sont induites dès 24 h, et qu'*a priori* Evereste et MM106 ont la même capacité à oxyder la phloridzine, avec des affinités proches (Fig.II.17.B). Ces activités sont majoritairement dues à des PPO similaires entre les deux génotypes, bien que quelques isoformes soient différentiellement exprimées. Au cours de l'interaction, les DHC sont donc susceptibles d'être oxydées à la fois par l'activité peroxydase et l'activité polyphénol oxydase. Chez Evereste toutefois, les résultats montrent une plus forte activité catécholase au pH physiologique de l'interaction (pH 5). Ainsi, cette activité pourrait être liée à la transformation de la sieboldine, un *o*-diphénol qui ne requiert pas d'hydroxylation par une activité crésolase.

Les résultats acquis dans ce paragraphe suggèrent que les DHC se retrouvent, au cours de l'interaction, avec un ensemble de plusieurs enzymes ayant des affinités différentes et catalysant des réactions spécifiques (déglucosylation, hydroxylation, oxydation). L'enjeu des paragraphes suivants va être de déterminer comment se hiérarchisent chacune de ces réactions les unes par rapport aux autres pour évaluer la nature des produits de transformation.

## **II.2.4. Transformation de la phloridzine *in vitro* en présence d'extraits enzymatiques totaux**

Afin d'appréhender les mécanismes sous-jacents à la transformation de la phloridzine par les activités enzymatiques de la plante, une cinétique de réaction entre ce substrat et des extraits enzymatiques totaux de feuilles d'Evereste et de MM106 a été mise en place. Des prélèvements ont été effectués au cours du temps pour (i) étudier le pouvoir antibactérien des produits de transformation et (ii) les identifier. La phloridzine a été utilisée à 5 mM, équivalent à la concentration physiologique.

### *II.2.4.a) Les produits de transformation sont antibactériens*

Au temps initial ( $t_0$ ), la croissance des bactéries n'est pas affectée par le dépôt, ce qui indique que les enzymes et les substrats initiaux ne sont pas toxiques pour celles-ci (Fig.II.20.A). Cependant, des halos d'inhibition de croissance de la bactérie (absence de la nappe bactérienne à l'emplacement du dépôt) apparaissent après 30 min, suggérant que des produits issus de la transformation de la phloridzine par les enzymes d'Evereste et MM106 sont antibactériens. Cette inhibition de croissance est visible dans MM106 quel que soit l'échantillon, mais chez Evereste uniquement avec les extraits enzymatiques de feuilles infectées après 30 min de réaction. A 1h, l'inhibition est très forte pour tous les échantillons, tandis qu'après 2h de réaction, les produits formés en présence des extraits enzymatique de MM106 ont tendance à être moins bactéricides ou bactériostatiques. Toujours à 2h, les produits de réaction de la phloridzine avec les extraits d'Evereste inhibent encore la croissance de la bactérie. Ces résultats suggèrent donc que les processus de transformation diffèrent entre les deux génotypes et qu'ils sont à l'origine d'un pouvoir antibactérien différentiel.

### *II.2.4.b) Identification des produits de transformation*

- *La déglucosylation est une réaction essentielle*

Indépendamment de la présence d'extraits enzymatiques constitutifs ou de feuilles infectées, il se produit dans tous les cas une libération de phlorétine à partir de la phloridzine qui est révélée par CCM (Fig.II.20.B). La semi-quantification de la phlorétine libérée au cours du temps a été effectuée à l'aide d'une gamme de différentes

concentrations connues de phlorétine déposée sur la plaque (Fig.II.20.B et C). Ces résultats montrent que, indépendamment de l'infection, les extraits enzymatiques de MM106 provoquent une libération plus importante de phlorétine. Par exemple, les extraits enzymatiques constitutifs de MM106 convertissent la quasi-totalité de la phloridzine après 1 h de réaction (1,75 µg de phlorétine libérée) tandis que ceux d'Evereste libèrent moins de 0,5 µg de phlorétine durant la même période. Dans les extraits de feuilles infectées des deux génotypes, l'activité de déglucosylation est beaucoup moins forte dans les deux génotypes (seulement 0,5 µg de phlorétine libérée pour les extraits de MM106 et moins de 0,1 µg pour ceux d'Evereste). L'utilisation du gluconolactone (inhibiteur de  $\beta$ -glucosidase; Dai et al., 1998) dans le milieu d'incubation permet d'abolir toute activité antimicrobienne (Fig.II.21.A), et ce en lien avec l'absence de libération de phlorétine dans les deux génotypes (Fig.II.21.B). L'action du gluconolactone est dose-dépendante car à 2,5 mM l'inhibition du pouvoir antibactérien chez MM106 n'est pas totalement supprimé (Fig.II.21.C). Il semble donc que la phloridzine est très rapidement déglucosylée par les extraits enzymatiques de MM106, ce qui provoque l'apparition d'un pouvoir antibactérien généré par la phlorétine, qui a une CMI très faible sur *Ea*, de l'ordre du mM (Pontais et al., 2008). Cependant le fait qu'après 2 h de réaction le milieu réactionnel ne soit plus antibactérien soulève deux hypothèses : (i) lors du dépôt sur boîte, la réaction évoluerait encore légèrement et par conséquent le profil méthanolique obtenu serait légèrement décalé par rapport à l'observation sur boîte ; suivant cette hypothèse, il y aurait conversion de la phlorétine, peut-être par oxydation, en un composé moins actif contre la bactérie. (ii) La phlorétine est extrêmement insoluble en milieu aqueux, il est possible qu'étant donnée sa forte concentration chez MM106 en fin de réaction, celle-ci précipite et ne soit plus biodisponible. Ces deux hypothèses pourront être aisément vérifiées en récupérant un peu d'agar sur lequel le dépôt a été fait, de solubiliser avec du méthanol puis de l'analyser par CCM ou LC-MS. Concernant Evereste, la déglucosylation est quantitativement moins importante que chez MM106, surtout avec les extraits enzymatiques de feuilles infectées. Cependant le pouvoir antibactérien reste très fort après 2 h de réaction. Comme suggéré ci-dessus, il est possible que la réaction continue d'évoluer sur boîte et que le pouvoir antibactérien observé résulte d'une libération « non contrôlée » de phlorétine, c'est-à-dire qu'au moment du dépôt sur la nappe bactérienne, l'enzyme et le substrat continuent à interagir. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le gluconolactone abolit de manière très efficace l'activité antibactérienne (Fig.II.20.A et II.21.A) ; ceci devra être vérifié par CCM comme décrit ci-dessus.

- *Les réactions d'oxydation dépendent également de l'activité  $\beta$ -glucosidase*

Bien que la CCM constitue un système analytique moins performant (sensible) que l'HPLC, l'étude de l'incubation de la phloridzine avec les extraits enzymatiques d'Evereste et de MM106 en présence ou non de gluconolactone révèle l'existence des processus d'oxydation. Effectivement, d'une part le milieu réactionnel se colore en jaune et de plus un pigment jaune est détecté dans les échantillons d'Evereste par CCM (Fig.II.20.B) ce qui corrèle avec les activités PPO mesurées dans la partie précédente. De plus, l'analyse LC-DAD-MS des produits de réaction obtenus avec les extraits d'Evereste révèle la présence de pigments absorbant à 400 nm (Fig.II.22.A, courbe rouge) et donc probablement responsables de la coloration jaune. En revanche chez MM106, l'oxydation reste faible, ce qui est confirmé par les profils LC-DAD-MS, dans lesquels il n'y a pratiquement pas de composés absorbant en dehors des UV (données non présentées). Un composé en particulier apparaît en quantité importante dans les extraits d'Evereste ( $R_t = 38,6$  min). Son spectre de masse indique un ion pseudo-moléculaire de rapport  $m/z=559$  ainsi que deux ions fils à  $m/z = 379$  et  $m/z = 273$ . Ce dernier ion fils suggère que le composé parent comporte une molécule de phlorétine ( $[M-H]^- = 273$ ) et étant donné son poids important, qu'il est le produit d'un réarrangement inter-moléculaire. La différence de masse  $[560-274-2H]$  implique une structure de type quinone de 3-hydroxyphlorétine  $[290-2-H]$ . Il se peut donc que le composé de rapport  $m/z = 379$  soit le résultat d'un couplage oxydatif entre une quinone de 3-hydroxyphlorétine et une molécule de phlorétine (Fig.II.22.B). Ce composé serait sous sa forme quinonique car le couplage entre phloridzine et 3-hydroxyphlorétine donnerait un ion  $[290+274-2-1] = 561$ . Il y a donc une différence de 2 unités de masse qui peut être expliquée par la perte des 2 atomes d'hydrogène des groupements hydroxyles du noyau catéchol (forme quinonique). De plus, la différence  $[560-380-2H-H] = 180$  correspond parfaitement au site de clivage situé sur la liaison entre le carbone  $\beta$  et le noyau catéchol, sans modification de masse. Ceci implique que les 2 unités de masse « manquantes » ( $[290+274-2-1] = 561$ ) sont situées sur le noyau catéchol. La formation de ce composé est proposée dans la figure II.22.B, à partir de données bibliographiques (Sarapuu, 1971 ; Sarapuu et Kheinaru, 1971 ; Guyot et al., 1996). L'existence de ce conjugué résultant du couplage entre une *o*-quinone et la phlorétine renforce la probabilité d'une activité crésolase efficace sur la phlorétine ou bien alors que l'oxydation se fait sur la phloridzine et dans ce cas le conjugué glycosylé résultant (quinone de 3-hydroxyphloridzine-phlorétine) serait très rapidement déglycosylé. Le composé de rapport  $m/z = 559$  est cependant produit

en moins grande quantité à partir des extraits infectés, au profit d'autres pigments élués plus tôt (entre 10 et 20 min). Ces derniers correspondent d'ailleurs au POP décrit par Guyot et al. (2007), issu de l'oxydation tyrosinase-dépendante de la phloridzine et impliquant plusieurs réarrangements intramoléculaires. Étonnamment, ces composés absorbent fortement à 400 nm mais leur détection par MS est plus faible. Ils sont également responsables de la coloration du milieu réactionnel. Le gluconolactone joue un rôle tout à fait intéressant sur les réactions menant à la production de ces différents composés (Fig.II.22.A.). Effectivement, l'inhibiteur de l'activité  $\beta$ -glucosidase empêche la formation du conjugué 3-hydroxyphlorétine-phlorétine ( $m/z = 559$ ) et au contraire favorise la formation du POP. De plus, les extraits enzymatiques issus de feuilles infectées d'Evereste, dans lesquels l'activité  $\beta$ -glucosidase est très faible (Fig.II.20.C), accumulent naturellement plus de POP et moins de 3-hydroxyphlorétine-phlorétine. Ces différentes observations indiquent que les enzymes de transformation de la phloridzine entrent en compétition en présence de leur substrat, et que la réaction principale qui semble gouverner la nature des composés finaux est la déglucosylation. L'activité  $\beta$ -glucosidase précédemment dosée (Fig.II.17.B) a donc une réelle signification dans la transformation des DHC. En fonction de l'intensité de celle-ci, les produits finaux sont différents : (i) lorsque la phlorétine est libérée, elle est oxydée par une tyrosinase pour former une quinone de 3-hydroxyphlorétine capable de se coupler avec une autre molécule de phlorétine; (ii) lorsque la phlorétine n'est pas libérée, comme lors de l'incubation en présence de l'inhibiteur de  $\beta$ -glucosidase, l'oxydation de la phloridzine en quinone de 3-hydroxyphloridzine par la tyrosinase présente dans le milieu réactionnelle a lieu ainsi que plusieurs réarrangements moléculaires subséquents pour former du POP.

- *Produits de transformation et activité antimicrobienne*

Comme noté précédemment, il semble évident que la phlorétine libérée en conséquence par les extraits enzymatiques de MM106 exhibe un fort pouvoir antibactérien. En revanche, le fait que cette activité antibactérienne disparaisse reste inexplicé pour l'instant. Lorsque ces mêmes extraits réactionnels correspondant sont étudiés en LC-MS (après 2 h de réaction), deux différences importantes sont visibles : (i) les quantités libérées de phlorétine sont comparables entre les deux génotypes mais les extraits enzymatiques de MM106 ont consommé l'ensemble de la phloridzine alors que (ii) ce n'est pas le cas pour ceux d'Evereste. De plus, pour ce dernier, le conjugué 3-hydroxyphlorétine-phlorétine est produit au cours de cette réaction (Fig.II.23.). Dans ces conditions, il est étonnant de voir que la

phloridzine a totalement « disparu » avec les extraits enzymatiques de MM106 alors que des quantités similaires de phlorétine ont été produites par les deux génotypes. Ceci soulève deux questions importantes : (i) que devient la phloridzine dans l'incubation avec les enzymes de MM106 ? Se produit-il un phénomène similaire à celui observé au cours de l'interaction (i.e. disparition des DHC) ? Existe-t-il une autre activité enzymatique, fonctionnant en parallèle et responsable de cette disparition ? (ii) la production du conjugué chez Everest suffit-elle à expliquer le « maintien » de l'activité antibactérienne qui n'est pas observée chez MM106 ? Ces différents points devront faire l'objet d'études plus approfondies : caractérisation de nouvelles réactions enzymatiques (e.g., oxydation peroxydase- et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dépendante de la phloridzine qui pourrait produire des radicaux différents) et test de l'activité antibactérienne du ou des conjugués ainsi formés. Chez Everest, le gluconolactone supprime toute activité antibactérienne, très certainement par inhibition de la libération de phlorétine. De plus, l'utilisation de cet inhibiteur montre que le POP produit chez Everest n'est vraisemblablement pas antibactérien dans nos conditions (Fig.II.21.A). Alternativement, il se peut qu'il ne soit pas en quantité suffisante pour être antibactérien.

L'activité antibactérienne des produits de transformation de la catéchine et de l'épicatéchine a été testée et comparée à celle des produits de transformation de la phloridzine. La mesure de la croissance bactérienne (Fig.II.24.A) révèle que les produits d'oxydation des deux flavanols n'ont aucun effet sur *Ea*, bien que l'oxydation ait eu lieu rapidement (coloration du milieu réactionnel en jaune/orangé ; Fig.II.24.B). A l'inverse, et en accord avec les résultats précédents, l'incubation de la phloridzine avec les extraits enzymatiques d'Evereste est liée avec l'apparition d'un pouvoir antibactérien mais qui finit tout de même par disparaître. Des résultats similaires ont été obtenus avec les extraits enzymatiques de MM106, constitutifs et isolés de feuilles infectées (données non présentées). Comme mentionné précédemment, *Ea* possède des pompes d'efflux qui lui confère une certaine tolérance vis-à-vis des phytoalexines (Burse et al., 2004). Il est probable que ce mécanisme joue un rôle dans la tolérance aux produits d'oxydation de la phloridzine, et des flavonoïdes en général.

Pour déterminer si tous les processus décrits dans ce paragraphe ont une signification *in planta*, il a été entrepris de complexifier le modèle d'incubation en broyant des feuilles saines d'Evereste et de MM106 et de maintenir ces broyats à température ambiante sous agitation. Ceci permet théoriquement de mettre en contact enzymes et

substrats, dans un milieu pouvant contenir des activateurs ou des inhibiteurs naturels d'activités enzymatiques pouvant influencer les réactions de transformation, ce qui ne pouvait être pris en compte avec le modèle *in vitro*. Cette hypothèse est par ailleurs en accord avec les résultats d'Oszmianski et Lee (1991) qui ont montré que l'oxydation de la phloridzine par une tyrosinase fongique était accélérée en présence d'acide chlorogénique. La présence constitutive d'autres *o*-diphénols de manière constitutive dans les feuilles (catéchines par exemple ; Pontais et al., 2008) et en faibles concentrations pourrait ainsi exercer un effet similaire sur l'oxydation catalysée des DHC par les PPO.

### II.2.5. Etude de broyats de feuilles d'Evereste et de MM106

Pour cette série d'expériences, les feuilles saines d'Evereste et de MM106 sont broyées dans un tampon acétate pH 5,5, proche du pH physiologique de l'interaction (Pontais et al., 2008). Les homogénats résultants sont considérés comme le milieu réactionnel, maintenu à température ambiante et sous agitation. Ce milieu réactionnel contient les substrats et les enzymes, aux concentrations physiologiques, ainsi que des molécules pouvant modifier les réactions. Les résultats présentés ci-dessus ont permis de mettre en évidence que la transformation de la phloridzine par des extraits enzymatiques d'Evereste et de MM106 confère un fort pouvoir antibactérien dans les deux génotypes, celui-ci étant essentiellement lié à la libération de phlorétine par déglucosylation de la phloridzine. La présence d'un pouvoir antibactérien chez MM106 est évidemment en contradiction avec la sensibilité de ce génotype. Cependant, il est possible que l'observation de la déglucosylation de la phloridzine observée dans le modèle *in vitro* soit quelque peu artificielle en raison de la simplicité de ce modèle et ne corresponde pas à l'ensemble des processus de transformation prenant place *in planta*. L'utilisation des broyats comme modèle permettra donc de se rapprocher des conditions *in planta* et ainsi de déterminer si les transformations décrites ci-dessus sont toujours valables en milieu plus complexe.

#### *II.2.5.a) Etude des produits issus de la transformation des DHC dans des broyats de feuilles d'Evereste et de MM106*

La figure II.25.A présente l'évolution, au cours du temps, des broyats incubant à température ambiante et sous agitation. L'oxydation qui se produit est très forte, à en juger

par l'importante coloration marron, typique de formes oxydées de flavonoïdes (Robards et al., 1999 ; Pourcel et al., 2007).

Pour déterminer l'activité antibactérienne du milieu d'incubation, les feuilles ont été broyées dans une suspension bactérienne en milieu tamponné. Des prélèvements sont effectués à différents temps et sont utilisés pour inoculer un milieu riche et vérifier la viabilité des bactéries. La figure II.25.B présente les courbes de croissance de la bactérie après 30 min et 120 min d'incubation avec les broyats de feuilles. Les résultats indiquent que les broyats des deux génotypes sont très rapidement toxiques pour la bactérie. De plus, l'activité antibactérienne apparaît plus précocement chez MM106 que chez Everest. En effet, après 30 min de contact dans les broyats de ce dernier, la croissance de la bactérie est affectée mais pas abolie, ce qui n'est pas le cas avec le broyage des feuilles de MM106 (Fig.II.25.B). Il n'y a donc pas, sur la durée étudiée ici, de détoxification telle qu'elle a pu être mise en évidence dans le modèle *in vitro* (voir paragraphe précédent). L'activité bactérienne est totalement supprimée lorsque du PVPP, qui piège les polyphénols de manière non spécifique, est ajouté au milieu réactionnel. Ce résultat important souligne clairement le rôle des produits phénoliques du Pommier dans l'activité antibactérienne.

#### *II.2.5.b) Identification des produits de transformation*

La figure II.25.C montre les profils LC-UV/Vis à 280 nm (en noir) et 400 nm (en rouge). Les profils constitutifs, tels qu'ils ont été obtenus dans le début de ce chapitre sont initialement retrouvés à t<sub>0</sub>. Après 30 min d'incubation, une grande proportion de phloridzine a été convertie en phlorétine, dans les deux génotypes (Fig.II.25.C). Chez MM106 cependant, il semble qu'il y ait eu plus de phloridzine consommée que chez Everest. Après 1 h, la totalité de la phloridzine a été convertie dans les broyats de MM106. A l'inverse dans l'extrait d'Evereste, il reste toujours beaucoup de DHC constitutives, et plus particulièrement de sieboldine dont la quantité ne commence à diminuer qu'à partir d'1 h d'incubation. La quantité de phlorétine présente dans les extraits des feuilles des deux génotypes n'a pas évolué beaucoup durant la première heure. C'est à partir d'1 h d'incubation qu'apparaissent notamment plusieurs produits d'oxydation, colorés en jaune (absorbant à 400 nm) et ces derniers semblent plus nombreux chez Everest que chez MM106 (Fig.II.25.C, chromatogrammes en rouge). Après 2 h de réactions, les DHC constitutives ont pratiquement toutes disparu dans les deux génotypes, au profit de produits colorés qui

apparaissent en quantité importante. Chez MM106, même le pic de phlorétine commence à diminuer en intensité. Le principal composé absorbant à 400 nm chez ce génotype a un temps de rétention similaire au conjugué ( $m/z = 559$ ) décrit dans le paragraphe précédent. Il est également présent chez Evereste, bien qu'en plus faible quantité et il est accompagné de plusieurs autres composés absorbant également à 400 nm.

L'analyse détaillée des composés formés au cours de l'incubation, qui sont majoritairement des composés absorbant dans les UV longs ou dans le visible, révèle qu'ils peuvent être classés en 5 grandes catégories selon leur spectre d'absorption UV-Vis (Fig.II.26.) :

i) des composés présentant un maximum d'absorption à 280 nm ainsi qu'une dissymétrie de ce maximum avec un plateau vers les 350 nm (catégorie en bleu, Fig.II.26). Plusieurs structures exhibent cette propriété car les composés ont des rapports  $m/z$  différents : 447, 449, 559, 721, 723, 883, 899. La quinone de 3-hydroxyphlorétine-phlorétine est donc dans ce groupe de composés, mais également sa forme glucosylée (721) et glucosylée réduite (723). D'ailleurs, pratiquement toutes les déclinaisons sont possibles sur cette structure (Fig.II.18.E) : conjugaison entre deux composés glucosylés (883 correspondrait à une quinone de 3-hydroxyphloridzine-phloridzine [436+452-4H-1]), entre des composés 3-hydroxylés et glucosylés ([883+16]). Les composés 449 et 447 pourraient correspondre à des formes oxydées de 3-hydroxyphloridzine ou bien de sieboldine (perte de 2 unités de masses successives : quinone/chalcone) car ils ne sont trouvés que chez Evereste. Cette catégorie de composés est surreprésentée chez Evereste (9 versus 2 chez MM106), ce qui est très certainement dû en partie aux isomères phloridzine et trilobatine qui en s'associant par couplage oxydatif forment également des isomères et donc une plus grande variété de composés.

ii) La seconde catégorie regroupe des composés détectés uniquement chez MM106 et qui présentent la spécificité d'avoir un maximum d'absorption vers 400 nm mais pour lesquels les spectres de masse sont de moins bonne qualité (en jaune). Ceci est certainement dû au fait qu'ils sont présents en faible quantité car les signaux ne sont pas très distincts du bruit de fond. Les rapports  $m/z$  détectés sont 434, 440 et 449 principalement et sont en partie responsables du jaunissement des broyats de feuilles de MM106. Encore une

fois, l'interprétation est sujette à caution en ce qui concerne la masse de ces composés. Le composé  $m/z = 434$  pourrait correspondre à la forme phénoxy de la phloridzine (perte d'une unité de masse). Ce type de formes radicalaires est notamment produite par l'oxydation des monophénols par les peroxydases (Galati et al., 1999). Ce phénomène a donc pu se produire sur la phloridzine. Cependant, l'oxydation de la phloridzine par une tyrosinase fongique donne typiquement le même spectre UV-Vis, caractérisée par la diminution de l'absorbance à 280 nm et au contraire par son augmentation à 400 nm (Oszmianski et Lee, 1991 ; Le Guernevé et al., 2004). Il sera donc nécessaire de procéder à l'identification des composés correspondant aux différents pics, ou tout du moins dans un premier temps, les produire en quantité suffisante pour obtenir des spectres de masse plus fiables et préciser le mécanisme réactionnel sous-jacent à leur formation.

iii) Le troisième groupe contient des composés ayant deux maxima d'absorption, un à 280 nm et un autre à 420 nm. Il y a 2 de ces composés chez Everest, dont un présent en trop faible concentration pour déterminer son spectre de masse, et un autre, également présent chez MM106. Pour ce dernier, le  $m/z$  de l'ion majoritaire est 559 qui correspond au conjugué 3-hydroxyphlorétine-phlorétine décrit précédemment, avec le même fragment à  $m/z = 379$ . Il est donc étonnant de trouver un spectre d'absorption UV original pour ce composé. Il se peut qu'il y ait un problème de co-élution de composés, et que par conséquent les spectres soient altérés.

iv) La quatrième catégorie de composés est caractérisée par un maximum d'absorption à 350 nm et l'absence de pic majeur à 280 nm. Les  $m/z$  retrouvés sont 433, 447 et 463. Les  $m/z = 433$  et 447 correspondent vraisemblablement aux produits d'oxydation de la phloridzine et de la 3-hydroxyphloridzine ou de la sieboldine respectivement. Concernant la phloridzine, ne possédant pas de groupement catéchol, il pourrait s'agir de la création d'une insaturation entre les carbones  $\alpha$  et  $\beta$  pour former la chalcone correspondante. Pour la sieboldine, elle serait sous sa forme chalcone et quinonique simultanément ( $[451-2-2]=447$ ). La structure du composé 463 reste à déterminer. Il présente un ion fragment de rapport  $m/z=304$ . En comparaison avec le spectre de masse de la phloridzine, il y a donc une différence de 28 unités de masse. Selon les

données de Sarapuu (1971), le spectre UV/Vis de ces composés indique qu'ils pourraient être responsables de la coloration brune des broyats.

v) Le dernier groupe de composés ne comprend qu'un individu, détecté chez Evereste uniquement, et présente un spectre UV/Vis avec un maximum d'absorption à 280 nm. Son spectre de masse ( $m/z = 451$ ) et la dissymétrie du pic correspondant au maximum d'absorption indique qu'il s'agit de 3-hydroxyphloridzine. Il est assez étonnant de le détecter de manière non négligeable car l'oxydation de la phloridzine catalysée par une PPO aboutit directement à la quinone correspondante. La présence de 3-hydroxyphloridzine impliquerait donc un processus de réduction de la forme quinonique par gain d'électron. Celui-ci pourrait être donné par un antioxydant par exemple (l'acide ascorbique ou la vitamine E sont certainement présents dans le milieu réactionnel).

Pour résumer, il semble que l'ensemble des processus de transformation obtenus avec les broyats de feuilles et avec le modèle *in vitro* soient similaires : notamment, il se produit une importante et rapide libération de phlorétine, très rapidement. Cependant, après un certain temps d'incubation, les phénomènes d'oxydation et de couplages oxydatifs semblent prédominants et sont vraisemblablement responsables de l'apparition des pigments bruns et jaunes dans les broyats. Chez Evereste, l'ensemble de ces réactions aboutit à un large panel de composés dont la nature diffère de ceux obtenus dans le broyat de feuilles de MM106. La disparition de la phloridzine chez ce dernier est bien entendu liée en grande partie à la déglucosylation en phlorétine (Fig.II.20 et 21) mais il semble que son oxydation directe soit également possible. Cette oxydation forme soit la chalcone correspondante ou la forme phénoxy (apparition des composés à 420 nm, groupe « jaune », Fig.II.26., perte de 2 unités de masse par rapport à l'ion pseudo-moléculaire de la phloridzine), soit la quinone de 3-hydroxyphloridzine retrouvée en couplage avec la phlorétine ( $m/z = 721$ ). Dans le cas d'Evereste, les phénomènes de couplage oxydatif sont aussi très présents, et pratiquement toutes les combinaisons possibles entre les DHC constitutives semblent possibles.

### II.2.5.c) Phlorétine et activité antimicrobienne

L'analyse présentée ci-dessus montre que la production du conjugué 3-hydroxyphlorétine-phlorétine est assurée dans les deux génotypes. Cependant, elle est environ 6 fois plus importante chez MM106 (calcul basé sur les aires du pic correspondant). La tendance est donc inversée par rapport au modèle *in vitro*, dans le sens où ce composé n'était pratiquement retrouvé que durant l'oxydation de la phloridzine avec les extraits d'Evereste. Cette observation suggère que (i) l'oxydation prend une place importante chez MM106 et qu'elle se couple à la déglucosylation et (ii) l'oxydation est certainement plus importante chez Evereste et celle-ci domine la déglucosylation. Il a été montré précédemment que les produits d'oxydation de la catéchine, dont des dimères résultant de couplages oxydatifs entre la quinone de catéchine et la catéchine, inhibent l'activité d'une  $\beta$ -glucosidase fongique (Guyot et al., 1996b). Il est donc probable que l'oxydation au cours de l'incubation produise des composés inhibant les  $\beta$ -glucosidases présentes dans les feuilles, favorisant d'autant plus l'oxydation des formes glucosylées restantes. Ceci expliquerait l'oxydation tardive de la phloridzine chez MM106 en composés absorbant à 400 nm. Même si dans ces broyats les réactions d'oxydation des DHC prennent une place très importante, il semble que l'activité de déglucosylation gouverne tout de même la nature des composés produits finaux.

L'activité antimicrobienne est bien sûr fortement corrélée à l'apparition de la phlorétine dans les broyats des deux génotypes (Fig.II.25., B et D). Pour confirmer ce résultat, la phlorétine a été « éliminée » avant de mettre en contact la bactérie et le broyat. Ceci est rendu possible par la très faible solubilité de la phlorétine dans le tampon de broyage, qui peut donc être artificiellement éliminée par centrifugation. Des prélèvements ont été faits 30 et 120 min après le début de l'incubation à température ambiante et en milieu tamponné. Le surnageant de ces prélèvements a été déposé sur un milieu de culture solide pré-ensemencé avec *Ea* ( $10^8$  cfu/mL). Après 24h d'incubation des boîtes, les bactéries ne poussent pas si le prélèvement contient des substances inhibitrices. Le résultat typique de cette expérience est montré Fig.II.27.A. Les extraits solubles des deux génotypes exhibent des profils totalement opposés : alors que l'extrait initial de MM106 est très antibactérien et qu'il perd cette activité au cours de l'incubation, l'extrait initial d'Evereste n'est pas antibactérien mais au contraire le devient en cours de réaction. Ce profil est tout à fait étonnant mais il est en accord avec le modèle d'oxydation de la phloridzine *in vitro*

(Fig.II.20.A), i.e. une « détoxification » chez MM106 et pas chez Evereste. Les surnageants et culots des différents prélèvements ont été analysés par HPLC-UV (Fig.II.27.B).

- *MM106*

Le surnageant du premier prélèvement contient beaucoup de phloridzine et peu de phlorétine. Les autres ne contiennent plus du tout de phloridzine et très peu de phlorétine. A l'inverse, de grandes quantités de phlorétine sont retrouvées dans le culot, ce qui montre que son élimination par centrifugation a été efficace. Le fait de trouver de la phlorétine dans le premier prélèvement pourrait être associé à la présence de l'activité  $\beta$ -glucosidase dans la fraction soluble avant l'addition du méthanol acide pour l'extraction. La phlorétine libérée par cette activité suffirait à expliquer le pouvoir antibactérien initial chez MM106. La phloridzine présente en très grande quantité pourrait également participer à ce pouvoir antibactérien, car comme démontré au début de ce chapitre, elle est antibactérienne à pH faiblement acide et à des concentrations supérieures à 5 mM (ce qui correspond approximativement à la concentration en phloridzine dans les feuilles). La disparition du pouvoir antibactérien dans les fractions solubles récupérées, aux temps 30 et 120 min après broyage, corrèle parfaitement avec l'absence de phlorétine dans ces fractions. Lorsque le culot et le surnageant sont laissés à s'oxyder séparément dans une suspension bactérienne tamponnée, le pouvoir antibactérien apparaît rapidement, empêchant la croissance de la population bactérienne (Fig.II.27.C). Cette action est similaire pour les feuilles saines ou infectées, et elle est probablement due à une libération rapide de phlorétine qui tue très précocement la bactérie.

- *Evereste*

La fraction soluble initiale comprend les trois DHC constitutives, sieboldine, phloridzine et trilobatine. Un peu de phlorétine est également présente, probablement libérée comme décrit ci-dessus pour MM106. Les quantités de phloridzine et phlorétine sont plus faibles dans l'extrait d'Evereste que dans celui de MM106. Après 30 et 120 min de réaction, les extraits solubles d'Evereste deviennent antibactériens. Ils comportent toujours les DHC constitutives, bien qu'en concentrations plus faibles que dans l'extrait initial et leur concentration chute au cours de la réaction. Les DHC constitutives sont également en forte quantité dans la fraction non soluble. Deux formes oxydées ont été détectées, la sieboldine oxydée ( $m/z = 449$ ) et la 3-hydroxyphlorétine ( $m/z = 289$ ), déjà détectées précédemment.

Cependant, il ne semble pas y avoir de formation de nouveau produit en quantité importante qui pourrait expliquer l'apparition du pouvoir antibactérien chez Everest. L'utilisation d'acide ascorbique ne modifie pas ces profils (données non montrées), ce qui implique qu'une oxydation chimique n'intervient pas dans l'induction du pouvoir antibactérien. Ainsi, l'hypothèse est faite qu'une déglucosylation progressive de la phloridzine et de la sieboldine, prend place, *in situ* (sur la nappe bactérienne), après dépôt. L'utilisation de gluconolactone permettra de vérifier cette hypothèse. Il se pourrait également que la 3-hydroxyphlorétine ait une activité antibactérienne puissante. En effet, l'étude de la relation structure/fonction dans le pouvoir antibactérien des DHC montre que (i) la forme glycosylée de la phloridzine est moins efficace que l'aglycone et (ii) la présence du noyau catéchol augmente l'activité antibactérienne. La 3-hydroxyphlorétine étant aglycone et possédant un groupement catéchol, elle serait probablement plus antimicrobienne encore que la phlorétine, ce qui reste à être démontré. Après 120 minutes de contact dans le culot, la bactérie reste capable de se multiplier, bien que sa croissance soit quelque peu affectée (Fig.II.27.C carrés et pointillés). A l'inverse, après 120 minutes de contact dans le surnageant, la bactérie est incapable de se multiplier, ce qui suggère que le pouvoir antimicrobien est contenu dans la fraction soluble du broyat. Un résultat similaire est obtenu à partir de broyats de feuilles infectées, bien que l'activité antibactérienne dans le culot et le surnageant correspondant soit moins forte.

### ***III. Discussion sur les DHC constitutives et leurs produits de transformation***

Les données présentées dans ce chapitre ont permis d'aborder la question des DHC dans les feuilles de Pommier, ainsi que de leur transformation au cours de l'interaction. De manière constitutive, la phloridzine est détectée dans les génotypes sensible et résistant, mais dans ce dernier, deux autres composés sont également présents, la sieboldine et la trilobatine. La sieboldine, isomère 3-hydroxylé de la phloridzine, s'est avérée avoir une activité antioxydante remarquable ainsi qu'une activité bactériostatique contre *Ea*, faisant d'elle un candidat idéal pour expliquer la résistance d'Evereste. Cependant, cette hypothèse a été infirmée par le phénotypage de plusieurs descendants, issus du croisement entre Everest et MM106, sensibles et résistants. En effet, ces données montrent la présence de la sieboldine dans des génotypes sensibles et certains génotypes résistants ne la possèdent

pas. Toutefois, deux éléments sont en faveur d'un rôle de la sieboldine dans la résistance quantitative du Pommier à *Ea* : (i) sur les 9 descendants résistants testés, seuls 2 ne l'ont pas de manière constitutive et (ii) Evereste est plus résistant à certaines souches d'*Ea* que le génotype résistant Robusta, qui ne possède pas la sieboldine. Le criblage exhaustif de la descendance (200 individus) issu du croisement Evereste x MM106 permettra de renforcer ou non la première observation. De plus leur inoculation par différentes souches devrait permettre de déterminer si la sieboldine participe à la résistance quantitative du Pommier à *Ea*. *In planta*, l'action de la sieboldine pourrait être triple : (i) activité antibactérienne, (ii) activité antioxydante et (iii) chélation du fer (propriété conférée par la structure catéchol ; Rice-Evans et al., 1997), en compétition avec le sidérophore de la bactérie. L'analyse des 18 descendants décrite dans la partie I révèle que la phloridzine est présente chez tous les génotypes étudiés. De plus, d'autres travaux devront être entrepris pour déterminer si la sieboldine constitue une source de résistance vis-à-vis d'autres bio-agresseurs du Pommier (tavelure, puceron, oïdium).

Une des hypothèses avancées à l'issue de ces résultats est que la transformation de la phloridzine pourrait être une source, dans les génotypes résistants, de composés antibactériens et/ou antioxydants. Pontais et al. (2008) ont effectivement montré que les DHC sont transformées de manière importante au cours de l'interaction. Il a été suggéré que la disparition des DHC observée dans les deux génotypes au cours de l'interaction *Ea* est en partie liée à des processus d'oxydation. Le premier candidat enzymatique évident pour la catalyse de ces transformations est la présence d'une activité polyphénol oxydase. Les résultats de la partie II de ce chapitre montrent que les deux génotypes possèdent la capacité d'hydroxyler puis d'oxyder la phloridzine. En effet, des PPO tyrosinases existent dans les deux génotypes et leur activité est largement induite au cours de l'interaction (Fig.II.17.B et Fig.II.19.A). Quelques différences ont cependant été observées concernant l'intensité de l'activité catécholase. En effet, celle-ci est plus forte chez Evereste à pH 4,5 (Fig.II.17.B) et de plus, certaines isoformes semblent différenciellement présentes dans les deux génotypes (Fig.II.19.B et C). Globalement, l'affinité des extraits enzymatiques d'Evereste et de MM106 pour la phloridzine est tout à fait comparable. L'activité catécholase (*o*-diphénolase) supérieure chez Evereste pourrait permettre l'oxydation d'autres *o*-diphénols existant dans les feuilles, dont les catéchines mais également la sieboldine. Toutefois, les données de la figure II.24. montrent que l'oxydation des flavanols ((+)-

catéchine, (-)-épicatéchine) n'aboutit pas à la formation de composés antibactériens. L'oxydation de la sieboldine n'a pas encore été étudiée, faute de disponibilité du substrat.

En plus de l'activité PPO, les activités  $\beta$ -glucosidase et peroxydases sont également présentes dans les feuilles, au cours de l'interaction avec *Ea*. De manière évidente, les  $\beta$ -glucosidases sont impliquées dans la déglucosylation rapide de la phloridzine en phlorétine. Concernant l'activité peroxydase, elle pourrait être impliquée dans l'oxydation de la phloridzine en radicaux phénoxyles, très réactifs. Ainsi, la transformation de la phloridzine pourrait être assurée par ces trois activités enzymatiques, et en fonction de leur ordre d'arrivée, la nature des produits finaux pourrait différer.

La question principale issue de la partie I de ce chapitre était : la phloridzine, qui est présente chez tous les descendants et leurs parents, peut-elle être transformée spécifiquement et différenciellement en produits participant à la résistance ? L'étude des PPO réalisée dans le présent chapitre suggère qu'*a priori*, la résistance n'est pas directement liée à cette activité. Pour comprendre tous les mécanismes sous-jacents à la transformation de la phloridzine, un modèle *in vitro* très simple a été utilisé, en couplage avec l'étude de l'activité antibactérienne et l'analyse des profils de flavonoïdes alcool méthylique-solubles. Le résultat principal qui émerge de cette étude est l'importance de la déglucosylation de la phloridzine en phlorétine. Cette déglucosylation est doublement importante car (i) elle semble responsable de l'apparition d'un pouvoir antibactérien très fort (Fig.II.20.A et Fig.II.21.A) et (ii) les produits de transformation finaux diffèrent si l'activité  $\beta$ -glucosidase est inhibée (Fig.II.21.C). De plus, le dosage de l'activité  $\beta$ -glucosidase dans des feuilles infectées montre que l'activité est bien présente, mais *a priori* non altérée par l'infection (Fig.II.17.B). Ces résultats confirment ceux de Raa et Overeem (1968) qui ont proposé que la transformation de la phloridzine par des enzymes du Pommier implique à la fois une activité  $\beta$ -glucosidase et une activité PPO. De plus ces deux activités sont pH-dépendantes, et par conséquent le pH influe sur la prépondérance de l'une ou l'autre de ces réactions. Dans les données montrées ici, le pH a été volontairement maintenu à 5,5 pour mimer les conditions de l'apoplaste des feuilles infectées (Pontais et al., 2008). Dans ces conditions, il est apparu que le pouvoir antibactérien conféré par les extraits enzymatiques de MM106 a tendance à être plus transitoire que celui d'Evereste, au moins *in vitro* (Fig.II.20.). Cette disparition reflète l'importance relative de chacune des transformations dans la composition en dérivés de la phloridzine à un temps donné. Par exemple, les données sont en faveur de réactions simultanées de déglucosylation et d'oxydation chez Evereste (Fig.II.28.A), conduisant à la

formation de dimères glucosylés ou non. Ces derniers pourraient être actifs contre *Ea* ou bien exercer une activité antioxydante, qui serait responsable de l'arrêt de la propagation de la mort cellulaire au cours de l'interaction (Chapitre I). Chez MM106 en revanche, la réaction préférentielle est la déglucosylation, très rapide, de la phloridzine en phlorétine (Fig.II.28.B), cette dernière pouvant être ensuite oxydée par une activité PPO. Cependant, cette dernière est plutôt lente et implique l'accumulation transitoire de la phlorétine. Le rôle de l'activité antioxydante des produits de transformation est appuyé par des données préliminaires, obtenues à partir du dosage de l'activité de piégeage du DPPH dans des extraits méthanoliques de feuilles d'Evereste et de MM106 infectées (Fig.II.29.). Ces résultats indiquent que l'activité antiradicalaire (qui corrèle le mieux avec la tolérance au paraquat) augmente très fortement chez Evereste, ainsi que chez MM106, bien que chez ce dernier l'activité antioxydante reste très largement inférieure à celle d'Evereste (près de 1000 fois moins dans les feuilles prélevées 48 h après infiltration d'*Ea*). Cette donnée est particulièrement importante car elle suggère que c'est le déploiement spatio-temporel, plus que l'activité constitutive, qui participerait à la résistance au feu bactérien. Pour vérifier cette hypothèse, les différents descendants déjà phénotypés pour leur profil phénolique constitutif, seront infectés par la bactérie et l'activité antioxydante de leurs extraits de feuilles sera déterminée.

Les processus de transformation font tout de même intervenir l'oxydation de la phloridzine, certainement par des activités tyrosinases, qui catalysent son hydroxylation et la formation subséquente d'*o*-quinones. Ces quinones sont capables de se coupler à d'autres molécules non oxydées présentes dans le milieu (Fig.II.22.). D'ailleurs, les  $\beta$ -glucosidases de plantes sont impliquées dans la résistance aux pathogènes (Morant et al., 2008a). Lors d'une attaque, la rupture des compartiments cellulaires peut amener les  $\beta$ -glucosidases présentes dans la paroi cellulaire et certains substrats glycosylés, précurseurs de composés antimicrobiens, à se rencontrer. La libération du groupement glucose est d'ailleurs associée à l'activation du pouvoir antimicrobien. Ceci a été rapporté chez la moutarde (cas des glucosinolates clivés en présence de myrosinase, une  $\beta$ -glucosidase, libérant des isothiocyanates hautement toxiques) ou bien chez l'avoine (la phytoalexine avenacoside est également activée par déglucosylation) (Morant et al., 2008a). Il est probable que l'ensemble phloridzine/phlorétine/ $\beta$ -glucosidase suive un schéma similaire chez le Pommier. Il est étonnant cependant qu'il puisse être actif contre *Ea* chez MM106, étant donnée la sensibilité extrême de ce génotype. Il serait intéressant de vérifier l'implication de ce

système potentiel dans la résistance à d'autres pathogènes (certaines races de *Venturia inaequalis*, puceron cendré,...). Toutefois, une forte activité de déglucosylation de la phloridzine pourrait avoir une autre signification. En fait, la concentration en phloridzine dans les feuilles de MM106 est supérieure à 5 mM. Si une grande quantité de phlorétine est libérée très rapidement, cela signifie qu'autant de glucose est libéré et utilisable comme substrat par la bactérie (hypothèse Fig.II.28.B). La figure II.20.A illustre bien ce propos car le halo plus blanc observé autour des zones d'inhibitions pourrait correspondre à une augmentation de la population bactérienne provoquée par la diffusion du glucose dans le milieu. Finalement, une activité  $\beta$ -glucosidase trop intense constituerait dans ces conditions un facteur de sensibilité, avec l'hypothèse sous-jacente que la phlorétine, également présente en forte quantité par le biais de cette activité, soit rapidement distribuée dans la phase non-aqueuse et par conséquent non biodisponible (hypothèse Fig.II.28.B). Cette hypothèse est cependant fragilisée par le dosage de l'activité  $\beta$ -glucosidase par l'ONP-glucopyranoside dans les extraits enzymatiques de 4 descendants (Fig.II.30.A), qui ne montre aucune corrélation entre le niveau constitutif de cette activité et la résistance. L'activité  $\beta$ -glucosidase sera tout de même dosée au cours de l'interaction, et en utilisant la phloridzine comme substrat et l'analyse par CCM pour quantifier la phlorétine libérée, ce qui rendra mieux compte de l'activité réelle. Une autre hypothèse concernant l'activité  $\beta$ -glucosidase dans le cas de la sensibilité de MM106 pourrait reposer sur la toxicité de la phlorétine pour la plante. En effet, les composés toxiques sont plus souvent conservés dans la vacuole sous forme glycosylée car ils sont potentiellement toxiques pour l'organisme qui les produit (Morant et al., 2008a). Il est tout à fait envisageable qu'une activité  $\beta$ -glucosidase trop importante, ou inappropriée, libère une trop forte quantité de phlorétine ayant pour conséquence la mort des cellules hôtes et favorisant ainsi l'installation de la bactérie. Par exemple, Liu et al. (2003) ont montré que la phlorétine est capable d'inhiber plusieurs transporteurs de sucre et d'azote chez *Arabidopsis*. Sa présence en trop forte quantité dans les cellules du Pommier pourrait avoir des conséquences délétères sur leur métabolisme. Encore une fois, le dosage de l'activité  $\beta$ -glucosidase dans quelque descendants est plutôt en désaccord avec cette hypothèse (Fig.II.30.A) et, l'activité réelle envers la phloridzine devra être déterminée, constitutivement et au cours de l'infection.

Pour se rapprocher des processus existants *in planta*, il a été entrepris de réaliser une étude des produits de transformation au sein de broyats de feuilles d'Evereste et de MM106. Dans le milieu complexe ainsi créé, proche des conditions cellulaires présentes dans

la plante en cours d'infection, des antagonismes ou au contraire des synergies sont susceptibles d'influencer les réactions de transformation. Ce milieu est en effet supposé recréer en partie les phénomènes de lyse et les confrontations enzymes-substrats liées à la décompartmentation provoquée par la peroxydation des lipides au cours de l'interaction. *Ex planta*, les transformations de la phloridzine peuvent aboutir à une large diversité de molécules, dont certaines sont colorées (Fig.II.16.C). Ces processus de transformation font indéniablement intervenir les PPO, à en juger par les phénomènes de couplage oxydatif nécessitant la production de la quinone de 3-hydroxyphloridzine ou de 3-hydroxyphlorétine, mais ils impliquent aussi d'autres enzymes. Les peroxydases pourraient également oxyder la phloridzine à condition que le peroxyde d'hydrogène soit présent, ce qui pourrait être le cas dans les broyats étant donné le stress appliqué (le broyage des tissus est certainement perçu par les cellules comme une blessure, d'où production de FAO, probablement renforcée par la photosynthèse). De plus, au cours de l'interaction avec *Ea*, l'activité peroxydase est fortement induite dans les deux génotypes (Fig.II.17.B ; Venisse et al., 2002). Cependant la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de l'interaction n'a pas été démontrée, même si l'anion superoxyde généré peut se dismuter spontanément, ou être transformé par la superoxyde dismutase (qui est effectivement induite au cours de l'interaction ; Venisse et al., 2002), en peroxyde d'hydrogène. L'étude du pouvoir antibactérien révèle que les broyats des deux génotypes, surtout celui de MM106, sont très toxiques pour la bactérie (Fig.II.25.A). Encore une fois, cette activité dépend de la capacité de libération de la phlorétine. Dans le cas d'Evereste, le pouvoir antibactérien est aussi bien présent dans la fraction soluble qu'insoluble de ces broyats ce qui suggère l'existence soit d'un seul composé réparti dans les deux phases (à l'image des DHC constitutives, Fig.II.25.C), soit d'un cocktail de produits, ayant des solubilités différentes, efficace contre *Ea*. D'ailleurs, les profils LC-DAD-MS illustrent parfaitement la diversité ainsi que le nombre important de produits de transformation détectés chez Evereste en fin d'incubation des broyats. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ces différents produits de transformation, et notamment ce qui concerne leur activité antibactérienne. Une des prochaines étapes de cette étude sera de comparer les profils de transformation entre Evereste et les descendants sensibles qui possèdent la sieboldine, dans le but de déterminer s'il y a bien des mécanismes différents dans la transformation de la phloridzine et de la sieboldine qui peuvent être à l'origine de la résistance. La photo présentée dans la figure II.30.B montre la capacité de plusieurs génotypes à transformer la phloridzine en composés différents. Il n'y a pas de

corrélation entre un pigment donné et la résistance : par exemple, l'incubation de la phloridzine avec les extraits enzymatiques d'Evereste produit un pigment marron, mais ceux de génotypes sensibles également. Ainsi, les produits de transformation de la phloridzine potentiellement impliqués dans la résistance ne sont pas ces pigments et le recours à la LC-MS est nécessaire pour les identifier.

Les modèles utilisés ici sont artificiels dans la mesure où ils impliquent forcément la rencontre entre tous les substrats solubles et toutes les enzymes solubles, et peut être même la confrontation d'enzymes et de substrats issus de tissus différents (par exemple substrats dans l'épiderme, enzymes dans les cellules du parenchyme lacuneux...). Les résultats de Pontais et al. (2008) irait dans ce sens puisqu'ils montrent que la phlorétine n'est pas du tout libérée au cours de l'interaction avec la souche sauvage d'*Ea*, ce qui implique plus qu'une simple répression d'activité. De plus, les données de microscopie introduites dans le chapitre I suggèrent que la bactérie ne se propage que dans certains tissus préférentiels, i.e. le parenchyme lacuneux, le mésophylle associé aux nervures et les parenchymes corticaux des pétioles et des tiges. Une étude est donc en cours pour tenter de visualiser dans des coupes de feuilles (i) la localisation des DHC (colorations sur coupe, projet de collaboration pour de l'imagerie par spectrométrie de masse) et (ii) la localisation des enzymes. L'objectif est de pouvoir établir des corrélations entre choc oxydant (les FAO pourraient également intervenir sur la transformation des DHC, bien qu'*a priori* cela ne semble pas le cas puisque l'acide ascorbique n'a pas d'effet sur les réactions observées), présence de la bactérie, localisation des DHC et des enzymes de transformation. De manière surprenante, les résultats préliminaires indiquent que l'activité  $\beta$ -glucosidase et les substrats colocalisent, sur des coupes de nervures et de pétioles, avec le parenchyme accompagnant les vaisseaux du xylème. Cette donnée, qui doit être vérifiée, suggère qu'enzyme et substrat peuvent rentrer en contact à la suite de la lyse cellulaire. Ainsi, d'autres travaux complémentaires seront à réaliser pour déterminer quel est le mécanisme précis qui est mis en jeu dans les tissus infectés.

## **IV. Matériel et Méthodes**

### **IV.1. Produits chimiques**

Tous les produits chimiques et solvants ont été commandés chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), excepté l'apocynine (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), l'acétonitrile et l'acide acétique grade HPLC (Carlo Erba, Val de Reuil, France), la phloridzine et la phlorétine (Extrasynthèse, Genay, France). L'eau ultra-pure est produite par un système Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

### **IV.2. Matériel biologique**

L'utilisation des plantes et des bactéries est identique à celle décrite dans le matériel et méthodes du Chapitre I. Pour l'analyse des niveaux constitutifs, les feuilles jeunes (étage foliaire F2, correspondant à la seconde feuille complètement développée, d'apparence vert-clair) et âgées (étage foliaire F10, d'apparence vert-foncé) ont été prélevées en serre sur une même pousse.

L'extraction des polyphénols de feuilles s'est faite de la manière suivante. Cent cinquante mg de feuilles placées dans un microtube de 1,5 mL ont été congelés dans l'azote liquide. Les feuilles ont alors été broyées en présence de billes de tungstène (3 mm, Qiagen, Courtaboeuf, France) grâce à un broyeur à billes (30 Hz pendant 30 s, MM301, Retsch, Haan, Germany). La poudre a ensuite été extraite par 1 mL de méthanol acide (1 % d'acide acétique) pendant 15 min sous agitation dans le broyeur à billes (10 Hz) à température ambiante. Les homogénats ont été centrifugés 5 min à 13000 g et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL (ces homogénats sont appelés extraits méthanoliques). La préparation des extraits pour le test ORAC a été faite de la même manière, excepté que le solvant a été remplacé par un mélange eau/acétone (50/50).

### **IV.3. HPLC analytique et techniques spectroscopiques**

#### **IV.3.1. HPLC**

La séparation des polyphénols dans les extraits méthanoliques a été réalisée comme décrit par Bernillon et al. (2004), et a été mise en œuvre en collaboration avec S. Guyot (URC-BLF, INRA Le Rheu). Les mêmes extraits méthanoliques que ceux utilisés pour le test du

DPPH ont été filtrés au travers d'une membrane PTFE (0,45  $\mu\text{m}$ , Chromafil, Macherey-Nagel, Hoerd, France) avant d'être injectés dans la colonne (Zorbax Eclipse XDB-C18, 2,1 mm x 150 mm, 3,5 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Le système comprend un dégazeur (SCM1000, ThermoQuest), un système de gestion des échantillons à 4°C (Surveyor Autosampler, ThermoFinnigan), une pompe (1100 Series Binary Pump, Agilent Technologies) et un détecteur UV-visible (1100 Series Variable Wavelength Detector, Agilent Technologies). La séparation est réalisée à 30°C avec les solvants A (acide formique grade HPLC 0,1% dans de l'eau) et B (acide formique 0,1% dans de l'acétonitrile grade HPLC) selon le gradient suivant à un débit de 0,2mL/min : 3% de B de 0 à 5 min, 9% de B de 5 à 15 min, 16% de B de 15 à 45 min, 50% de B de 45 à 48 min, 90% de B de 48 à 55 min, puis retour à 3% de B de 55 à 75 min pour le reconditionnement de la colonne. La quantification des composés est basée sur l'aire des pics obtenus à 280 nm, en utilisant un coefficient de réponse ( $\mu\text{mol}/(\text{DO}\cdot\text{s})$ ) déterminé à partir des composés purs, commerciaux ou purifiés comme décrit ci-après.

#### IV.3.2. Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse couplé à la sortie du système HPLC décrit ci-dessus comprend une source d'ionisation par électrospray et une trappe à ion pour la détection (LCQ Deca, ThermoFinnigan). Les molécules injectées sont ionisées négativement (perte d'un proton) par un courant de 3,70 kV. Le système est géré par le programme Xcalibur v1.2 (ThermoFinnigan). Les spectres sont étudiés avec le même logiciel. Ceux-ci sont acquis pour les ions dont le rapport  $m/z$  est compris entre 50 et 2000.

#### IV.3.3. Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du carbone

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Avance DRX 500 MHz (Bruker, Wissemburg, France), au Service Commun d'Analyses Spectroscopiques de l'Université d'Angers. Les structures des composés purifiés préparés dans du deutérométhanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ont été déterminées par RMN à 1D et 2D du  $^1\text{H}$  à 500 MHz et du  $^{13}\text{C}$  à 125 MHz, à l'aide des analyses de corrélations HMBC et HMQC.

#### **IV.4. Purification des DHC des feuilles de Pommier**

Quatorze g de feuilles lyophilisées ont été broyées et extraits deux fois avec 1 L de méthanol acide (0,1 % d'acide acétique) pendant 24 h sous agitation et à 4°C. Entre chaque étape, les extraits ont été filtrés sur un fritté de verre (porosité 4). Le solvant du filtrat a été évaporé et la masse résultante a été mélangée à 20 g de silice. Les produits phénoliques ont été élués de la silice avec un mélange dichlorométhane (solvant A)/méthanol (solvent B) (5:1). La présence des principales DHC a été vérifiée par HPLC selon les paramètres présentés ci-dessus. Chaque composé a alors été séparé par chromatographie Flash en phase normale (SuperFlash SF 25-40 g, CV 52 mL cartridge, Analogix, Burlington, USA), selon le gradient suivant avec un débit constant de 40 mL/min : de 5 à 10 % de B de 0 à 3 min, 10 % de B de 3 à 6 min en isocratique, 15 % de B de 6 à 11 min, puis 15 % de B de 11 à 20 min en isocratique, et enfin 20 % de B de 20 à 25 min, la détection se faisant à 280 nm par spectrophotométrie. Chaque fraction a été vérifiée par HPLC analytique, et celles possédant une même DHC ont été rassemblées. Ce protocole a été établi en collaboration avec D. Guilet (SONAS, Université d'Angers).

#### **IV.5. Tests antioxydants**

##### **IV.5.1. Activité antiradicalaire, piégeage du DPPH**

L'activité de réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), un radical libre stable coloré, a été mesurée spectrophotométriquement (décoloration liée à la réduction) comme décrit par Brand-Williams et al. (1995) et Sharma et Bhat (2009) avec quelques modifications. Les solutions de composés purs ou purifiés ont été préparées dans du méthanol à une concentration 10X, allant de 6,25 µM à 3 mM. Trente µL d'extrait méthanolique de feuille ou de solution 10X de chaque composé ont été ajoutés à 240 µL de méthanol dans les puits d'une microplaque (Nunc-Immuno Modules, Nunc, Roskilde, Denmark). La réaction débute avec l'addition de 30 µL d'une solution méthanolique de DPPH (3,2 mM) and la DO est mesurée à 515 nm toutes les min pendant 120 min par un spectrophotomètre à microplaque (µQuant, Bio-Tek, Colmar, France). Une courbe de dilution de Trolox (acide (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchromane-2-carboxylique) est incluse en tant que contrôle interne dans chaque run. L'activité antioxydante est obtenue après calcul de la concentration en composé ou en extrait brut permettant de réduire 50 %

du DPPH initial à la fin de la réaction ( $EC_{50}$ ). Cette activité est ensuite convertie en équivalents Trolox, qui correspondent au ratio entre l' $EC_{50}$  du Trolox et l' $EC_{50}$  du composé ou de l'extrait testé. Les cinétiques de réduction du radical ont été analysées pour classer les composés en tant que « lents » ou « rapides » (Sanchez-Moreno et al., 1998). Les mesures d'activités des composés purs et des extraits bruts constitutifs ont été répétées trois fois avec des duplicats internes (n=3).

#### IV.5.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La capacité de bloquer l'oxydation en chaîne de la fluorescéine, initiée par le radical AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride), a été testée comme décrit par Ou et al. (2001) avec quelques modifications mineures. Chaque composé a été préparé et dilué dans un tampon phosphate (10 mM, pH 7,4). La réaction s'est faite dans une plaque 96 puits opaque (Costa, Cambridge, MA, USA) selon le protocole suivant : 150  $\mu$ L de fluorescéine (10 nM) ont été déposés dans chaque puits et 25  $\mu$ L de Trolox ou de composé pur ou d'extrait brut préparé dans un mélange acétone/eau ont été ajoutés en triplicat. Des gammes 2X de Trolox (62,5  $\mu$ M à 1000  $\mu$ M), de composés purs (12,5  $\mu$ M à 100  $\mu$ M) et des dilutions d'extraits bruts (au 1/400<sup>e</sup> et au 1/800<sup>e</sup>) ont été utilisées. Le bruit de fond a été mesuré (fluorimètre automatique, FLUOstar, BMG Labtech, Offenburg, Germany) après une incubation de 30 min à 37°C, et la réaction a été initiée par l'injection automatique de 100  $\mu$ L d'AAPH à 240 mM. La fluorescence a été lue toutes les 90 s pendant 10 cycles. L'aire sous la courbe a été calculée selon la procédure décrite par Ou et al. (2001) (aire sous la courbe = 1 +  $f_1/f_0$  +  $f_2/f_0$  + ... +  $f_n/f_0$ , avec  $f_n$  la fluorescence au cycle n). Des équivalents Trolox ont pu être calculés à partir d'une courbe de régression déterminée par la gamme de Trolox ( $Y = 168,18X - 20,269$ ,  $R^2 = 0,9977$ , avec  $X = \text{aire sous la courbe}_{\text{échantillon}} - \text{aire sous la courbe}_{\text{blanc}}$ ).

#### IV.5.3. Tolérance au paraquat

La tolérance au paraquat, un puissant herbicide photooxydant, a été évaluée par mesure de fuites d'électrolytes par conductimétrie, comme décrit précédemment (Brisset et Paulin, 1991), avec quelques modifications. Dix disques foliaires (0,7 cm de diamètre, 40 à 50 mg de MF) prélevés sur des jeunes feuilles d'Evereste et de MM106 ont été infiltrés sous vide avec 1, 10 ou 100  $\mu$ M de paraquat (methyl viologen ; Donahue et al., 1997) préparé

dans un tampon MES 1 mM, après avoir été préalablement désinfectés en surface (1,25 % de chlore actif). Des contrôles infiltrés avec du tampon ont été faits. Les disques ont ensuite été essuyés rapidement et transférés dans du tampon MES 1 mM frais, puis incubés sous agitation continue à 25°C, sous éclairage artificiel fort ( $170 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , GW84011M Mercurio floodlight, Gewiss, Les Ulis, France). La conductivité du milieu d'incubation des disques est mesurée toutes les 2 h pendant 24 h. L'expérience a été répétée 4 fois, chaque mesure ayant été faite en triplicat dans chaque répétition.

#### IV.5.4. Activité anti-vasoconstriction

Des rats mâles adultes (Wistar, Iffa-Credo, L'Arbresle, France) ont été anesthésiés (pentobarbital de sodium, 50 mg/kg en intrapéritonéal) et des segments d'artères mésentériques de premier ordre (2 mm de longueur) ont été prélevés et montés sur myographe (DMT, Aarhus, Danemark) dans une solution physiologique saline, comme décrit précédemment (Loufrani et al., 2008). La tension de l'artère est mesurée par le logiciel AsqKnowledge (v3.7.2., BIOPAC Systems, Inc., Goleta, CA, USA). L'intégrité de l'endothélium est vérifiée en testant sa capacité à se relaxer en présence d'acétylcholine, comme décrit par Loufrani et al. (2008). Une courbe dose-réponse cumulative à la phényléphrine ( $10^{-9}$  à  $10^{-4}$  M) a été réalisée. Après lavage, les DHC préparées dans du DMSO et diluées dans de l'eau ultra-pure ont été additionnées au milieu d'incubation des artères à une concentration finale de  $10^{-5}$  M. Après 30' d'incubation pour permettre la stabilisation de la tension, une nouvelle courbe dose-réponse à la phényléphrine est effectuée. Les activités anti-vasoconstriction de la sieboldine et de la phloridzine ont été comparées à celles de composés de référence, le Tempol ( $10^{-5}$  M) et l'apocynine ( $10^{-5}$  M). Des courbes dose-réponse à la sieboldine et à la phloridzine ( $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  M) après pré-contraction de l'artère avec  $10^{-6}$  M de phényléphrine ont également été testées. Chaque expérience a été répétée trois fois, à chaque fois sur des tissus provenant d'animaux différents.

#### IV.5.5. Inhibition de la formation des AGEs (produits de glycation avancés)

Un test basé sur la fluorescence des produits de la réaction de Maillard, adapté de Vinson et Howard (1996), a été optimisé par S. Derbré (SONAS, Université d'Angers) pour cribler des composés capables d'inhiber la formation des AGEs. Le test repose sur

l'incubation d'albumine de sérum bovin (BSA, 10 mg/mL) avec du D-ribose (0,5 M) et du composé à tester ( $10^{-5}$  à  $10^{-2}$  M) dans un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,4). Ce milieu réactionnel est incubé dans des microplaques noires (96 puits) à 37°C pendant 24 h dans un endroit fermé, et chaque composé est testé en triplicat. La fluorescence des AGEs (ex. 370 nm, ém. 440 nm) est mesurée avec un spectrofluorimètre (Infinite M200, Tecan, Lyon, France). Pour éviter des phénomènes d'absorption de fluorescence (quenching), la fluorescence résultant de l'incubation des composés avec la BSA mais sans le sucre a été soustraite à chaque mesure. Le contrôle négatif (100 % d'inhibition de la formation des AGEs) correspond à la fluorescence des puits ne contenant que de la BSA, et le contrôle positif (pas d'inhibition) à celle des puits ne contenant que la BSA et le D-ribose. Le volume final de l'essai est de 100  $\mu$ L. La concentration en composé nécessaire à 50 % d'inhibition de formation ( $IC_{50}$ ) a été calculée à partir des données de fluorescence et comparée avec celle du composé de référence, l'aminoguanidine (Reddy et Beyaz, 2006).

## **IV.6. Evaluation des activités antibactériennes**

### **IV.6.1. Sur boîte**

Une suspension d'Ea à  $10^8$  cfu/mL environ est utilisée pour inoculer un milieu KB solide coulé dans une boîte de Pétri. L'excédent de suspension versée sur la boîte est aspiré avec une micropipette et le milieu est alors laissé à sécher sous une hotte à flux laminaire, pendant au moins 30 min. Vingt  $\mu$ L de la solution à analyser sont ensuite déposés sur la boîte. Un extrait est antibactérien à une concentration donnée si sa présence empêche le développement de la bactérie, visible sur la boîte par un halo plus sombre.

### **IV.6.2. En bioscreen**

Ce suivi consiste à incuber 450  $\mu$ L de la solution de phloridzine/sieboldine ou de l'extrait (broyat total/surnageant/culot) à analyser avec 50  $\mu$ L de suspension d'Ea à  $10^9$  cfu/mL, et à prélever, après 30 min ou 120 min, 30  $\mu$ L de ce milieu réactionnel pour inoculer 270  $\mu$ L de milieu liquide LB (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10g/L, pH 7,5) préalablement réparti dans une plaque de 100 puits (Labsystems Honeycomb 2, Oy Growth Curves Ag Ltd., Helsinki, Finlande). La densité optique du milieu liquide est mesurée toutes

les 2 h et à 600 nm pour chaque puits par un lecteur de plaque Bioscreen C (Oy, Growth Curves Ag Ltd., Helsinki, Finlande), pendant 24 h. Pour chaque expérience, un témoin blanc composé de 300 µL de milieu LB seul et un témoin positif (30 µL d'Ea à  $10^9$  cfu/mL dans 270 µL de milieu) sont réalisés, et tous les points de la plaque sont faits en duplicats.

## **IV.7. Dosages enzymatiques**

### **IV.7.1. Préparation**

Les extraits enzymatiques totaux de feuilles ont été préparés de la manière suivante : trois demi-feuilles sont broyées sur de la glace avec un mortier et un pilon dans un tampon d'extraction (PEG8000 1 mM, triton 0,01%, PVPP 8%, PMSF 1 mM, tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,5) à raison d'1 mL de tampon pour 150 mg de matière fraîche. Les homogénats sont centrifugés 20 min à 16 000 g à 4°C, le surnageant récupéré et re-centrifugé 10 min à 16 000 g à 4°C. Le surnageant contenant les enzymes totales solubles est conservé à -20°C avec 10% de glycérol.

Pour tous les dosages suivants, les DO ont été mesurées dans des microplaques (Nunc-Immuno Modules, Nunc, Roskilde, Danemark) par un spectrophotomètre à microplaque (µQuant, BioTek Instruments, Colmar, France). Les données ont été enregistrées par le logiciel KC4 (BioTek).

### **IV.7.2. Dosage des protéines totales**

Les protéines totales extraites ont été dosées au bleu de Coomassie (Coomassie Protein Assay Reagent, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Deux-cent quarante cinq µL de ce réactif ont été répartis dans des microplaques et 5 µL de l'échantillon à doser, dilué au  $1/8^e$ , y ont été ajoutés. La DO est alors lue à 595 nm, et la concentration en protéine dans l'échantillon est déterminée par rapport à une gamme de concentration d'albumine de sérum bovin ( $DO = 0,6964 \times [mg/mL] - 0,0033$ ,  $r^2 = 0,9966$ ). Chaque échantillon est dosé en triplicat.

#### IV.7.3. Activité polyphénol oxydase (catécholase et tyrosinase)

Les activités catécholases et crésolases ont été dosées à pH 4,5 (tampon Na-acétate 50 mM, 4% N,N'-diméthylformamide) et pH 7,5 (tampon K-phosphate 50 mM, 4% N,N'-diméthylformamide) après détermination du pH optimal (déterminé sur une gamme de pH allant de 4 à 8). Le dosage est conduit selon le protocole recommandé par Espin et al.(1997) avec quelques modifications mineures : 100  $\mu$ L de tampon (Na-acétate ou K-phosphate 50 mM selon le pH désiré, +4% de DMF), 20  $\mu$ L de MBTH (3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride) 10 mM préparé dans du tampon Na-acétate ou K-phosphate, 60  $\mu$ L (pour l'activité crésolase, ou 10  $\mu$ L pour l'activité catécholase) d'extrait enzymatique dilué au  $\frac{1}{4}$  et 20  $\mu$ L de substrat (phloridzine 10 mM ou 4-méthylcatéchol 100 mM). La réaction débute par l'addition du substrat et la DO à 500 nm est mesurée par le lecteur de microplaques toutes les 30 s pendant 10 min. L'activité est exprimée en variation de DO/min/mg de protéine.

#### IV.7.4. Activité peroxydase

L'activité peroxydase envers le guaiacol a été dosée en mélangeant 200  $\mu$ L de substrat (25 mM préparé dans du tampon acétate pH 5,5 50 mM, 10  $\mu$ L d'échantillon dilué au  $\frac{1}{10^e}$  et 20  $\mu$ L d' $H_2O_2$  (250 mM, préparé dans du tampon acétate 50 mM pH 5,5). La DO est lue à 470 nm toutes les 30 s au lecteur de microplaque pendant 5 min, juste après addition du peroxyde d'hydrogène. L'activité est exprimée en nmol de tétraguaiacol formé/min/mg de protéine, (avec  $\epsilon_{\text{tétraguaiacol}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### IV.7.5. $\beta$ -glucosidase

L'activité  $\beta$ -glucosidase a été mesurée par l'absorbance du *p*-nitrophénylphosphate libéré après hydrolyse de l'*o*-nitrophényl-gluco-pyranoside (ONPGLuc), comme décrit par Gopalan et al. (1992). Brièvement, 90  $\mu$ L d'ONPGLuc 10 mM ont été mélangés à 10  $\mu$ L d'extrait enzymatique. La réaction est arrêtée après 15 min d'incubation à température ambiante, par ajout de 200  $\mu$ L de borate de sodium 0,02 M pH 9,5. La DO est ensuite mesurée en point final à 400 nm. Le produit de réaction final est dilué au  $\frac{1}{10^e}$  dans du borate de sodium si nécessaire.

## IV.7.6. Electrophorèse des protéines totales

### ***IV.7.6.a) Gel en condition dénaturantes (SDS-PAGE)***

Les protéines présentes dans les extraits enzymatiques ont été séparées selon leur masse sur un gel de polyacrylamide à 10 % (acrylamide-bisacrylamide 40 % 6,4 mL, tampon Tris 3 M pH 8,8 3,1 mL, SDS 10 % 250 µL, persulfate d'ammonium 30 mg/mL, TEMED 16,7 µL, eau osmosée qsp 25 mL) après avoir été concentrées sur un gel de polyacrylamide à 3,75 % (acrylamide-bisacrylamide 1 mL, tampon Tris 0,5 M pH 6,8 2,5 mL, SDS 10 % 100 µL, persulfate d'ammonium 30 mg/mL 0,5 mL, TEMED 20 µL et eau osmosée qsp 10 mL). La migration s'est faite à 60 V dans le gel de concentration puis à 120 V dans le gel de migration, dans un tampon de migration Tris 25 mM/Glycine 100 mM/SDS 0,05% à pH 8. Le front de migration est visualisé à l'aide de bleu de bromophénol, ajouté dans le tampon de charge des échantillons (Tris 0,312 M/Glycérol 50 %/SDS 10 %/bleu de bromophénol 0,05%/β-mercaptoéthanol 25 %).

### ***IV.7.6.b) Isoélectrofocalisation (IEF)***

L'IEF permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI). Des gels précoulés couvrant une gamme de pH compris entre 3 et 10 ont été utilisés (Criterion Precast Gel, Bio-Rad) et manipulés selon les recommandations du fabricant. Les protéines constituant les échantillons sont séparées dans un tampon de cathode (lysine 20 mM, arginine 20 mM) et un tampon d'anode (acide phosphorique 7 %) selon un gradient d'intensité de courant croissante : 60 min à 100 V, 60 min à 250 V puis 30 min à 500 V, l'ampérage étant compris entre 5 et 25 mA par gel.

### ***IV.7.6.c) Révélation des activités PPO sur gel***

La mise en évidence des activités crésolase et catécholase sur gel est basée sur la méthode de dosage spectrophotométrique d'Espin et al. (1997). Après la migration (SDS-PAGE ou IEF), les gels sont mis à équilibrer dans un tampon acétate pH 4 0,2 M, pendant 10 min sous agitation. Le tampon est alors remplacé par une solution de MBTH (10 mM dans du tampon acétate pH 4 à 0,2 M) contenant soit de la phloridzine (pour l'activité crésolase) soit du 4-méthylcatéchol (pour l'activité catécholase) à 10 mM et 100 mM respectivement,

pendant 10 minutes. La présence des adduits de MBTH, d'une couleur rouge brique, indique la présence des activités polyphénol oxydase (Espin et al., 1997).

#### IV.8. Etude moléculaire des PPO

Le clonage d'extrémités 5' et 3' de transcrits codant des PPO a été réalisé comme décrit pour les LTP dans le chapitre I, en utilisant comme matrice des ADNc de feuilles constitutives et infectées d'Evereste et de MM106. Les amorces utilisées dans ce but sont présentées dans le Tableau II.3. Une PCR longue distance (LD-PCR) a été réalisée grâce à des amorces situées aux extrémités 5' et 3' des transcrits. Le mix de LD-PCR est préparé selon le protocole suivant : 35,5 µL d'eau ultra-pure, 5 µL de tampon 10X Advantage 2, 4 µL de dNTP (2,5 mM chaque) et 1 µL de Taq polymérase 50X Advantage 2 (BD Biosciences), 2,5 µL d'ADNc, et 1 µL de chaque amorce (10 µM). L'application web Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>; Corpet, 1988) a été utilisée pour aligner et comparer les séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques par BLAST (Altschul et al., 1997). Le phylogramme a été construit par l'application web MAFFT (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>, en utilisant l'algorithme N-INS-i, Katoh et al., 2005) par Neighbor Joining. Le dessin des amorces ainsi que la mise en œuvre de la qPCR pour le suivi des expressions des gènes de PPO au cours de l'interaction sont décrits dans le chapitre I.

#### IV.9. Analyse des produits de transformation des DHC

##### IV.9.1. Transformation *in vitro* de la phloridzine.

La phloridzine a été préparée à 5 mM dans un tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5,5, et chauffée 10 minutes à 70°C pour la dissoudre. Deux cents µL de cette solution ont alors été mélangés à 25 µL d'extrait enzymatique d'Evereste ou de MM106, de feuilles constitutives ou infectées par Ea, ajusté à 100 µg de protéine/mL, et à 25 µL de tampon acétate ou de gluconolactone, inhibiteur des β-glucosidases, à 10 mM (Day et al., 1998), ou de L-acide ascorbique, à 10 mM. La réaction s'est faite à température ambiante, sans agitation. Des prélèvements ont été réalisés, initialement, 30 min, 1 h et 2 h après le début de la réaction : une partie du prélèvement (20 µL) a été déposée sur nappe bactérienne pour

évaluer le pouvoir antibactérien des produits de transformation, et une autre partie (20 µL) conservée dans 80 µL de méthanol acide (0,1% acide acétique) à -20°C.

#### IV.9.2. Broyages de feuilles

Pour l'étude des produits de transformation des DHC dans les feuilles, ces dernières ont été pesées puis désinfectées en surface (1,25 % de chlore actif) puis séchées sur du papier absorbant. Elles ont ensuite été broyées dans du tampon acétate pH 5,5 50 mM à l'aide d'un mortier et d'un pilon jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Cette dernière est incubée dans le mortier à température ambiante et sous agitation magnétique modérée. A différents temps au cours de l'incubation, 500 µL de mélange sont prélevés à l'aide d'une micropipette munie d'un embout coupé et déposés dans un microtube de 1,5 mL. Après une légère centrifugation à 10 000 rpm pendant 2 min, 20 µL de surnageant sont déposés sur une nappe bactérienne pour évaluer le pouvoir antimicrobien, et 20 µL de surnageant sont mélangés à 80 µL de méthanol acide dans un nouveau tube de 1,5 mL. Ce dernier est ensuite stocké à -20°C pour être analysé en CCM ou en LC-MS. Le culot obtenu après centrifugation est resuspendu dans 1 mL de méthanol acide et également conservé à -20°C.

#### IV.9.3. Chromatographie sur couche mince CCM

La séparation des DHC s'est faite sur CCM à phase inverse RP-18 (TLC silica gel RP-18 F<sub>254s</sub>, Merck, Darmstadt, Germany). Dix µL de chaque échantillon sont déposés et élués par un mélange acétone/eau/acide acétique 100/50/0,1. La révélation par la vanilline/acide sulfurique a été réalisée comme décrit par Sharma et al. (1998). Brièvement, 250 mg de vanilline sont dissous dans 10 mL de méthanol puis mélangés à 40 mL d'acide sulfurique concentré (95% min.). Le réactif est vaporisé sur la plaque à l'aide d'un micropulvérisateur (Ecospray), puis la plaque est mise à chauffer pendant 10 min à 60°C. La présence des DHC est révélée par des spots rouges/roses.

#### **IV.10. Analyses statistiques**

Les comparaisons des intervalles de confiance de la médiane à partir de diagrammes en boîtes-à-moustaches ont été faites comme décrit dans le matériel et méthodes du chapitre I. Les classes statistiques ont été déterminées sur des données après vérification de l'homogénéité des variances (test de Bartlett,  $p > 0,05$ ), à l'aide du  $t$  de Student en comparant deux à deux les  $p$ -values de moyennes, ajustées selon Benjamin-Hochberg.

## **DISCUSSION GENERALE**

L'interaction Pommier-*Ea* a été abordé sous plusieurs angles : (i) une approche histologique, (ii) une approche transcriptionnelle et (iii) une approche biochimique. A l'issue de ces travaux, il est encore impossible de déterminer précisément quels sont les mécanismes fonctionnels associés à la résistance d'Evereste et à la sensibilité de MM106. Les résultats suggèrent qu'il s'agit certainement d'une combinaison de plusieurs facteurs, car la potentielle implication dans la résistance ou dans la sensibilité de plusieurs réponses du Pommier à *Ea* est maintenant suggérée.

L'analyse a été complexifiée par le modèle d'étude, les deux génotypes Evereste (résistant) et MM106 (sensible) étant génotypiquement éloignés. Ainsi, à la différence des études portant sur des lignées presque isogéniques, les conclusions quant à l'implication d'un mécanisme intéressant dans le devenir de l'interaction sont plus difficiles à établir, puisque l'hétérogénéité génotypique est une source de réponses différentielles à l'infection, qui n'ont pas forcément de lien avec la résistance ou la sensibilité à *Erwinia amylovora*. Par exemple, la LTP15 qui est fortement induite par la bactérie chez Evereste, et plus faiblement chez MM106, ne constitue peut-être qu'une réponse à un stress majeur (la bactérie provoque tout de même des dessèchements importants sur les feuilles d'Evereste lorsqu'elle est inoculée par infiltration) mais qui n'aurait aucune influence sur la résistance. Pour mettre à l'épreuve toutes les hypothèses qui ont été construites au cours de ce travail, l'utilisation plus exhaustive de plusieurs descendants issus du croisement entre Evereste et MM106 devra être mise en œuvre. Les descendants ont la propriété d'avoir un même fond génétique (beaucoup moins hétérogène qu'entre Evereste et MM106) et par conséquent, les réponses différentielles à l'infection ont plus de poids que lorsqu'elles sont étudiées chez leurs parents. Les différents gènes décrits dans l'analyse transcriptionnelle devraient ainsi être suivis au sein de plusieurs descendants. La validation d'une hypothèse nécessite en revanche le criblage d'un nombre important de descendants, afin d'associer le plus grand nombre d'individus à un caractère intéressant (potentiellement impliqué dans la résistance ou la sensibilité). Ainsi, la sieboldine, qui a été identifiée uniquement chez Evereste au niveau constitutif, s'avèrait être un excellent candidat pour expliquer la résistance de ce génotype, en raison de son activité antioxydante remarquable et de ses propriétés bactériostatiques sur *Ea*. Une très forte activité antioxydante constitutive pourrait bloquer de manière efficace la propagation de la bactérie par inhibition du choc oxydant et donc de la mort cellulaire, ces deux processus étant liés et indispensables à l'avancée du pathogène sur ses hôtes sensibles (Pommier, Poirier). L'analyse de plusieurs descendants issus du

croisement Evereste x MM106 a toutefois révélé la présence de la sieboldine, en grande quantité, dans les feuilles d'individus sensibles, et au contraire l'existence d'individus résistants ne la possédant pas, ce qui suggère que le caractère présence/absence de sieboldine n'est pas un facteur indispensable pour l'interaction. Le phénotypage de l'ensemble des descendants pour la présence de sieboldine devrait permettre de déterminer la proportion d'individus résistants possédant cette DHC, pour éventuellement établir une corrélation entre sa présence et une résistance quantitative. De même, il sera intéressant de vérifier la relation entre présence de sieboldine et résistance à d'autres bio-agresseurs ou tolérance au stress (les résultats montrent que la présence de sieboldine dans les feuilles corrèle avec un fort potentiel antioxydant, chez tous les descendants qui la possèdent ; données non montrées).

Le paragraphe ci-dessous regroupe les différentes hypothèses qui ressortent de l'analyse des différences constitutives et des réponses moléculaires et tissulaires d'Evereste et de MM106 à l'infection par *Ea*.

- *Facteurs de sensibilité de MM106*

- Il n'a pas été observé de renforcements pariétaux efficaces : la bactérie attaque sévèrement les parenchymes lacuneux et corticaux, et progresse dans ces tissus en provoquant leur nécrose. Le passage de la bactérie dans les vaisseaux du xylème a été observé et pourrait l'aider à se propager à l'ensemble des tissus/organes de son hôte sensible. Les mécanismes associés à cette migration, de proche en proche ou sur une longue distance, restent à être déterminés.
- *Ea* semble réprimer de manière efficace la voie de signalisation de l'acide jasmonique, probablement pour empêcher l'expression de défenses qui lui seraient néfastes. Ces défenses sont encore à identifier, ainsi que le mécanisme de répression (directement, ou indirectement par l'induction de la voie SA ?). Par contre, l'induction très forte et prolongée de la voie de l'acide salicylique pourrait sensibiliser les cellules proches du point d'infection, par la production de FAO et l'initiation de la mort cellulaire.
- La propagation de la bactérie *in planta* est associée à une reprogrammation métabolique, notamment en ce qui concerne les transporteurs de sucre et certaines phases de la photosynthèse. Il reste à décrire si ces modulations sont une conséquence de la sensibilité (les dommages cellulaires et tissulaires pourraient être

la cause de ces modifications) et/ou sont à l'origine de la sensibilité (manipulation directe assurée par les effecteurs de type III d'*Ea*). Il peut également être envisagé que les réponses cellulaires de l'hôte sensible à la nécrose soient des facteurs de sensibilité (une reprogrammation métabolique inadaptée en réponse à la nécrose pourrait être favorable au développement du pathogène).

- MM106 ne possède pas d'activité antioxydante constitutive importante. Bien qu'une telle activité ne semble *a priori* pas déterminante sur le devenir de l'interaction, sa présence pourrait conférer une résistance plus forte à certaines souches d'*Ea* (le génotype résistant Robusta qui ne possède que la phloridzine au niveau constitutif étant plus sensible qu'Evereste à certaines souches). Toutefois, le rôle de l'induction d'une activité antioxydante au cours de l'infection devra être étudié chez les descendants qui ne possèdent pas la sieboldine et au contraire chez les sensibles qui la produisent constitutivement. De plus, la localisation tissulaire de la sieboldine devra être analysée chez ces descendants, car la présence différentielle ou bien la capacité de mobilisation de cette DHC pourrait intervenir dans l'interaction, étant donné que la bactérie n'attaque que certains tissus.
- En ce qui concerne la phlorétine, bien que non détectée au cours de l'interaction par Pontais et al. (2008), les données obtenues ici suggèrent que la phlorétine pourrait être libérée en grande quantité. Le glucose ainsi libéré constituerait une source énergétique importante. Cependant la phlorétine dispose d'un très fort pouvoir antibactérien, ce qui est en contradiction avec sa présence dans le génotype sensible. L'hypothèse est faite qu'elle pourrait précipiter et devenir indisponible, étant donnée sa très forte insolubilité. De plus, la phlorétine, forme aglycone, pourrait être phytotoxique, ce qui devra être vérifié. Les localisations tissulaires de la phloridzine et de l'activité  $\beta$ -glucosidase sont en cours de détermination au sein de l'équipe GÉFIIn pour établir l'existence ou non de cette réaction dans les tissus colonisés par la bactérie et donc évaluer son implication dans l'interaction.

- Facteurs de résistance d'Evereste

- Le rôle de la lignification des parois des cellules est encore à vérifier mais le sclérenchyme sous-vasculaire, dans lequel les cellules s'imprègnent fortement, pourrait participer au blocage de la progression de la bactérie, en plus de la capacité d'Evereste à provoquer l'occlusion de ses vaisseaux du xylème. Ce processus est en

cours de caractérisation pour déterminer si le blocage de la progression d'*Ea* par des modifications histologiques chez Evereste est à l'origine de sa résistance.

- Peu de gènes susceptibles d'expliquer la résistance d'Evereste ont été identifiés, parmi ceux étudiés ici. Cependant, la non-répression de la voie de l'acide jasmonique ainsi que l'expression de *LTP15* sont des pistes intéressantes. Encore une fois, les défenses JA-dépendantes doivent être caractérisées de manière plus approfondie. La quasi-absence de modulations de gènes 48 h après infection suggère que le blocage de la progression est efficace dès 24 h. Ce blocage rapide pourrait donc être en partie dû à un mécanisme de défense constitutif ou mis en place très rapidement au cours de l'interaction. L'étude d'une cinétique plus précoce de l'expression de plus de gènes (entre 3 et 12 h après infiltration) sera mise en place pour évaluer effectivement si les défenses d'Evereste sont induites plus précocément que chez MM106.
- Le métabolisme primaire d'Evereste est différentiellement modulé par rapport à celui de MM106 (induction des transporteurs de sucrose par exemple). De même, la photosynthèse semble moins réprimée.
- La présence de sieboldine, *via* sa forte activité antioxydante, pourrait participer à limiter la progression de la mort cellulaire, et donc du pathogène.
- L'oxydation des DHC par les PPO, couplée à des processus de déglucosylation, conduit potentiellement à la production d'un ensemble de composés créant un environnement antibactérien et antioxydant. La libération plus lente de phlorétine pourrait également garantir sa biodisponibilité et donc son efficacité contre *Ea*. Comme pour MM106, la localisation tissulaire de ces enzymes et des substrats est en cours d'investigation pour vérifier l'occurrence de ces réactions et la présence des produits de transformation dans les tissus attaqués par la bactérie.

Tous ces résultats sont donc à approfondir et à éprouver sur les descendants. Ils mettent en lumière que l'interaction Pommier-*Ea* est vraiment originale par rapport à la plupart des interactions plante-bactérie décrites à ce jour. En effet, dans cette interaction, les gènes de défense sont plus exprimés dans le génotype sensible que dans le génotype résistant, et chez ce dernier, il n'existe *a priori* pas de défense exprimée de manière constitutive très forte (le transcriptome entier n'a cependant pas été étudié et une approche plus exhaustive sera donc nécessaire pour conclure à ce sujet), qui pourrait expliquer cette « passivité » au

cours de l'infection. De plus, il semble que les PAMPs de la bactérie ne sont pas reconnus par la plante hôte et sa perception se fait *via* certains de ses effecteurs (plus particulièrement HrpN et DspA/E), puisque les mutants du T3SS n'induisent pratiquement pas de réponses chez leur hôte. De plus, la répression de la voie de signalisation de l'acide jasmonique a rarement été décrite dans une interaction compatible plante-bactérie et suggère l'existence d'un autre mécanisme de pathogénèse. Ces observations posent la question de la nature du style de vie d'*Erwinia amylovora*. Ce pathogène nécrogène induit l'expression de défenses généralement attribuées à la résistance aux pathogènes biotrophes (défenses SA-dépendantes). La répression de la voie JA, celle-ci étant classiquement associée à la réponse aux blessures et aux herbivores, suggère qu'*Ea* réprime les défenses qui y sont associées et lui seraient potentiellement néfastes. Toutefois, cette bactérie ne peut être considérée comme nécrotrophe, car comme l'indiquent les résultats de la microscopie-GFP, elle n'est pratiquement jamais retrouvée dans les tissus nécrosés, mais plutôt à l'interface entre la nécrose et le tissu sain, ce qui signifie qu'elle migre avec le front de nécrose. Le qualificatif de « nécrogène » décrit donc un comportement pathogénique particulier, qui convient tout à fait à *Erwinia amylovora*.

Une autre hypothèse pour expliquer la non-progression d'*Ea* chez Everest serait la capacité de ce génotype à bloquer la production et/ou la sécrétion des effecteurs de type III. Cette hypothèse corrèlerait très bien avec la diminution des modulations observées au niveau transcriptionnel 24 h après infiltration. Cette capacité serait hypothétiquement inductible, ce qui expliquerait que les phases précoces de l'interaction chez les deux génotypes sont très similaires. Il a déjà été montré que certains produits phénoliques, et plus particulièrement des phénylpropanoïdes, sont capables de moduler l'expression des gènes du système Hrp, soit positivement (Yang et al., 2008) soit négativement (Li et al., 2009). Il apparaît que la position des substitutions hydroxyles sur le cycle A est prépondérante dans l'effet modulateur. L'effet des 3 DHC constitutives d'Evereste sur l'expression des gènes Hrp d'*Ea* sera prochainement étudié grâce à une souche portant une fusion *lacZ* sous le contrôle d'un promoteur Hrp. De plus, cet effet inhibiteur pourrait même être observé et quantifié *in planta* par l'utilisation d'une souche d'*Ea* qui porterait une construction GFP sous le contrôle d'un promoteur Hrp. Concernant l'hypothèse de l'inhibition de la sécrétion des effecteurs, des expériences sont d'ores et déjà en cours, *via* l'utilisation d'une souche d'*Ea* exprimant une fusion HrpN-CyaA. Cette construction permet de suivre la translocation des effecteurs de type III dans les cellules de l'hôte par une mesure

de l'AMPc dans les tissus (*CyaA* code pour une adénylate cyclase). Ainsi, en suivant la concentration d'AMPc dans les tissus végétaux au cours de l'infection, il devrait être possible de mettre en évidence le blocage de la sécrétion des effecteurs de la bactérie, et plus particulièrement HrpN qui est un des effecteurs majeurs d'*Ea*. Un autre test, *in vitro* et plus simple pourra être envisagé, qui repose sur la capacité d'extraits végétaux (extraits protéiques et/ou phénoliques) à bloquer la synthèse ou la sécrétion des effecteurs de la bactérie en milieu inducteur du T3SS. Ceci sera simple à mettre en œuvre, puisqu'il s'agira d'analyser les expressions des gènes codant les effecteurs de type III et les surnageants de culture d'*Ea*, dans lesquels les protéines sécrétées sont présentes, après son incubation en milieu inducteur du T3SS en présence de différentes concentrations en extrait végétal. La capacité des DHC à bloquer la synthèse ou la sécrétion des effecteurs de type III pourra être étudiée de ces différentes manières.

L'influence de la lumière sur le pathosystème n'a pas été abordée ici, mais demeure une question de recherche importante. A l'obscurité, Everest devient sensible, et les génotypes sensibles deviennent encore plus sensibles. Il semble donc que l'activité photosynthétique joue un rôle primordial dans l'interaction. De plus, la situation compatible s'accompagne d'une répression de la photosynthèse (d'une part par l'interaction probable de DspA/E avec la préferredoxine, et d'autre part par la répression de gènes codant des éléments de la chaîne photosynthétique), et que la bactérie ne semble pas attaquer les cellules du parenchyme palissadique, où la densité et l'activité chloroplastiques sont élevées. Il se pourrait que ce tissu soit attaqué à l'obscurité. Les défenses et l'accumulation de métabolites secondaires sont connues pour être altérées à l'obscurité ce qui pourrait être la cause de la sensibilité accrue du Pommier à *Ea* dans ces conditions. Le système Everest lumière/ Everest obscurité pourrait être tout particulièrement intéressant pour analyser les réponses différenciellement exprimées en réponse à l'infection par *Ea* dans ces deux conditions. Bien que l'étiollement induit par un traitement prolongé à l'obscurité risque d'altérer fortement les réponses physiologiques, de nouveaux candidats devraient pouvoir être identifiés de cette manière.

Concernant l'implication des DHC et des enzymes de transformation, elle ne pourra être vraiment établie qu'après la vérification qu'il existe *in planta* une colocalisation entre les bactéries, le site de production du choc oxydant, les DHC et les enzymes de transformation. Par microscopie, des éléments ont été apportés quant à la localisation de ces deux derniers. Bien que les résultats ne soient que préliminaires, les DHC semblent être localisées dans le

parenchyme palissadique, dans le sous-épiderme des nervures et dans les tissus sous-jacents au système vasculaire. En outre, l'activité  $\beta$ -glucosidase ne colocalise principalement que dans le tissu sous-jacent au système vasculaire. Ce tissu ne semble cependant pas préférentiellement envahi par la bactérie, et la présence des DHC ainsi que des enzymes de transformation pourrait expliquer cette observation. La bactérie semble se multiplier préférentiellement dans le sous-épiderme. La détermination précise de la localisation tissulaire des DHC sera bientôt déterminée par imagerie par spectrométrie de masse, ce qui permettra de valider ou non l'ensemble de ces résultats.

- Candidats à la transgénèse

Comme mentionné dans l'introduction générale, la transgénèse, et plus particulièrement l'intragénèse, pourrait constituer une alternative intéressante à la lutte chimique. Cette méthode requiert néanmoins une connaissance approfondie, aussi bien du pathogène que de la plante. Les résultats obtenus ici suggèrent trois voies envisageables :

(i) la présence de *LTP15*, très induite chez Evereste par *Ea*, est particulièrement intéressante et son expression ectopique chez MM106 pourrait conférer une résistance à ce pathogène. Néanmoins, beaucoup de travaux sont à entreprendre pour déterminer si cette protéine joue réellement un rôle dans l'interaction. Idéalement, la surexpression de *LTP15* chez MM106 et sa suppression chez Evereste devraient permettre d'évaluer l'importance de la protéine codée par ce gène dans l'interaction.

(ii) le système phloridzine/phlorétine pourrait être manipulé de manière à provoquer la libération de phlorétine au niveau des tissus préférentiellement envahis par la bactérie, parenchyme cortical des nervures, où la  $\beta$ -glucosidase semble absente. Toutefois, il est pour l'instant indispensable de préciser si c'est la phlorétine, antimicrobienne, ou le glucose, stimulateur de la croissance bactérienne, qui joue un rôle prépondérant sur la bactérie. Selon l'un ou l'autre, la  $\beta$ -glucosidase pourrait être considérée comme un facteur de virulence ou de sensibilité. Toutefois, dans le système orthologue arbutine/hydroquinone chez le Poirier, la surexpression d'une  $\beta$ -glucosidase chez *Ea* qui favorise la libération d'hydroquinone n'altère pas l'agressivité du pathogène lorsqu'il est inoculé sur fruits ou tiges poussantes (Kerppola et al., 1987). Ceci suggère que d'autres activités enzymatiques pourraient intervenir en aval, par exemple les PPO.

(iii) la capacité de la bactérie à réprimer la voie de signalisation de l'acide jasmonique pourrait être une des clés de la sensibilité. Dans ce cas, la surexpression de facteurs de

transcription non réprimés par *Ea* ou bien l'insertion de séquences promotrices incapables de fixer des répresseurs induits par *Ea* pourrait permettre l'expression de défenses efficaces au cours de l'interaction.

Les travaux acquis durant ces trois ans ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'interaction *Ea*/Pommier. Ils précisent dans quels tissus s'établit préférentiellement l'interaction et que la progression de la bactérie chez son hôte sensible s'accompagne d'une importante reprogrammation transcriptionnelle. De plus, ces travaux suggèrent fortement l'existence d'un mécanisme de défense chez le Pommier, le système phloridzine/phlorétine/ $\beta$ -glucosidase/PPO, analogue à celui décrit il y a maintenant plusieurs années chez le Poirier avec l'arbutine et l'hydroquinone. L'ensemble des données présentées ici soulève l'importance de préciser l'étude moléculaire sur certains types de cellules en particulier, afin de prouver que tous les facteurs de sensibilité/résistance décrits ici convergent pour déterminer le devenir de l'interaction.

## **LISTE BIBLIOGRAPHIQUE**

- Adie B., Chico J.-M., Rubio-Somoza I. et Solano R., 2007.** Modulation of plant defenses by ethylene. *J. Plant Growth Regul.*, **26**:160-177.
- Agati G., Matteini P., Goti A. et Tattini M., 2007.** Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytol.*, **174** :77-89.
- Aksamit-Stachurska A., Korobczak-Sosna A., Kulma A. et Szopa J., 2008.** Glycosyltransferases efficiently control phenylpropanoid pathway. *BMC Biotechnol.*, **8**:25-41.
- Al-karabelleh N., Weingart H. Et Ullrich M.S., 2009.** The outer membrane protein TolC is required for phytoalexin resistance and virulence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiol. Technol.*, **2**:465-475.
- Altenbach D. et Robatzek S., 2007.** Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **20**:1031-1039.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. et Lipman D.J., 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.*, **25**:3389-3402.
- Alvarez Y., Briones A.M., Perez-Giron J.-V., Alonso M.J. et Salices M., 2008.** Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 926-935.
- Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Throgrimsen S., Petersen N.H.T., Zhu S., Qiu J.-L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M.-A., Nielsen H.B., Hirt H., Somssich I., Mattsson O. et Mundy J.** The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO J.*, **24**:2579-2589.
- Attaran Z., Zeier T.E., Griebel T. et Zeier J., 2009.** Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **21**:954-971.
- Avila H.P., Fatima Albino Smania E., Monache F.D., Smania Jr. A., 2008.** Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**:9790-9794.
- Awad H.M., Boersma M.G., Vervoort J., Rietjens I.M.C.M., 2000.** Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **478**:224-233.
- Ayabe S.-I. et Akashi T., 2006.** Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochem. Rev.*, **5**:271-282.

- Aziz A., Heyraud A. et Lambert B., 2004.** Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, **218**:767-774.
- Badel J.L., Shimizu R., Oh H. et Collmer A., 2006.** A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* avrE1/hopM1 mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **19**: 99-111.
- Balbi V. et Devoto A., 2008.** Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and physiological scenarios. *New Phytol.*, **177**:301-318.
- Barbehenn R.V., Jones C.P., Yip L., Tran L. et Constabel C.P., 2007.** Limited impact of elevated levels of polyphenol oxidase on tree-feeding caterpillars : assessing individual plant defenses with transgenic poplar. *Oecologia*, **154**:129-140.
- Barny M.A., 1995.** *Erwinia amylovora* *hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *Eur. J. Plant Pathol.*, **101**: 333-340.
- Bengtsson M., Bäckman A.-C., Liblikas I., Ramirez M.I., Borg-Karlson A.K., Ansebo L., Anderson P., Löfqvist J. et Witzgall P., 2001.** Plant odor analysis of apple : antennal response of codling moth females to apple volatiles during phenological development. *J. Agric. Food Chem.*, **49**:3736-3741
- Benhamou N. et Nicole M., 1999.** Cell biology of plant immunization against microbial infections : the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**:703-719.
- Bent A.F. et Mackey D., 2007.** Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **45**:399-436.
- Bent A.F., Innes R.W., Ecker J.R. et Staskawicz B.J., 1992.** Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **5**:372-380.
- Berger S., Sinha A.K. et Roitsch T., 2007.** Plant physiology meets phytopathology : plant primary metabolism and plant pathogen-interactions. *J. Exp. Bot.*, **58**:4019-4026.
- Bernillon S., Guyot S. et Renard C.M.G.C., 2004.** Detection of phenolic oxidation products in cider apple juice by high-performance liquid chromatography electrospray ionisation ion mass trap spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 939-943.
- Besson-Bard A., Pugin A. et Wendehenne D., 2008.** New insights into nitric oxide signalling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**:21-39.

- Bestwick C.S., Bennett M.H. et Mansfield J.W., 1995.** Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induced cell wall alterations but not membrane damage leading to hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.*, **108**:503-516.
- Bhuiyan N.H., Selvaraj G., Wei Y. et King J., 2009.** Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J. Exp. Bot.*, **60**:509-521.
- Biemel K.M., Reihl O., Conrad J. et Lederer M.O., 2001.** Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard Processes. *J. Biol. Chem.*, **276**: 23405-23412.
- Bienert G.P., Schjoerring J.K. et Jahn T.P., 2006.** Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta*, **1758**:994-1003.
- Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A., Stone J.M., Asai T., Plotnikov J., Denoux C., Hayes T., Gerrish C., Davies D.R., Ausubel F.M. et Bolwell G.P., 2006.** Peroxidase-dependant apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J.*, **47**:851-863.
- Blanco F., Salinas P., Cecchini N.M., Jordana X., Van Hummelen P., Alvarez M.E. et Holuigue L., 2009.** Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, **70**:79-102.
- Bleecker A.B. et Kende H., 2000.** Ethylene: a gaseous signal molecule in plant. *Annu. Rev. Cel. Dev. Biol.*, **16** :1-18.
- Boccaro M., Schwartz W., Guiot E., Vidal G., De Paepe R., Dubois A. et A.-C. Boccaro, 2007.** Early chloroplastic alterations analysed by optical coherence tomography during a harpin-induced hypersensitive response. *Plant J.*, **55**:338-346.
- Bocsanczy A.M., Nissinen R.M., Oh C.-S. et Beer S.V., 2006.** DspE, an effector of *Erwinia amylovora* is translocated into plant cells. *Acta Hort.*, **704**: 467-472.
- Bocsanczy A.M., Nissinen R.M., Oh C.-S. et Beer S.V., 2008.** HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol. Plant Pathol.*, **9**:425-434.
- Boerjan W., Ralph J. et Baucher M., 2003.** Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**:519-546.
- Bogdanove A.J., Kim J.F., Wei Z., Kolchinsky P., Charkowski A.O., Conlin A.K., Collmer A. et Beer S.V., 1998.** Homology and functional similarity of an hrp-linked pathogenicity

locus, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avrE* of *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 1325-1330.

**Bogs J., Bruchmüller I., Erbar C. et Geider K., 1998.** Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathol.*, **88**:416-421.

**Bogs J., Richter K., Kim W.-S., Jock S. et Geider K., 2004.** Alternative methods to describe virulence of *Erwinia amylovora* and host plant resistance against fireblight. *Plant Pathol.*, **53**:80-89.

**Bohlmann J. et Keeling C.I., 2008.** Terpenoid biomaterials. *Plant J.*, **54**:656-659.

**Boller T. et Felix G., 2009.** A renaissance of elicitors : reconnaissance of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**:379-406.

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

**Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C. et Minibayeva F., 2002.** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.*, **53**:1367-1376.

**Bonasera J.M., Meng X.D., Beer S.V., Owens T. et Kim W.-S., 2006a.** Interaction of DspA/E, a pathogenicity protein of *Erwinia amylovora*, with pre-ferredoxin from apple and its relationship to photosynthetic efficiency. *Acta Hort.*, **704**:473-478.

**Bonasera J.M., Kim J.F. et Beer S.V., 2006b.** PR-genes of apple : identification and expression in response to elicitors and infection by *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biol.*, **6**:23 doi:10.1186/1471-2229-6-23.

**Boss P.K., Gardner R.C., Janssen B.-J. et Ross G.S., 1995.** An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol. Biol.*, **27**:429-433.

**Boter M., Ruiz-Rivero O., Abdeen A. et Prat S., 2004.** Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **18**:1577-1591.

**Boureau T., ElMaarouf-Bouteau H., Garnier A., Brisset M.-N., Perino C., Pucheu I. et Barny M.-A., 2006.** DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth *in planta*, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **19**:16-24.

- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. et Berset C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Brazma A. et Vilo J., 2000.** Gene expression data analysis. *FEBS Lett.*, **480** :17-24.
- Brisset M.-N. et Paulin J.-P., 1991.** Relationships between electrolyte leakage from *Pyrus communis* and virulence of *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 443-453.
- Brisset M.-N., Cesbron S., Thomson S.V. et Paulin J.-P., 2000.** Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defence-related enzymes in apple and protect against fire blight. *Eur. J. Plant Pathol.*, **106**:529-536.
- Brodersen P., Petersen M., Nielsen H.B., Zhu S., Newman M.-A., Shokat K.M., Rietz S., Parker J. et Mundy J., 2006.** *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.*, **47**:532-546.
- Brown I., Trethowan J., Kerry M., Mansfield J. et Bolwell G.P., 1998.** Localization of components of oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French Bean mesophyll cells. *Plant J.*, **15**:333-343.
- Browse J., 2009.** Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **60**:183-205.
- Burse A., Weingart H. et Ullrich M.S., 2004.** The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogene, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **17**:43-54.
- Burton S.G., 2003.** Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol.*, **21**:543-549.
- Bus V.G.M., Laurens F.N.D., Van de Weg W.E., Rusholme R.M., Rikkerink E.H.A., Gardiner S.E., Bassett H.C.M., Kodde L.P. et Plummer K.M., 2005.** The Vh8 locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the Vh2 locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytol.*, **166**:1035-1049.
- Calenge F., Drouet D., Denancé C., van der Weg W.E., Brisset M.-N., Paulin J.-P. et Durel C.-E., 2005.** Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theor. Appl. Genet.*

- Cela J., Falk J. et Munné-Bosch S., 2009.** Ethylene signaling may be involved in the regulation of tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **583**:992-996.
- Cerenius L., Lee B.L. et Söderhäll K., 2008.** The proPPO system : pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.*, **29**:263-271.
- Cesbron S., Paulin J.-P., Tharaud M., Barny M.-A. et Brisset M.-N., 2006.** The alternative  $\sigma$  factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, **257**:221-227.
- Chambers J.M., Cleveland W.S., Kleiner B. et Tukey P.A., 1983.** Graphical Methods for Data Analysis. *Chapman & Hall/CRC, Pacific Groves.*
- Chappell J., 1995.** The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.*, **107**:1-6.
- Chappell J., 2002.** The genetics and molecular genetics of terpene and sterol biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**:151-157.
- Chassot C., Nawrath C. et Métraux J.-P., 2007.** Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J.*, **49**:972-980.
- Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engasser J.-M. et Ghouil M., 2006.** Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochem.*, **41**:2237-2251.
- Chen H., Jones A.D. et Howe G.A., 2006.** Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Lett.*, **580**:2540-2546.
- Chen H., Xu L., Chintamanani S., Germain H., Lin H., Cui H., Cai R., Zuo J., Tang X., Li X., Guo H. et Zhou J.-M., 2009.** ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, doi:10.1105/tpc.108.065193
- Cheng A.-X., Lou Y.-G., Mao Y.-B., Lu S., Wang L.J. et Chen X.Y., 2007.** Plant terpenoids : biosynthesis and ecological functions. *J. Int. Plant Biol.*, **49** :179-186.
- Chevalier T., De Rigal D., Mbéguié-A-Mbéguié D., Gaillard F., Richard-Forgert L. et Fils-Lycaon B.R., 1999.** Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, **119**:1261-1269.

- Chini A., Boter M. et Solano R., 2009.** Plant oxylipins : COI1/JAZ/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Lett.*, **276**:4682-4692.
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J.M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L. et Solano R., 2007.** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**:666-673.
- Cho M.-H., Moinuddin S.G.H., Helms G.M., Hishyama S., Eichinger D., Davin L.B. et Lewis N.G., 2003.** (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**:10641-10646.
- Choi H.W., Lee B.G., Kim N.H., Park Y., Lim C.W., Song H.K. et Wang B.K., 2008.** A role for a menthone reductase in resistance against microbial pathogens in plants. *Plant Physiol.*, **148**:383-401.
- Chong J., Poutaraud A. et Huguency P., 2009.** Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.*, **177**:143-155.
- Ciftci-Yilmaz S. et Mittler R., 2008.** The Zinc-finger network of plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**:1150-1160.
- Clériveret A., Déon V., Alami I., Lopez F., Geiger J.-P. et Nicole M., 2000.** Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedling (*Platanus x acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*. *Trees*, **15**:25-31.
- Coego A., Ramirez V., Ellul P., Mayda E. et Vera P., 2005.** The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *Plant J.*, **42**:283-293.
- Cohn J.R. et Martin G.B., 2005.** *Pseudomonas syringae* pv *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promotes ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J.*, **44**:139-154.
- Collinge D.B., 2009.** Cell wall appositions: the first line of defence. *J. Exp. Bot.*, **60**:351-352.
- Constabel C.P. et Ryan C.A., 1998.** A survey of wound- and methyljasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochem.*, **47**:507-511.
- Constabel C.P., Yip L., Patton J.J. et Christopher M.E., 2000.** Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.*, **124**:285-295.
- Corpet F., 1988.** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, **16**:10881-10890

- Cosgrove D.J., 2005.** Growth of the plant cell wall. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**:850-861.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchinell M., Dallavia J., Koller B. et Sansavini S., 2005.** Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Euphytica*, **101**:181-190.
- Costa M.M.R., Hilliou F., Duarte P., Pereira L.G., Almeida I., Leech M., Memelink J., Ros-Barcelo A. et Sottomayor M., 2008.** Molecular cloning and characterisation of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant physiol.*, **146**:403-417.
- Cowan M.M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**:564-582.
- Creelman R.A., Tierney M.L. et Mullet J.E., 1992.** Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyle and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4938-4941.
- Cushnie T.P.T. et Lamb A.J., 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**:343-356.
- Dai G.H., Nicole M., Andary C., Martinez C., Bresson E., Boher B., Daniel J.F. et Geiger J.-P., 1996.** Flavonoids accumulate in cell walls, middle laminae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **49**:285-306.
- Dangl J.L. et Jones J.D.G., 2001.** Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, **411**:826-833.
- Dat J.F., Pellinen R., Beeckman T., Van De Cotte B., Langebartels C., Kangasjarvi J., Inzé D. et van Breusegem F., 2003.** Change in hydrogen peroxide homeostasis triggers an active cell death process in tobacco. *Plant J.*, **33**:621-632.
- Davis K.R. et Hahlbrock K., 1987.** Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments. *Plant Physiol.*, **85**:1286-1290.
- Day A.J., DuPont M.S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M.J.C., Morgan M.R.A. et Williamson G., 1998.** Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Lett.*, **437**:71-75.
- De Capdeville G., Beer S.V., Wilson C.L. et Aist J.R., 2008.** Some cellular correlates of harpin-induced resistance to blue mold of apples. *Trop. Plant Pathol.*, **33**:103-113.
- De Oliveira Carvalho A. et Gomes V.M., 2007.** Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. *Peptides*, **28**:1144-1153.

- DebRoy S., Thilmony R., Kwack Y.-B., Nomura K. et He S.-Y., 2004.** A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**:9927-9932.
- Decker H., Schweikardt T. et Tuczec F., 2006.** The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**:4546-4550.
- Degenhardt J., Al-Masri A.-N., Kurkcuoglu S., Szankowski I. et Gau A.E., 2005.** Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differently expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol. Genet. Genomics*, **273**: 326–335
- Degrave A., Fagard M., Perino C., Brisset M.-N., Gaubert S., Laroche S., Patrit O. et Barny M.-A., 2008.** *Erwinia amylovora* type three-secreted proteins trigger cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **21**:1076-1086.
- Delaunay-Cesbron S., 2009.** Interaction entre des mutants *hrp* d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérie, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité. Thèse n°931, *Ecole Doctorale d'Angers, Angers, France*.
- Dellagi A., Brisset M.-N., Paulin J.-P. et Expert D., 1998.** Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **11**:734-742.
- Dellagi A., Reis D., Vian B. et Expert D., 1999.** Expression of the desferrioxamine receptor gene of *Erwinia amylovora* CFBP1430 during pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**:436-466.
- Deng D., Zhang J., Coonay J.M., Skinner M.A., Adaim A., Jensen D.J. et Stevenson D.E., 2006.** Methylated polyphenols are poor “chemical” antioxidants but can effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *FEBS Lett.*, **580**:5247-5250.
- Devoto A. et Turner J.G., 2005.** Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network
- Devoto A., Ellis C., Magusin A., Chang H.-S., Chilcott C., Zhu T. et Turner J.G., 2005.** Expression profiling reveals *COI1* to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol.*, **58**:497-513.
- Dhaubhadel S., McGarvey B., Williams R. et Gizjen M., 2003.** Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Mol. Biol.*, **53**:733-743.

- Dixon R.A. et Paiva N.L., 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**:1085-1097.
- Dombrecht B., Xue G.P., Sprague S.J., Kirkegaard J.A., Ross J.J., Reid J.B., Fitt G.P., Sewelam N., Schenk P.M., Manners J.M. et Kazan K., 2007.** MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**:2225-2245.
- Donahue J.L., Okpodu C.M., Cramer C.L., Grabau E.A. et Alischer R.G., 1997.** Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (relationships to resistance). *Plant Physiol.* **113**, 249-257.
- Dong X., 1998.** Salicylic acid, jasmonic acid, ethylene and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**:316-323.
- Dong X., 2004.** NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**:547-552.
- Dry I.B. et Robinson S.P., 1994.** Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.*, **26**:495-502.
- Du L., Ali G.S., Simons K.A., Hou J., Yang T., Reddy A.S.N. et Poovaiah B.W., 2009.** Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, **457** :1157-1159.
- Durel C.-E., Denancé C. et Brisset M.-N., 2009.** Two distinct major QTL for fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821. *Genome*, **52**:139-147.
- Durrant W.E. et Dong X., 2004.** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**:185-209.
- Dutta K., Shampa S. et Veeranki V.D., 2009.** Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochem.*, **44**:127-134.
- Ehrenkranz J.R.L., Lewis N.G., Kahn C.R. et Roth J., 2005.** Phloridzin: a review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **21**, 31-38.
- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O. et Botstein D., 1998.** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**:14863-14868.
- Elfstrand M., Sitbon F., Lapierre C., Bottin A. et von Arnold S., 2002.** Altered lignin structure and resistance to pathogens in *spi 2*-expressing tobacco plants. **214**:708-716.
- Espin J.C., Morales M., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J. et Garcia-Canovas F., 1997.** Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **45**:1084-1090.

- Espley R.V., Hellens R.P., Putterill J., Stevenson D.E., Kutty-Amma S. et Allan A.C., 2007.** Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *Plant J.*, **49**:414-427.
- Eulgem T. et Somssich I.E., 2007.** Networks of WRKY transcription factors in defense signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**:366-371.
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatezk S. et Somssich I.E., 2000.** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.*, **5**:199-206.
- Farmer E.E., Alméras E. et Krishnamurthy V., 2003.** Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Sci.*, **6**:372-378.
- Feng S., Ma L., Wang X., Xie D., Dinesh-Kumar S.D., Wei N. et Deng X.W., 2003.** The COP9 signalosome interacts physically with SCFCO11 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell*, **15**:1083-1094.
- Ferrer J.-L., Austin F.B., Stewart Jr. C. et Noel J.-P., 2008.** Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem.*, **46**:356-370.
- Feussner I et Wasternack C., 2002.** The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**:275-297.
- Flukey W.H. et Inlow J.K., 2008.** Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J. Inorg. Biochem.*, **102**:2160-2170.
- Fobert P.R. et Després C., 2005.** Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8** :378-382.
- Freeman B.C. et Beattie G.A., 2009.** Bacterial growth restriction during host resistance to *Pseudomonas syringae* is associated with leaf water loss and localized cessation of vascular activity in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **22**:857-867.
- Fung R.W.M., Gonzalo M., Fekete C., Kovacs L.G., He Y., Marsh E., McIntyre L.M., Schachtman D.P. et Qiu W., 2008.** Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming transcriptome in a susceptible but not a resistance grapevine. *Plant Physiol.*, **146**:236-249.
- Gachon C.M.M., Langlois-Meurinne M. et Saindrenan P., 2005.** Plant secondary metabolism glycosyltransferases : the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.*, **10**:542-549.
- Galati G., Chan T., Wu B. et O'Brien P.J., 1999.** Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**:521-525.

- Garcion C., Lohmann A., Lamodière E., Catinot J., Buchala A., Doerman P. et Métraux J.-P., 2008.** Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **147**:1270-1287.
- Garreton V., Carpinelli J., Jordana X. et Holuigue L., 2002.** The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiol.*, **130**:1516-1526.
- Gau A.E., Koutb M., Piotrowski M. et Kloppstech K., 2004.** Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *Eur. J. Plant Pathol.*, **110**:703-711.
- Gaudriault S., Brisset M.-N. et Barny M.-A., 1998.** HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Lett.*, **428**: 224-228.
- Gaudriault S., Malandrin L., Paulin J.-P. et Barny M.-A., 1997.** DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol. Microbiol.*, **26**: 1057-1069.
- Gavnholt B. et Larsen K., 2002.** Molecular biology of laccases in relation to lignin formation. *Physiol. Plant.* **116**:273-280.
- Geider K., 2000.** Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation and role in pathogenicity of amylovoran and levan. In: Vanneste J, ed. *Fire Blight: the Disease and its Causative Agent Erwinia amylovora*. Wallingford, UK: CABI Publishing, **117-140**.
- Geldner N. et Robatzek S., 2008.** Receptors go endosomal: a moving view on signal transduction. *Plant Physiol.*, **147**:1565-1574.
- Gerdemann C., Eicken C. et Krebs B., 2002.** The crystal structure of catechol oxidase: new insights into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.*, **35**:183-191.
- Gershenzon J. et Dudareva N., 2007.** The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.*, **3**:408-414.
- Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M. et Creager M.A., 2006.** Advanced glycation end products. *Circ.* **114**, 597-605.
- Gomez-Gomez L., Felix G. et Boller T., 1999.** A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **18**:277-284.

- Gooding P.S., Bird C. et Robinson S.P., 2001.** Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, **213**:748-757.
- Goodman R.N. et White J.A., 1981.** Xylem parenchyma plasmolysis and vessel wall disorientation caused by *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.*, **71**:844-852.
- Gopalan V., Pastuszyn A., Galey Jr. W.R. et Glew R.H., 1992.** Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by Guinea pig liver cytosolic  $\beta$ -glucosidase. *J. Biol. Chem.*, **267**: 14027-14032.
- Gosch C., Halbwirth H., Kuhn J., Miosic S. et Stich K., 2009.** Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus x domestica*, Borkh). *Plant Sci.* **176**, 223-231.
- Grant M. et Lamb C., 2006.** Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**:414-420.
- Grant M.R. et Jones J.D.G., 2009.** Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Nature*, **324**:750-752.
- Grant M.R. et Jones J.D.G., 2009.** Plant (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science*, **324**: doi.10.1126/science.1173771.
- Griebel T. et Zeier J., 2008.** Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiol.*, **147**:790-801.
- Gross G.G., 2008.** From lignins to tannins: forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochem.*, doi:10.1016/j.phytochem.2007.04.031.
- Guyot S., Pellerin P., Brillouet J.-M. et Cheynier V., 1996b.** Inhibition of  $\beta$ -glucosidase (*Amygdalae dulces*) by (+)-catechin oxidation products and procyanidin dimers. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**:1131-1135.
- Guyot S., Serrand S., Le Quéré J.-M., Sanoner P. et Renard C.M.G.C., 2007.** Enzymatic synthesis and physicochemical characterisation of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **8**:443-450.
- Guyot S., Vercauteren J. et Cheynier V., 1996a.** Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochem.*, **42**:1279-1288.
- Guzik T.J., West N.E.J., Black E., McDonald D., Ratnatunga C., Pillai R. et Channon K.M., 2000.** Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase-association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* **86**, 85-90.

- Hahn A. et Harter K., 2009.** Mitogen-activated protein kinase cascades and ethylene: signaling, biosynthesis, or both? *Plant Physiol.*, **149**:1207-1210.
- Hamilton-Miller J.M.T., 1995.** Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**:2375-2377.
- Hanahan D., 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.
- Harris J.C., Cottrell S.L., Plummer S. et Lloyd D., 2001.** Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**:282-286.
- Hartmann U., Sagasser M., Mehrtens F., Stracke R. et Weisshaar B., 2005.** Differential combinatorial interactions of *cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, bZIP and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol. Biol.*, **57**:155-171.
- Haruta M., Murata M., Hiraide A., Kadokura H., Yamasaki M., Sakuta M., Shimizu S. et Homma S., 1998.** Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and in Apple. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**:358-362.
- Hauck P., Thilmony R. et He S.-Y., 2003.** A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**:8577-8582.
- He X. et Liu R.H., 2007.** Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J. Agric. Food Chem.*, **55**:4366-4370.
- Heide L., 2009.** Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**:171-179.
- Heil M., 2009.** Damage-self recognition in plant herbivore defence. *Trends Plant Sci.*, doi:10.1016/j.tplants.2009.04.002.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R. et Bobilya D.J., 2000.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572-584.
- Hématy K., Cherk C. et Somerville S., 2009.** Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**:406-413.
- Heredia A., 2003.** Biophysical and biochemical properties of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* **1620**:1-7.

- Hernandez I., Alegre L., Van Breusegem F. et Munné-Bosch S., 2008.** How relevant are flavonoids as antioxidant in plants? *Trends Plant Sci.* **14**, 125-132.
- Hernandez-Blanco C., Feng D.X., Hu J., Sanchez-Vallet A., Deslandes L., Llorente F., Berrocal-Lobo M., Keller H., Barlet X., Sanchez-Rodriguez C., Anderson L.K., Somerville S., Marco Y. et Molina A., 2007.** Impairment of cellulose synthase required for *Arabidopsis* cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell*, **19**:890-903.
- Heyens K. et Valcke R., 2004.** Fluorescence imaging of the infection pattern of apple leaves with *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.*, **704**:69-74.
- Hilaire E., Young S.A., Willard S.H., McGee J.D., Sweat T., Chittoor J.M., Guikema J.A. et Leach J.E., 2001.** Vascular defence responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**:1411-1419.
- Hildebrand D.C. et Schroth M.N., 1963.** Arbutin-hydroquinone complex in pear as a factor in fire blight development. *Phytopathol.*, **54**:640-645
- Hildebrand D.C., 1970.** Fire blight resistance in *Pyrus*: hydroquinone formation as related to antibiotic activity. *Can. J. Bot.*, **48**:177-181.
- Hildebrand D.C., Powell Jr. C.C. et Schroth M.N., 1969.** Fire blight resistance in *Pyrus*: localization of arbutin and  $\beta$ -glucosidase. *Phytopathol.*, **59**:1534-1539.
- Hilt P., Schieber A., Yildirim C., Arnold G., Klaiber I., Conrad J., Beifuss U. et Carle R., 2003.** Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2896-2899.
- Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Tacker J.R. et Kües U., 2005.** Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.*, **273**-2308-2326.
- Hofius D., Tsitsigiannis D.I., Jones J.D.G. et Mundy J., 2007.** Inducible cell death in plant immunity. *Semin. Cancer Biol.*, **17**:166-187.
- Hoopes J.T. et Dean J.F.D., 2004.** Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. *Plant Physiol. Biochem.*, **42**:27-33.
- Howe G.A. et Schillmiller A.L., 2002.** Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**:230-236.
- Huang D., Ou B. et Prior R.L., 2005.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841-1856.

- Huang P.-Y. et Goodman R.N., 1976.** Ultrastructural modifications in apple stems induced by *Erwinia amylovora* and the fire blight toxin. *Phytopathol.*, **66**:269-276.
- Huang X. et Madan A., 1999.** CAP3 : a DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, **9**:868-877.
- Huang Y., Zang A., Lau C.-W. et Chen Z.-Y., 1998.** Vasorelaxant effects of purified green tea catechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* **63**, 275-283.
- Hückelhoven R., 2007.** Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **45**:101-127.
- Hückelhoven R., Fodor J., Preis C. et Kogel K.-H., 1999.** Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.*, **119**:1251-1260.
- Hunter L.D. et Hull L.A., 1993.** Variation in the concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochem.* **34**, 1251-1254.
- Hunter L.D., 1975.** Phloridzin and apple scab. *Phytochemistry* **14**, 1519-1522.
- Ibrahim R.K., Bruneau A. et Bantignies B., 1998.** Plant O-methyltransferases : molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol. Biol.*, **36**:1-10.
- Jamil S., Sirat H.M., Jantan I., Aimi N. et Kitajima M., 2008.** A new prenylated dihydrochalcone from the leaves of *Artocarpus lowii*. *J. Nat. Med.*, **62**:321-324.
- Jones M.G., Hughes J., Tregova A., Milne J., Tomsett A.B. et Collin H.A., 2004.** Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J. Exp. Bot.*, **55**:1903-1918.
- Jones J.D.G. et Dangl J.L., 2006.** The plant immune system. *Nature*, **444** :323-329.
- Jorgensen K., Rasmussen A.V., Morant M., Nielsen A.H., Bjarnholt N., Zagrobelny M., Bak S. et Moller B.L., 2005.** Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**:280-291.
- Judgé H., Danny N., Nguy I., Moller J., Cooney J.M. et Atkinson R.G., 2008.** Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple. *FEBS J.* **275**, 3804–3814.
- Katoh K., Kuma K.-I., Toh H. et Miyata T., 2005.** MAFFT version 5 : improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucl. Acids Res.*, **33**:511-518.
- Katsir L., Schillmiller A.L., Staswick P.E., He S.-Y. et Howe G.A., 2008.** COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**:7100-7105.

- Keeling C.I. et Bohlmann J., 2006.** Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced resistance of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.*, **170**:657-675.
- Kerppola T.K., Serwold-Davis T., Gross D.C. et Kahn M.L., 1987.** Effect of increased  $\beta$ -glucosidase activity on virulence of *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**:677-682.
- Kessler A. et Baldwin I.T., 2001.** Defensive function of herbivore induced plant volatile emissions in nature. *Science*, **291**:2141-2144.
- Khanizadeh S., Tsao R., Rekika D., Yang R., Charles M.-T. et Rupasinghe H.P.V., 2008.** Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Comp. Anal.* **21**, 396-401.
- Kim J.Y., Seo Y.S., Kim J.E., Sung S.-K., Song K.J., Ann G. et Kim W.T., 2001.** Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Sci.*, **161**:1145-1152.
- King E.O., Ward M.K. et Raney D.E., 1954.** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, **44**: 301-307.
- Kirby J. et Keasling J.D., 2009.** Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**:335-355.
- Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C. et Krebs B., 1998.** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Struct. Biol.* **5**:1084-1090.
- Knox J.-P., 2008.** Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**:308-313.
- Koo A.J.K. et Howe J.A., 2009.** The wound hormone jasmonate. *Phytochem.*, doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.018.
- Koussevitzky S., Ne'eman E., Peleg S. et Harel E., 2008.** Polyphenol oxidase can cross thylakoids by both the Tat- and the Sec-dependent pathways : a putative role for two stromal processing sites. *Physiol. Planta.*, **133** :266-277.
- Koutaniemi S., Warinowsky T., Kärkönen A., Alatalo E., Fossdal C.G., Saranpää P., Lasko T., Fagerstedt K.V., Simola L.K., Paulin R., Rudd S. et Teeri T.H., 2007.** Expression profiling of lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Mol. Biol.*, **65**:311-328.

- Kubo I. et Matsumoto A., 1985.** Isolation of an insect-antifeedant, phloretin-4'-O- $\beta$ -glucoside, by rotation locular counter-current chromatography and determination of its preferential conformation in solution by nuclear magnetic resonance analysis. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**:3817-3820.
- Kwon C., Panstruga et Schulze-Lefert P., 2008.** Les liaisons dangereuses : immunological synapse formation in animals and plants. *Trends Immunol.*, **29**:159-166.
- Kyung K.H., Han D.C. et Fleming H.P., 1997.** Antibacterial activity of heated cabbage juice, S-methyl-L-cysteine sulfoxide and methyl methanthiosulfonate. *J. Food Sci.*, **62**:406-409.
- LaCamera S., Gouzerh G., Dhondt S., Hauffmann L., Fritig B., Legrand T. et Heitz T., 2004.** Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.*, **198**:267-284.
- Lam E., 2004.** Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**:305-315.
- Le Guernevé C., Sanoner P., Drilleau J.-F. et Guyot S., 2004.** New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Lett.*, **45**:6673-6677.
- Lechner E., Achard P., Vansiri A., Potuschak T. et Genschik P., 2006.** F-Box proteins everywhere. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**:631-638.
- Lecourieux D., Ranjeva R. et Pugin A., 2006.** Calcium in plant-defence signalling pathways. *New Phytol.*, **171**:249-269.
- Lee J., Klusener B., Tsiamis G., Stevens C., Neyt C., Tampakaki A.P., Panopoulos N.J., Noller J., Weiler E.M., Cornelis G.R., Mansfield J.W. et Nurnberger T., 2001.** HrpZPspH from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**: 289-294.
- Lee K.W., Kim Y.J., Kim D.-O., Lee H.J. et Lee C.Y., 2003.** Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6516-6520.
- Lee S.-Y. et Lee D.-H., 2005.** Expression of *MbR4*, a TIR-NBS type of Apple R gene, confers resistance to bacterial spot disease in *Arabidopsis*. *J. Plant Biol.*, **48**:220-228.
- Leon-Reyes A., Spoel S.H., De Lange E.S., Abe H., Kobayashi M., Tsuda S., Millenaar F.F., Welschen R.A.M., Ritsema T. et Corné C.M.J., 2009.** Ethylene modulates the role of NON EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in crosstalk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol.*, **149**:1797-1809.

- Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N. et Caboche M., 2006.** Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**:405-430.
- Lequeu J., Fauconnier M.-L., Chammaï A., Bronner R. et Blée E., 2003.** Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. *Plant J.*, **36**:155-164.
- Leser C. et Treutter D., 2005.** Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiol. Planta.*, **123**:49-56.
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D. et Delledonne M., 2009.** *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**:451-458.
- Li H. et Guo H., 2007.** Molecular basis of ethylene signalling and response pathway in *Arabidopsis*. *J. Plant Growth Regul.*, **26**:106-117.
- Li H., Flachowsky H., Fischer T.C., Hanke M.-V., Forkmann G., Treutter D., Schwab W., Hoffmann T. et Szankowski I., 2007.** Maize *Lc* transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct procyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta*, **226**:1243-1254.
- Li J., Brader G. et Palva E.T., 2004.** The WRKY70 transcription factor : a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, **16**:319-331.
- Li L. et Steffens J.C., 2002.** Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants enhances bacterial disease resistance. *Planta*, **215**:238-247.
- Li Y., Peng Q., Selimi D., Wang Q., Charkowski A.O., Chen X. et Yang C.-H., 2009.** The plant phenolic compound *p*-coumaric acid represses gene expression in the *Dickeya dadantii* type III secretion system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**:1223-1228.
- Ling T.J., Lin L.D., Wu P., Zhou W.H., Ye H.G., Liu M.F. et Wei X.Y., 2004.** Dihydrochalcones from *Symplocos vacciniifolia*. *Chin. Chem. Lett.* **15**, 182-184.
- Liszkey A., Kenk B. et Schopfer P., 2003.** Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, **217**:658-667.
- Liu L.-H., Ludewig U., Gassert B., Frommer W.B. et von Wiren N., 2003.** Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **133**:1220-1228.

- Loake G. et Grant M., 2007.** Salicylic acid in plant defenses: the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**:466-472.
- Lorenzo O., Chico J.M., Sanchez-Serrano J.J. et Solano R., 2004.** JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**:1938-1950.
- Lorenzo O., Piqueras R., Sanchez-Serrano J.J. et Solano R., 2003.** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 intergrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, **15**:1-14.
- Lorrain S., Lin B., Auriac M.-C., Kroj T., Saindrenan P., Nicole M., Balagué C. et Roby D., 2004.** VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*, **16**:2217-2232.
- Loufrani L., Retaillau K., Bocquet A., Dumont O., Danker K., Louis H., Lacolley P. et Henrion D., 2008.** Key role of  $\alpha_1\beta_1$ -integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**, H1906-H1913.
- Lu Y. et Foo L.Y., 2000.** Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* **68**, 81-85.
- Lukasik E. et Takken F.L.W., 2009.** STANDIng strong, resistance proteins: instigators of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**:427-436.
- Luscher T.F., Boulanger C.M., Dohi Y. et Yang Z., 1992.** Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* **19**, 117-130.
- Ma W. et Berkowitz G., 2007.** The grateful dead : calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell. Microbiol.*, **9**:2571-2585.
- Ma W., Smigel A., Tsai Y.-C., Braam J. et Berkowitz G.A., 2008.** Innate immunity signaling : cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiol.*, **148**:818-828.
- Mahanil S., Attajarusit J., Stout M.J. et Thipyapong P., 2008.** Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. *Plant Sci.*, **174**:456-466.
- Makris D.P. et Rossiter J.T., 2000.** Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **48**:3830-3838.

- Malnoy M., Faize M., Venisse J.-S., Geider K. et Chevreau E., 2005.** Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility. *Plant Cell. Rep.*, **23**:632-638.
- Malnoy M., Gin Q., Borejsza-Wisocka E.E., He S.-Y. et Aldwinckle H.S., 2007.** Overexpression of the apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **20**:1568-1580.
- Malnoy M., Venisse J.-S., Brisset M.-N. et Chevreau E., 2003.** Expression of bovin lactoferrin cDNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear. *Mol. Breed.*, **12**:231-244.
- Malnoy M., Xu M., Borejsza-Wisocka E.E., Korban S.S. et Aldwinckle H.S., 2008.** Two receptor-like genes, *Vfa1* and *Vfa2*, confer resistance to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* inciting apple scab disease. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **21**:448-458.
- Marchi G., Mori B., Pollacci P., Mencuccini M et Surico G., 2009.** Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive explants. *Plant Pathol.*, **58**:152-158.
- Mari S., Marquès L., Breton F., Karamanos Y. et Macheix J.-J., 1998.** Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *Phytochem.*, **49**:1213-1217.
- Marusek C.M., Trobaugh N.M., Flurkey W.H. et Inlow J.K., 2006.** Comparative analysis of polyphenol oxidases from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.*, **100**:108-123.
- Matoba Y., Kumagai T., Yamamoto A., Yoshitsu H. Sugiyama M., 2006.** Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.*, **281**:8981-8990.
- Mayer A.M. et Staples R.C., 2002.** Laccases: new functions for an old enzyme. *Phytochem.*, **60**:551-565.
- Mayer A.M., 2006.** Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochem.*, **67**:2318-2331.
- Mayr U., Michalek S., Treutter D. et Fucht W., 1997.** Phenolic compounds of apple and their relationship to apple scab resistance. *J. Phytopathol.*, **145**:69-75.
- McCaig B.C., Meagher R.B. et Dean J.F.D., 2005.** Gene structure and molecular analysis of laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **212**:619-636.
- McGrath M.J., Koczan J.M., Kennelly M.M. et Sundin G.W., 2009.** Evidence that prohexadione-calcium induces structural resistance to fire blight infection. **99**:591-596.

- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K. et He S.-Y., 2006.** Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, **126**:969-980.
- Meng X., Bonasera J.M., Kim J.F., Nissinen R.M. et Beer S.V., 2006.** Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **19**:53-61.
- Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H. et Jennings K.R., 2002.** Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.*, **36**:1199-1208.
- Mishina T.E. et Zeier J., 2007.** Bacterial non-host resistance: interactions of *Arabidopsis* with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. *Physiol. Planta.*, **131**:448-461.
- Momol M.T., Norelli J.L., Piccioni D.E., Momol E.A., Gustafson H.L., Cummins J.N. et Aldwickle H.S., 1998.** Internal movement of *Erwinia amylovora* through symptomless apple scion tissues into the rootstock. *Plant Disease*, **82**:646-650.
- Mora J.R., Iwata M. et von Andrian U.H., 2008.** Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Rev. Immunol.*, **8**:685-698.
- Morant A.V., Bjarnholt N., Kragh M.E., Kjaergaard C.H., Jorgensen K., Paquette S.M., Piotrowski M., Imberty A., Olsen C.E., Moller B.L. et Bak S., 2008b.** The  $\beta$ -glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucoside in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, **147**:1072-1091.
- Morant A.V., Jorgensen K., Jorgensen C., Paquette S.M., Sanchez-Perez R., Moller B.L. et Bak S., 2008a.** B-glucosidases as detonators of plant chemical defenses. *Phytochem.*, **69**:1795-1813.
- Mudgett M.B., 2005.** New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56**: 509-531.
- Mukhtar M.S., Nishimura M.T. et Dangl J., 2009.** NPR1 in plant defense: it's not over 'til it's turned over. *Cell*, **137**:804-806.
- Murata M., Tsurutani M., Hagiwaraa S. et Homma S., 1997.** Subcellular localisation of polyphenol oxidase in apple. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**:1495-1497.
- Nakamura Y., Watanabe S., Miyake N., Kohno H. et Osawa, T., 2003.** Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3309-3312.
- Nakano D., Kwak C.-J., Fujii K., Ikemura K., Satake A., Ohkita M., Takaoka M., Ono Y., Nakai M., Tomimori N., Kiso Y., Matsumura Y., 2006.** Sesamin metabolites induces an

endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation through their antioxidative property-independent mechanisms: possible involvement of the metabolites in the antihypertensive effect of sesamin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 328-335.

**Navarro L., Bari R., Achard P., Lison P., Nemri A., Hardberd N.P. et Jones J.D.G., 2008.**

DELLAs control plant immune responses by modulating the balance between jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.*, **18**:650-655.

**Nawrath C., 2006.** Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**:281-287.

**Neumann J. et Avron M., 1967.** Oxidation of phloridzin by isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **8**:241-247.

**Newcomb R.D., Crowhurst R.N., Gleave A.P., Rikkerink E.H.A., Allan A.C., Beuning L.L., Bowen J.H., Gera E., Jamieson K.R., Janssen B.A., Laing W.A., McArtney S., Nain B., Ross G.S., Snowden K.C., Souleyre E.J.F., Walton E.F. et Yauk Y.K., 2006.** Analyse of expressed sequence tags from apple. *Plant Physiol.*, **141**:147-166.

**Ni Eidhin D.M., Murphy E. et O'Beirne D., 2006.** Polyphenol oxidase from apple (*Malus x domestica* Borkh. cv. Bramley's seedling): purification strategies and characterisation. *J. Food Sci.*, **71**:C51-C58.

**Nissinen R.M., Ytterberg A.J., Bogdanove A.J., van Wijk K.J. et Beer S.V., 2007.** Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Mol. Plant Pathol.*, **8**:55-67.

**Nitta K., Kataoka K. et Sakurai T., 2002.** Primary structure of a Japanese locuar tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases. *J. Inorg. Biochem.*, **91**:125-131.

**Noctor G. et Foyer C.H., 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249-279.

**Norelli J.L., Farrell Jr R.E., Bassett C.L., Baldo A.M., Lalli D.A., Aldwinckle H.S. et Wisniewski N.E., 2009.** Rapid transcriptional responses of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridization analysis. *Tree Genet. Genomes*, **5**:27-40.

**Numm R., Posthumus M.A. et Dicke. M., 2008.** Significance of terpenoids in indirect inducible plant defence against herbivorous arthropods. *Plant Cell Environ.*, **31**:375-385.

**Nürnbergger T., Brunner F., Kemmerling B. et Piater L., 2004.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.*, **198**:249-266.

- Oh C.-S. et Beer S.V., 2007.** AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-promoting effect of HrpN in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **145**:426-436.
- Oh C.-S., Kim J.F. et Beer S.V., 2005.** The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection. *Mol. Plant Pathol.*, **6**: 125-138
- Oh H.-S. et Collmer A., 2005.** Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. *Plant J.*, **44**:348-359.
- Oh S.-S. et Beer S.V., 2005.** Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiol. Lett.*, **253**: 185-192.
- Ono E., Hatayama M., Isono Y., Sato T., Watanabe R., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi-Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T. et Nakayama T., 2006.** Localization of a biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.*, **45**:133-143.
- Osman A.M., Wong K.K.Y. et Fernyhough A., 2007.** The laccase-ABTS system oxidizes (+)-catechin to oligomeric products. *Enz. Microb. Technol.*, **40**:1272-1279.
- Oszmianski J. et Lee C.Y., 1991.** Enzymatic oxidation of phloretin glucoside in model system. *J. Agric. Food Chem.*, **39**:1050-1052.
- Oszmianski J., Cheynier V. et Moutounet M., 1996.** Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **44**:1712-1715.
- Ou B., Hampsch-Woodill M. et Prior R.L., 2001.** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4619-4626.
- Overmyer K., Brosché M. et Kangasjärvi J., 2003.** Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.*, **8**:335-342.
- Pandey S.P. et Somssich I.E., 2009.** The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol.*, **150**:1648-1655.
- Park S.-W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S. et Klessig D.F., 2007.** Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science.*, **318**:113-116.
- Passardi F., Cosio C., Penel C. et Dunand C., 2005.** Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.*, **24**:255-265.

- Passardi F., Penel C. et Dunand C., 2004.** Performing the paradoxical : how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.*, **9**:534-540.
- Paulin J.-P. et Samson R., 1973.** Le feu bactérien en France. II. Caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., 1920, isolées du foyer franco-belge. *Ann. Phytopathol.*, **5** :389-397.
- Pauw B. et Memelink J., 2005.** Jasmonate-Responsive Gene Expression. *J. Plant Growth Regul.*, **23**:200-210.
- Pauwels L., Inzé D. et Goossens A., 2009.** Jasmonate-inducible gene : what does it mean ? *Trends Plant Sci.*, **14**:87-91.
- Pearce R.B., 1996.** Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytol.*, **132**:203-233.
- Peil A., Garcia-Libreros T., Richter K., Trognitz F.C., Trognitz B., Hanke M.-V. et Flachowski H., 2007.** Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breed.*, **126**:470-475.
- Perez-de-Luque A., Lozano M.D., Cubero J.I., Gonzalez-Melendi P., Risueno M.C. et Rubiales D., 2006.** Mucilage production during the incompatible interaction between *Orobanche crenata* and *Vicia sativa*. *J. Exp. Bot.*, **57**:931-942.
- Perino C., Gaudriault S., Vian B. et Barny M.-A., 1999.** Visualization of harpin secretion in planta during infection of apple seedling by *Erwinia amylovora*. *Cell. Microbiol.*, **1**: 131-141.
- Picinelli A., Dapena E. et Mangas J.J., 1995.** Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance: A preliminary study. *J. Agric. Food Chem.* **3**: 2273–2278.
- Pierce M.L., Cover E.C., Richardson P.E., Scholes V.E. et Esseberg M., 1996.** Adequacy of cellular phytoalexin concentrations in hypersensitively responding cotton leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **48**:305-324.
- Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., Van der Ent S. et Van Wees S.C.M., 2009.** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chem. Biol.*, **5**:308-316.
- Pollar S.E., Kuhnle G.G.C., Vauzour D., Vafeiadou K., Tzounis X., Whiteman M., Rice-Evans C. et Spencer J.P.E., 2006.** The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **350**:960-968.
- Pontais I., 2006.** Réponses moléculaires à *Erwinia amylovora* de deux génotypes de pommier sensible et résistant au feu bactérien. Thèse n°757, *Ecole Doctorale d'Angers, Angers, France.*

- Pontais I., Treutter D., Paulin J.-P. et Brisset M.-N., 2008.** *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiol. Plant.* **132**: 262-271.
- Pourcel L., Routaboul J.-M., Cheynier V., Lepiniec L. et Debeaujon I., 2006.** Flavonoid oxidation in plants : from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.*, **12**:29-36.
- Pourcel L., Routaboul J.-M., Kerhoas L., Caboche M., Lepiniec L. et Debeaujon I., 2005.** TRANSPARENT TEST10 encodes a laccase-like involved in oxidative polymerisation of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, **17**:2966-2980.
- Powell Jr. C.C. et Hildebrand D.C., 1970.** Fire blight resistance in *Pyrus*: involvement of arbutin oxidation. *Phytopathol.*, **60**:337-340.
- Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vincente J., Rodriguez M.J., Kift N., Carbonne F., Griffiths G., Esquerré-Tugayé M.-T., Rosahl S., Castresana C., Hamberg M. et Fournier J., 2005.** Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defence against pathogens. *Plant Physiol.*, **139**:1902-1913.
- Puel C., Quintin A., Mathey J., Obled C., Davicco M.J. et Lebecque P., 2005.** Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation condition. *Calcif. Tissue Int.* **77**, 311-318.
- Qiao H., Chang K.N., Yazaki J. et Ecker J.R., 2009.** Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene response in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **23**:512-521.
- Qiu J.-L., Fiil B.K., Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J., Thorgrimsen S., Palma K., Suarez-Rodriguez M.C., Sandbech-Clausen S., Lichota J., Brodersen P., Grasser K.D., Mattson O., Glazebrook J., Mundy J. et Petersen M., 2008.** *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J.*, **27**:2214-2221.
- R Development Core Team, 2008.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- Raa J. et Overeem J.C., 1968.** Transformation reactions of phloridzin in the presence of apple leaf enzymes. *Phytochemistry*, **7**: 721-731.
- Ramalingam K. et Ravindranath M.H., 1970.** Histochemical significance of green metachromasia to toluidine blue. *Histochem.*, **24**:322-327.

- Ramirez E.C. et Whitaker J.R., 1998.** Cystine lyases in plants : a comprehensive review. *J. Food Biochem.*, **22**:427-440.
- Ranocha P., Chabannes M., Chamayou S., Danoun S., Jauneau A., Boudet A.-M. et Goffner D., 2002.** Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol.*, **129**:145-155.
- Ranocha P., McDougall G., Hawkins S., Sterjiades R., Borderies G., Stewart D., Cabanes-Macheteau M., Boudet A.-M. et Goffner D., 1999.** Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar. *Eur. J. Biochem.*, **259**:485-495.
- Rathjen A.H. et Robinson S.P., 1992.** Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.*, **99**:1619-1625.
- Reddy V.P. et Beyaz A., 2006.** Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today* **11**, 646-654.
- Reidel E.J., Rennie E.A., Amiard V., Cheng L. et Turgeon R., 2009.** Phloem loading strategies in three plants species that transport sugar alcohols. *Plant Physiol.*, **149**:1601-1608.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. et Paganga G., 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, **2**: 152-159.
- Richard-Forget F.C. et Gaillard F.A., 1999.** Oxidation of chlorogenic acid, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by combinaison of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxydase: a possible involvement of peroxydase in enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, **45**:2472-2476.
- Riley P.A., 2000.** Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model for the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. *J. Theor. Biol.*, **203**:1-12.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. et Glover W., 1999.** Phenolic compounds and their implication in oxidative processes in fruit. *Food Chem.*, **66**:401-436.
- Robinson S.P. et Dry I.B., 1992.** Broad Bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic clivage. *Plant Physiol.*, **99**:317-323.
- Rocha A.M.C.N. et Morais A.M.M.B., 2001.** Characterisation of polyphenoloxidase (PPO) extracted from “Jonagored” apple. *Food Control*, **12**:85-90.
- Rocha A.M.C.N., Cano M.P., Galeazzi M.A.M. et Morais A.M.M.B., 1998.** Characterisation of “Starking” apple polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.*, **77**:527-534.

- Rodriguez-Concepcion, M., 2006.** Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem. Rev.*, **5**:1-15.
- Rosati C., Cadic A., Duron M., Renou J.-P. et Simoneau P., 1997.** Molecular cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of *Forsythia × intermedia*. *Plant Mol. Biol.*, **35**: 303-311.
- Rose P., Whiteman M., Moore P.K. et Zhy Y.Z., 2005.** Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Nat. Prod. Rep.*, **22**:351-368.
- Rudell D.R. et Mattheis J.P., 2008.** Synergism exists between ethylene and methyl jasmonate in artificial light-induced pigment enhancement of “Fuji” apple fruit peel. *Postharv. Biol. Technol.*, **47**:136-140.
- Sagi M. et Fluhr R., 2006.** Production of reactive oxygen species by plant NAPDH oxidases. *Plant Physiol.*, **141**:336-340.
- Sakihama Y., Tamaki R., Shimoji H., Ichiba T., Fukushi Y., Tahara S. et Yamasaki H., 2003.** Enzymatic nitration of phytophenolics: evidence for peroxynitrite-independent nitration of plant secondary metabolites. *FEBS Lett.*, **553**:377-380.
- Salzman R.A., Brady J.A., Finleyson S.A., Buchanan C.D., Summer E.J., Sun F., Klein P.E., Klein R.R., Pratt L.H., Cordonnier-Pratt M.-M. et Mullet J.E., 2005.** Transcriptional profiling of Sorghum induced by methyljasmonate, salicylic acid and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. *Plant Physiol.*, **138**:352-368.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. et Saura-Calixto F., 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* **76**, 270-276.
- Sarapuu L.P., 1971.** Oxidation and condensation of phloridzin in apple tree tissues. *Biokhimiya*, **36**: 343-353.
- Sarapuu L. et Kheinaru E., 1971.** Oxidation of phloridzin by o-diphenol oxidase in apple buds. *Biokhimiya*, **36**: 8-17.
- Sasaki K., Mito K., Ohara K., Yamamoto H. et Yazaki K., 2008.** Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol.*, **146**:1075-1084.

- Scarpeci T.E., Zanol M.I., Carillo N., Mueller-Roeber B. et Valle E.M., 2008.** Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Mol. Biol.*, **66**: 361-368.
- Schuller D.J., Ban N., van Huystee R.B., MacPherson A. et Poulos T.M., 1996.** The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, **4**:311-321.
- Schweizer P., Felix G., Buchala A., Müller C. et Métraux J.-P., 1996.** Perception of free cutin monomers by plant cells. *Plant J.*, **10**:331-341.
- Seemüller E.A. et Beer S.V., 1976.** Absence of cell wall polysaccharide degradation by *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.*, **66**:433-436.
- Selinheimo E., Ni Eidhin D., Steffensen C., Nielsen J., Lomascolo A., Halaoui S., Record B., O'Beirne D., Buchert J. et Kruus K., 2007.** Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J. Biotech.*, **130**:471-480.
- Seo S., Seto H., Koshino H., Yoshida S. et Ohashi Y., 2003.** A diterpene as an endogenous signal for the activation of defence responses to infection with tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. *Plant Cell*, **15**:863-873.
- Serino G. et Deng X.-W., 2003.** The COP9 signalosome : regulating plant development through the control of proteolysis. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **54**:165-182.
- Shah J., 2003.** The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**:365-371.
- Shah J., Kachroo P., Nandi A. et Klessig D.F., 2001.** A recessive mutation in the *Arabidopsis* SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J.*, **25**:563-574.
- Shao, X., Bai, N., He, K., Ho, C.-T., Yang, C.S., Sang et S., 2008.** Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 2042-2050.
- Sharma O.P. et Bhat T.K., 2009.** DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* **113**, 1202-1205.
- Sharma O.P., Bhat T.K. et Singh B., 1998.** Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *J. Chromato. A*, **822**:167-171.
- Shibuya N. et Minami E., 2001.** Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **59**:223-233.

- Singh K.B., Foley R.C. et Onate-Sanchez L., 2002.** Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**:430-436.
- Singh R., Barden A., Mori T. et Beilin L., 2001.** Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129-146.
- Smale B.C. et Keil H.L., 1966.** A biochemical study of the intervarietal resistance of *Pyrus communis* to fire blight. *Phytochem.*, **5**:1123-1120.
- Sokolenko A., Fulgosi H., Gal A., Altschmied L., Ohad I. et Herrmann R.G., 1995.** The 64 kDa polypeptide of spinach may not be the LHCII kinase, but a lumen-located polyphenol oxidase. *FEBS Lett.*, **371**:176-180.
- Solano R., Stepanova A., Chao Q. et Ecker J.R., 1998.** Nuclear events in ethylene signaling : a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE RESPONSE FACTOR1. *Genes Dev.*, **12**:3703-3714.
- Sparg S.G., Light M.E. et van Staden J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.*, **94**:219-243.
- Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M.C., Korzelius J.P., Van Pelt J.A., Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J.-P., Brown R., Kazan K., Van Loon L.C., Dong X. et Pieterse C.M.J., 2003.** NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependant defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, **15**:760-770.
- Spoel S.H., Mou Z., Tada Y., Spivey N.W., Genschik P. et Dong X., 2009.** Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, **137**:860-872.
- Staswick P.E. et Tiryaki I., 2004.** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**:2117-2127.
- Steffens B. et Sauter M., 2009.** Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through an autoamplified signal pathway. *Plant Cell*, **21**:184-196.
- Steiner U., Schliemann W., Böhm H. et Strack D., 1999.** Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, **208**:114-124.
- Stepanova A.N. et Alonso J.M., 2009.** Ethylene signaling and responses : where different regulatory modules meet. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**:1-8.
- Stracke R., Ishihara H., Huep G., Barsch A., Mehrtens F., Niehaus K., Weisshaar B., 2007.** Differential regulation of closely regulated R2R3-MYB transcription factors controls

- flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.*, **50**:660-677.
- Strissel T., Halbwirth H., Hoyer U., Zistler C., Stich K. et Treutter D., 2005.** Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biol.*, **7**:677-685.
- Subramanian S., Stacey G. et Yu O., 2007.** Distinct, crucial roles of flavonoid during legume nodulation. *Trends Plant Sci.*, **12**:282-285.
- Suh M.C., Samuels A.L., Jetter R., Kunst L., Pollard M., Ohlrogge J. et Beisson F., 2005.** Cuticular lipid composition, surface structure and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermidis. *Plant Physiol.*, **139**:1649-1665.
- Suh M.C., Yi S.Y., Lee S., Sim W.-S., Pai H.S. et Choi D., 2001.** Pathogen-induced expression of plant ATP:citrate lyase. *FEBS Lett.*, **488**:211-212.
- Suhayda C.G. et Goodman R.N., 1981a.** Infection courts and systemic movement of 32P-labeled *Erwinia amylovora* in apple petioles and stems. *Phytopathol.*, **71**:656-60.
- Suhayda C.G. et Goodman R.N., 1981b.** Early proliferation and migration and subsequent xylem occlusion by *Erwinia amylovora* and the fate of its extracellular (EPS) in apple shoots. *Phytopathology*, **71**:697-707.
- Suleman P. et Steiner P.W., 1994.** Relationship between sorbitol and solute potential in apple shoots relative to fire blight symptom development after infection by *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.*, **84**:1244-1250.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J., 2009.** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **113**, 1226-1233.
- Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J. et Dong X., 2008.** Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, **321**:952-955.
- Taguri T., Tanaka T. et Ikouno I., 2004.** Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**:1965-1969.
- Takahama U., 2004.** Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochem. Rev.*, **3**:207-219.
- Taki N., Sasaki-Sekimoto Y., Obayashi T., Kikuta A., Kobayashi K., Aina T., Yagi K., Sakurai N., Suzuki H., Masuda T., Takamiya K.-I., Shibata D., Kobayashi Y. et Ohta H., 2005.**

- 12-oxophytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **139**:1268-1283.
- Tanaka T., Uehara R., Nishida K. et Kouno I., 2005.** Galloyl, caffeoyl and hexahydroxydiphenoyl esters of dihydrochalcone glucosides from *Balanophora tobiracola*. *Phytochem.*, **66**: 675-681.
- Tanaka Y., 2006.** Flower colour and cytochrome P450. *Phytochem Rev.*, **5**:283-291.
- Tao Y., Xie Z., Chen W., Glazebrook J., Chang H.-S., Han B., Zhu T., Zou G. et Katagiri F., 2003.** Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, **15**:317-330.
- Tharaud M., Menggad M., Paulin J.-P. et Laurent J., 1994.** Virulence, growth and surface characteristics of *Erwinia amylovora* with altered pathogenicity. *Microbiol.*, **140**:659-669.
- Théodoulou F.L., Job K., Slocombe S.P., Footitt S., Holdsworth M., Baker A., Larson T.R. et Graham I.A., 2005.** Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-Binding Cassette transporter mutants. Implication for transport of jasmonate precursors into peroxisome. *Plant Physiol.*, **137**:835-840.
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A. et Browse J., 2007.** JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COI1</sup> complex during jasmonate signalling. *Nature*, **448**:661-666.
- Thipyapong P., Hunt M.D. et Steffens J.C., 2004.** Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced susceptibility. *Planta*, **220**:105-117.
- Thipyapong P., Joel D.M. et Steffens J.C., 1997.** Differential expression and turnover of tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiol.*, **113**:707-718.
- Thipyapong P., Stout M.J. et Attajarusit J., 2007.** Functional analysis of polyphenol oxidases by antisens/sens technology. *Molecules*, **12**:1569-1595.
- Thomson S.V., 2000.** Epidemiology of fire blight. In: Vanneste J, ed. *Fire Blight: the Disease and its Causative Agent Erwinia amylovora*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 9-36.
- Thornalley P.J., Langborg A. et Minhas H.S., 1999.** Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of protein by glucose. *Biochem. J.*, **344**: 109-116.
- Thygesen P.W., Dry I.B. et Robinson S.P., 1995.** Polyphenol oxidase in Potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.*, **109**:525-531.

- Treutter D., 2001.** Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul*, **34**, 71-89.
- Treutter, D., 2006.** Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* **4**:147-157.
- Ullrich R. et Hofrichter M., 2007.** Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**:271-293.
- Uppapalati S.R., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel B.N., Anand A., Mysore K.S. et Bender C.L., 2007.** The phytotoxine coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **20**:955-965.
- Valentines M.C., Vilaplana R., Torres R., Usall J. et Larrigaudière C., 2005.** Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biol. Technol.*, **36**:227-234.
- Valsangiacomo C. et Gessler C., 1988.** Role of the cuticular membrane in ontogenic and Vf-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Phytopathol.*, **78**:106-1069.
- Van Breusegem F. et Dat J.F., 2006.** Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.*, **141**:384-390.
- Van den Burg H.A. et Takken F.L.W., 2009.** Does chromatin remodelling mark systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.*, **14**:286-294.
- Van Kan J.A.L., 2006.** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.*, **11**:247-253.
- Van Loon L.C., Geraats B.P.J. et Linthorst H.J.M., 2006.** Ethylene as a modulator in disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, **11**:1360-1385.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. et Speleman F., 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**:research0034.1-0034.11.
- Venisse J.-S., Barny M.-A., Paulin J.-P. et Brisset M.-N., 2003.** Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. *FEBS Lett.*, **537**:198-202.
- Venisse J.-S., Gullner G. et Brisset M.-N., 2001.** Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.*, **125**:2164-2172.

- Venisse J.-S., Malnoy M., Faize M., Paulin J.-P. et Brisset M.-N., 2002.** Modulation of defense responses of *Malus* spp. During compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **15**:1204-1212.
- Venugopal S.C., Jeong R.-D., Mandal M.K., Zhu S., Chandra-Shekara A.C., Xia Y., Hersh M., Stromberg A.J., Navarre D., Kachroo A. et Kachroo P., 2009.** Enhanced Disease Susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. *PLoS Genet.* **5**(7), e1000545, doi:10.1371/journal.pgen.1000545.
- Vergne E., Sourice S., Dupuis F., Loridon K., Dugé de Bernonville T., Brisset M.N. et Chevreau E. 2009.** Characterization of transgenic apples expressing the HrpN gene. *Acta Hort. (ISHS)* **839**:637-644.
- Veronese P., Ruiz M.T., Coca M.A., Hernandez-Lopez A., Lee H., Ibeas J.I., Damsz B., Pardo J.M., Hasegawa P.M., Bressan R.A. et Narasimhan M.L., 2003.** In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol.*, **131**:1580-1590.
- Vinson J.A. et Howard III T.B., 1996.** Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.* **7**: 659-663.
- Vlot A.C., Klessig D.F. et Park S.-W., 2008.** Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**:436-442.
- Vom Endt D., Kijne J.W. et Memelink J., 2002.** Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochem.*, **61**:107-114.
- Wahler D., Schulze Gronover C., Richter C., Foucu F., Twyman R.M., Moerschbacher B.M., Fischer R., Muth J. et Prüfer D., 2009.** Polyphenol oxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. *Plant Physiol.*, **151**:334-346.
- Walton J.D., 1994.** Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.*, **104**:1113-1118.
- Wang K.L.C., Yoshida H., Lurin C. et Ecker J.R., 2004.** Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* protein ETO1. *Nature*, **428**:945-950.
- Wang D., Amornsiripanitch N. et Dong X., 2006.** A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.*, **2**: e123. doi:10.1371/journal.ppat.0020123.
- Wasternack C., 2007.** Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.*, **100**:681-697.

- Wei Z.-M., Kim J.F. et Beer S.V., 2000.** Regulation of hrp genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system and HrpS. *Mol. Plant Microbe Interact.* : **13**: 1251-1262.
- Wei Z.-M., Laby R.J., Zumoff C.H., Bauer D.W., He S.-Y., Collmer A. et Beer S.V., 1992.** Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**: 85-88.
- Wendehenne D., Durner F. et Klessig D.F., 2004.** Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**:449-454.
- Wiermer M., Feys B.J. et Parker J.E., 2005.** Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr. Opin. Plant Biol.*: **8**:383-389.
- Wilcox C.S. et Pearlman A., 2008.** Chemistry and hypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharm. Rev.* **60**: 418-469.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G. et Ausubel F.M., 2001.** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**:562-565.
- Williams A.H., 1964.** Dihydrochalcones; their occurrence and use as indicators in plant chemical taxonomy. *Nature*, **202**: 824-825.
- Williams C.A. et Grayer R.J., 2004.** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, **21**:539-573.
- Winkel-Shirley B., 2001.** Flavonoid biosynthesis. A colourful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.*, **126**:485-493.
- Wojdylo A., Oszmianski J. et Laskowski, P., 2008.** Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 6520-6530.
- Wong J. et Constabel C.P., 2004.** Polyphenol oxydase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory to forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, **220**:87-96.
- Xiao F., Goodwin S.M., Xiao Y., Sun Z., Baker D., Tang X., Jenks M.A. et Zhou J.-M., 2004.** *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticles development. *EMBO J.*, **23**:2903-2913.
- Xie D.Y. et Dixon R.A., 2005.** Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions to answer ? *Phytochem.* **66**:2127-2144.
- Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W.L., Ma H., Peng W., Huang D. et Xie D., 2002.** The SCFCO11 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**:1919-1935.

- Xu M. et Korban S.S., 2002.** A cluster of four receptor-like genes in the Vf Locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics*, **162**:1995-2006.
- Yamasaki H., Sakihama Y. et Ikehara N., 1997.** Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol.*, **115**:1405-1412.
- Yang S., Peng Q., San Francisco M., Wang Y., Zeng Q. et Yang C.-H., 2008.** Type III secretion system genes of *Dickeya dadantii* 3937 are induced by plant phenolic acids. *PLoS One*, **3**: e2973. doi:10.1371/journal.pone.0002973.
- Ye Z.-H., York W.S. et Darvill A.G., 2006.** Important new players in secondary wall synthesis. *Trends Plant Sci.*, **11**:162-164.
- Yeung K.Y. et Ruzzo W.L., 2001.** Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics*, **17**:763-774.
- Yu F. et Utsumi R., 2009.** Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**:3043-3052.
- Yu O. et Jez J.M., 2008.** Nature's assembly line : biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant J.*, **54**:750-762.
- Zarate S.I., Kempema L.A. et Walling L.L., 2007.** Silverleaf whitefly induces salicylic acid defences and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol.*, **143**:886-875.
- Zhang H.-Y., Yang D.-P. et Tang G.-Y., 2006.** Multipotent antioxidants: from screening to design. *Drug Discovery Today* **15/16**, 749-754.
- Zhang Q., Ames J.M., Smith R.D., Baynes J.W. et Metz T.O., 2009.** A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J. Proteome Res.* **8**, 755-769.
- Zhao Y., He S.-Y. et Sundin G.W., 2006.** The *Erwinia amylovora* avrRpt2<sub>Ea</sub> gene contributes to virulence on pear and AvrRpt2<sub>Ea</sub> is recognized by *Arabidopsis* RPS2 when expressed in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **19**: 644-654.
- Zipfel C., 2009.** Early events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**:414-420.
- Zou J., Rodriguez-Zas S., Aldea M., Li M., Zhu J., Gonzalez D.O., Vodkin L.O., DeLucia E. et Clough S.J., 2005.** Expression profiling soybean responses to *Pseudomonas syringae* reveals new defence-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **28**:1165-1175.

**Dihydrochalcones: implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-product and vasoconstriction**

Thomas Dugé de Bernonville <sup>a</sup>, Sylvain Guyot <sup>b</sup>, Jean-Pierre Paulin <sup>a</sup>, Matthieu Gaucher <sup>a</sup>, Laurent Loufrani <sup>c</sup>, Daniel Henrion <sup>c</sup>, Séverine Derbré <sup>d</sup>, David Guilet <sup>d</sup>, Pascal Richomme <sup>d</sup>, James F. Dat <sup>a</sup>, Marie-Noëlle Brisset <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR077 INRA/Agrocampus Ouest/Université d'Angers, IFR149, F-49071 Angers, France

<sup>b</sup> UR117 INRA, F-35650 Rennes, France

<sup>c</sup> UMR CNRS 6214/INSERM 771 Faculté de Médecine, F-49045 Angers, France

<sup>d</sup> UPRES EA129, IFR149, Université d'Angers F-49100 Angers, France

\* Corresponding author. Address: UMR077 PaVé, INRA Site d'Angers, 42 rue Georges Morel, BP 60057, F-49071 Beaucouzé, France. Tel.: (33)-2-41-22-57-13; fax: (33)-2-41-22-57-05.

*E-mail address:* [brisset@angers.inra.fr](mailto:brisset@angers.inra.fr)

## Abstract

Flavonoids are a group of polyphenol compounds with known antioxidant activities. Among them, dihydrochalcones are mainly found in apple leaves (*Malus domestica*). Glycosylated dihydrochalcones were previously found in large amounts in leaves of two genotypes of *Malus* with contrasting resistance to fire blight which is caused by *Erwinia amylovora*. In the present study we demonstrate that soluble polyphenol patterns comprised phloridzin alone or in combination with two additional dihydrochalcones, identified as sieboldin and trilobatin. Presence of sieboldin in young leaves correlated well with a high 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. Moreover, these leaves displayed enhanced tolerance to paraquat, a photooxidative-stress generating herbicide. Interestingly, phloridzin had a high activity in the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, but its presence alone in leaves did not correlate with tolerance to paraquat. In order to further characterise the activity of these compounds, we tested their ability to prevent oxidative-dependent formation of advanced glycation end-products (AGEs) and phenylephrine-induced contraction of isolated rat mesenteric arteries. The antioxidant capacity of sieboldin was clearly demonstrated by showing that this compound (i) prevented vasoconstriction and (ii) inhibited AGEs formation. Both assays provided interesting information concerning a potential use of sieboldin as a therapeutic. Hence, our results strongly argue for a bioactivity of dihydrochalcones as functional antioxidants in the resistance of *Malus* leaves to oxidative stress. In addition, we demonstrate for the first time that sieboldin is a powerful multipotent antioxidant, effective in preventing physiopathological processes. Further work should aim at demonstrating the potential use of this compound as a therapeutic in treating free radical-involving diseases.

*Keywords:* *Malus domestica*; *Rosaceae*; Antioxidant; Phenylephrine; AGEs; Flavonoids; Dihydrochalcones; Sieboldin; Phloridzin; Trilobatin

## 1. Introduction

Numerous flavonoids are well-known potent antioxidants, effective in trapping free radicals, and may thus participate in overall plant cell redox homeostasis in plants (Rice-Evans et al., 1997; Heim et al., 2000; Hernandez et al., 2008). In apple trees, the major sub-family of flavonoids is represented by dihydrochalcones, which are found in large amounts (up to 5% of dry weight) in leaves and in immature fruits (Hunter and Hull, 1993; Treutter, 2001; Pontais et al., 2008). Although they were thought for a long time to be exclusive of *Malus* sp., dihydrochalcones have been reported in several other genera like *Balanophora* (Tanaka et al., 2005), *Fragaria* (Hilt et al., 2003) and *Symplocos* (Ling et al., 2004). Among known dihydrochalcones, phloridzin and its aglycone, phloretin, are simple forms (Williams, 1964) and their biosynthesis in *Malus* has recently been deciphered (Judgé et al., 2008; Gosch et al., 2009). However, their function *in planta* remains unresolved. They have been hypothesised to act as UV filters in leaves (Treutter, 2006) and a role in resistance to pathogens has been suggested (Hunter, 1975; Picinelli et al., 1995; Pontais et al., 2008).

Antioxidant activity of some dihydrochalcones has been reported, but most studies on *Malus* antioxidants focused on apple fruits and not leaves (Lu and Foo, 2000; Lee et al., 2003; Khanizadeh et al., 2008; Wojdylo et al., 2008). Interestingly, phloridzin has been widely studied in the animal field notably for its effects on various diseases, notably diabetes (Ehrenkranz et al., 2005). Phloridzin was demonstrated to inhibit glucose intestinal absorption and renal resorption, resulting in normalisation of blood glucose and overall diminution of glycaemia in animal models (Ehrenkranz et al., 2005). Phloridzin and phloretin are also effective in preventing bone resorption in an ovariectomized rat model with chronic inflammation due to their phytoestrogenic, antioxidant and putative anti-inflammatory

activities (Puel et al., 2005). Thus these data show that some of those compounds have interesting bioactivities *in vitro* and *in vivo*.

Here, we report the detection, identification, quantification and characterisation of major dihydrochalcones from leaves of two apple genotypes, using both the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) *in vitro* assays. Two additional tests relying on ROS-dependent mechanisms, i.e., inhibition of the formation of advanced glycation end-products (AGEs) and antioxidant-dependant vasorelaxant activity on isolated rat mesenteric arteries were performed to validate the antioxidant bioactivities. Because AGEs and hypertension participate, among other pathologies, in complications linked to diabetes, like atherosclerosis and nephropathy (Singh et al., 2001), both assays also provided information concerning potential therapeutic use. Phloridzin was detected in both *Malus* genotypes, whereas trilobatin and sieboldin were found in the leaves of only one of the genotypes. We found that sieboldin was very efficient in the DPPH radical scavenging assay and that its presence in apple leaves correlated well with tolerance to photooxidative stress. Sieboldin was also very active in inhibiting AGE formation and preventing phenylephrine-induced contraction of isolated mesenteric artery segments. Hence, we (i) provide evidence for the complementary activities of sieboldin and phloridzin in tolerance to oxidative stress in *Malus* leaves and (ii) demonstrate that sieboldin should be considered for further investigations on animal models concerning potential anti-AGE and anti-hypertensive activities.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Leaf flavonoid profiles

Our initial aim was to identify phenolic compounds in leaves of two genotypes (MM106 and Evereste) displaying contrasted susceptibilities to fire blight. As previously described in the literature (Hunter and Hull, 1993; Treutter, 2001; Pontais et al., 2008), *Malus* young leaves contained high levels of dihydrochalcones (Fig. 1 and 2). Polyphenol leaf patterns of both genotypes predominantly displayed either one or three major peaks (Fig. 1A and 1B). Peak **2** retention time ( $R_t = 26.85$  min) coincides with an authentic standard of phloridzin which was confirmed with its mass spectrum giving a quasi-molecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z = 435$  and a fragment ion at  $m/z = 273$  corresponding to the loss of the glucose moiety ( $[M-163]^-$ ; Fig. 1E). This compound was common to both genotypes. Evereste leaves displayed two other peaks (Fig. 1A). Peak **1** with  $R_t = 24.95$  min and with a pseudo molecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z = 451$  could be attributed to a hydroxylated form of phloridzin (Fig. 1D). Peak **3** with  $R_t = 28.30$  min and with  $[M-H]^-$  at  $m/z = 435$ , the same pseudomolecular ion than for phloridzin, was attributed to an isomer of phloridzin (Fig. 1E). A minor peak at  $R_t = 23.93$  was also observed and showed a  $[M-H]^-$  ion at  $m/z = 289$  which is in accordance with a hydroxylated form of phloretin. Other very minor compounds were also detected showing pseudomolecular ions in accordance to the loss of two hydrogen atoms in comparison with the  $m/z$  of major compounds. This suggested that they probably were oxidation products of major compounds or other chalcones. However, unlike Pontais et al. (2008) who detected phloretin in lyophilized leaves, phloretin was only detected as trace in the present study. This can probably be explained by the fact that we used fresh leaves for the analysis, preventing the ectopic conversion of phloridzin to its aglycone phloretin. As in the present study, we had previously identified other flavonoids like flavanols but in very small amounts (Pontais et al.

2008). This is in agreement with the fact that they are preferentially accumulated in mature apple fruits (Khanizadeh et al., 2008; Wojdylo et al., 2008).

Compound **1**, **2** and **3** were then isolated as described in the Experimental and the yield was around 60% for each compound (600 mg of purified sieboldin from 10 gram of leaf dry weight). Their chemical structures were determined by means of spectroscopic analysis including 1D and 2D  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, using the assignments of previously identified dihydrochalcones (Hilt et al., 2003; Ling et al., 2004). As described above, **2** exhibited a pseudo-molecular ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  at  $m/z = 435$  which could be associated to the molecular formula  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ . It was then readily identified as phloridzin through  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis and comparison with literature data (Hilt et al., 2003). Compound **3** shared the same molecular formula with **2** but its  $^1\text{H}$  NMR spectrum clearly revealed a different substitution pattern at ring A of the aglycon moiety (phloretin). Indeed H-5' and H-3' appeared as a singlet (2H), pointing to an *O*-glycosylation at C-4'. This was confirmed after close inspection of the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **3** (Table 1) together with extensive HMBC correlation analysis. Therefore **3** was identified as trilobatin or phloretin-4'-*O*-glucoside (Ling et al., 2004). By comparison to **2** and **3**, the pseudo-molecular ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  of compound **1** was shifted up to  $m/z = 451$  (+16 u) suggesting the presence of an additional hydroxyl group in the molecule. In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **1**, the aromatic protons of ring A were characterized as an ABX system of spins at  $\delta_{\text{H}}$  6.39 (1H, *d*,  $J = 2.0$  Hz), 6.33 (1H, *d*,  $J = 8.5$  Hz) and 6.51 ppm (1H, *dd*,  $J = 8.5, 2.0$  Hz) respectively. Peak **1** was thus supposed to be the 3-OH derivative of trilobatin (**3**) i.e. sieboldin or 3-hydroxyphloretin-4'-*O*-glucoside (Ling et al., 2004), and again this was confirmed through  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 1) and HMBC correlation analysis. All chemical structures are indicated on Fig. 1C. The phloridzin biosynthetic pathway has recently been deciphered (Judgé et al., 2008; Gosch et al., 2009) but the detection of sieboldin and trilobatin at high constitutive levels raises the possibility for new enzymatic steps in

*Malus*. Trilobatin may originate from the isomerisation of phloridzin or specific glucosylation of phloretin and sieboldin from cresolase-catalysed oxidation of trilobatin B-ring. Alternatively, sieboldin may be formed after chalcone synthase-catalysed extension of caffeic acid, with subsequent 4'-*O*-glucosylation.

Although phenolic compositions were qualitatively very similar between the two leaf stages in a same genotype, dihydrochalcones in mature leaves were quantitatively somewhat different from young leaves (Fig. 1 and 2). Indeed, total soluble polyphenol content in younger leaves, calculated as the sum of all compounds isolated (for detail see Experimental), was higher than that of mature leaves, in particular in MM106 for which young leaves contained as much as three times more phloridzin than in mature ones (Fig. 2). In addition, the quantification of each compound confirmed that there is no major difference in total dihydrochalcone content between the two genotypes, as previously shown (Pontais et al., 2008). Phloridzin represents more than 95% of the dihydrochalcones present in MM106 leaves but in Evereste, the same concentration of dihydrochalcones is distributed into three compounds, sieboldin, phloridzin and trilobatin (Fig. 2). Both trilobatin and sieboldin were identified in other *Malus* species in previous studies (Williams, 1964; Hunter, 1975). However, their antioxidant capacities and bioactivities have never been investigated so far. The DPPH scavenging capacity, which evaluate general radical antioxidant activity (Sharma and Baht, 2009), and the ORAC assays, which tests hydrophilic chain-breaking antioxidant capacity against peroxy radicals (Ou et al., 2001), were thus performed on pure compounds.

## 2.2. Antioxidant activities of purified dihydrochalcones isolated from leaves

In order to determine if the soluble polyphenols may participate significantly to overall antioxidant potential, we performed both DPPH scavenging and ORAC assays on purified compounds, as shown in Fig. 3. We also included phloretin, the aglycone of phloridzin, to

determine which pharmacophores may influence antioxidant potential. The two assays gave different results. Sieboldin appeared to be the most efficient dihydrochalcone in reducing DPPH, both through a high Trolox equivalent activity (3  $\mu\text{mol}$  of Trolox per  $\mu\text{mol}$  of sieboldin, i.e. more than 10-fold that of other dihydrochalcones) and almost immediate reduction of DPPH. Phloridzin displayed the weakest activity with this assay and no significant difference was observed with phloretin or trilobatin. Both were nevertheless two-fold more active than phloridzin. In addition, the kinetics of DPPH reduction by these compounds was slow as they reduced less than 50% of initial DPPH in 40 minutes. By contrast, phloridzin was the strongest tested dihydrochalcone for the ORAC assay (15  $\mu\text{mol}$  of Trolox/ $\mu\text{mol}$  of compound) and phloretin the weaker (5  $\mu\text{mol}$  of Trolox/ $\mu\text{mol}$  of compound). Sieboldin and trilobatin were intermediates between these two other dihydrochalcones (10  $\mu\text{mol}$  of Trolox/ $\mu\text{mol}$  of compound). Two other well-known plant antioxidants were tested as references, under the same conditions, glutathione and ascorbic acid (Noctor and Foyer, 1998). These two antioxidants displayed a low activity in both assays. This is probably due to the fact that these two compounds are not regenerated *in vitro*, unlike *in vivo* where their regeneration is achieved by specific enzymes, i.e. dehydroascorbate reductase, monodehydroascorbate and glutathione reductase (Hernandez et al., 2008). However, the kinetic of DPPH reduction by ascorbic acid was similar to sieboldin. Dihydrochalcones from *Malus* leaves may thus be classified differentially depending on the antioxidant assay: phloridzin > sieboldin > trilobatin > phloretin for the ORAC assay and sieboldin > phloretin = trilobatin = phloridzin for the DPPH assay. In a recent study, diverse dihydrochalcones were shown to have different DPPH radical scavenging capacities and to inhibit lipid peroxidation more efficiently than their flavanone analogs (Nakamura et al., 2003). Furthermore, phloridzin was shown to have a relatively low antioxidant activity in comparison with other apple polyphenols but was however a little more efficient than vitamin

C in scavenging superoxide anion (Lu and Foo, 2000). These data are in accordance with our results showing that certain dihydrochalcones, such as phloridzin and sieboldin, have a high and somewhat specific antioxidant potential.

### *2.3. Antioxidant activities of leaves of the two Malus genotypes*

#### *2.3.1. Antioxidant activities of leaf extracts*

Antioxidant potential determined by both the ORAC and DPPH radical scavenging assays for two leaf ages (young and mature) and both genotypes are shown in Fig. 4. In the DPPH radical scavenging assay, Evereste young leaf extracts displayed the highest activity which was 5-fold higher than that from MM106 extracts, which had a very weak activity. Evereste mature leaf extract activity in the DPPH assay was intermediate. Different results were obtained with the ORAC assay. Indeed, young and mature Evereste leaf extracts and MM106 mature leaf extracts exhibited similar values (500  $\mu\text{mol}$  of Trolox per gram of fresh weight), which were much weaker than those of MM106 young leaves (more than 1000  $\mu\text{mol}$  of Trolox per gram of fresh weight).

Although the sum of antioxidant activity of individual compounds does not perfectly match the total antioxidant activity in leaves (Fig. 3D and 4), a strong correlation exists between antioxidant activity of each compound, leaf content and measured total leaf antioxidant activity. Indeed, theoretical calculations revealed that the major dihydrochalcones isolated represented up to 70% to 140% of total measured antioxidant activity in young leaves with the two tests (Fig. 3D). For example, total activity calculations based on major dihydrochalcone concentrations in Evereste young leaves and antioxidant activity gave a DPPH radical scavenging activity of 170  $\mu\text{mol}$  of Trolox per gram of fresh weight, whereas the experimentally measured activity of extracts from Evereste young leaves was 250  $\mu\text{mol}$  of Trolox per gram of fresh weight with this test. Phloridzin is in very high amounts in MM106

and participates in whole leaves oxygen radical absorbance capacity, as shown in Fig. 3D, calculated antioxidant activity and experimentally measured activity being similar (1700  $\mu\text{mol}$  of Trolox per gram of fresh weight). Furthermore, Evereste leaves have smaller amounts of phloridzin and two other dihydrochalcones, trilobatin and sieboldin, the latter displaying a very strong activity in the DPPH assay. Its presence is strongly correlated with leaf extract total antioxidant capacity measured with this assay. Furthermore, lower amounts of phloridzin in Evereste young leaves correlated well with the weaker ORAC values than those determined in MM106. However, it should be noted that total antioxidant activity in leaves may also include other enzymatic antioxidants such as superoxide dismutase, catalase and peroxidase.

### *2.3.2. Protection against paraquat-induced oxidative stress*

Paraquat is a herbicide known to be a potent photooxidant that blocks photosystem I and enhances ROS production leading to cell death (Donahue et al., 1997). The effect of paraquat-derived oxidative stress may be monitored *in vitro* by measuring the conductivity of the bathing media surrounding paraquat-infiltrated leaf discs. We hypothesized that a high constitutive antioxidant capacity may prevent or block this oxidative cell death. As the young leaves of both Evereste and MM106 have specific polyphenol compositions (Fig. 1) and antioxidant capacities (Fig. 4), leaf discs from both genotypes may display different susceptibility to the herbicide. The conductivity of the incubating medium containing Evereste and MM106 young leaf discs pre-infiltrated with paraquat is shown in Fig. 5. The ten discs used for this purpose represented about 2.5 mg of total dihydrochalcones in both genotypes, i.e. about 6  $\mu\text{mol}$  of phloridzin equivalents (based on the data from Fig. 2). Electrolyte leakage from MM106 leaf tissues infiltrated with paraquat increased faster than that of Evereste, for the highest concentrations tested (10 and 100  $\mu\text{M}$ ). Maximal electrolyte

leakage of MM106 leaf tissues was obtained in less than 5 and 15 h for paraquat at 100 and 10  $\mu$ M respectively, versus 12 and 20 h for Evereste at the same concentrations. The lower concentration of paraquat (1  $\mu$ M) was ineffective on Evereste leaf discs while it still induced a progressive increase in electrolyte leakage from MM106 tissues (Fig. 5). As a consequence, Evereste young leaves are less sensitive to paraquat-derived oxidative stress than those of MM106. These results clearly show a strong difference in the constitutive antioxidant potential of both genotypes.

The high DPPH scavenging ability of young Evereste leaves, together with the presence of sieboldin, correlates well with tolerance to photooxidative stress, whereas high ORAC activity of MM106 and the presence of high amounts of phloridzin did not. Tabart et al. (2009) have recently shown that different antioxidant assays are not necessarily correlated for the same compound. In our study, results obtained for sieboldin and phloridzin clearly illustrate this and they highlight the necessity to use several antioxidant assays and even then the interpretation regarding the biological significance of the measured activity remains limited (Huang et al., 2005). However, in our case, the values obtained with the DPPH assay correlated strongly with those of the paraquat bioassay, which involves superoxide anion scavenging (Donahue et al., 1997).

In order to further characterize the two dihydrochalcones with the highest antioxidant potential, i.e. sieboldin and phloridzin, and test the significance of our results obtained with both the ORAC and DPPH assays, we tested the ability of phloridzin and sieboldin (i) to antagonize phenylephrine-induced vasoconstriction on isolated rat mesenteric arteries and (ii) to inhibit the Maillard reaction leading to the formation of advanced glycation end-products.

#### *2.4. Dihydrochalcone bioactivity*

#### 2.4.1. Vasorelaxant activity on isolated rat mesenteric arteries

The resistance of arteries controls the blood flow to the tissues through their ability to adapt their diameter in response to pressure and flow. Artery contraction may be achieved through NADPH oxidase-dependent formation of superoxide anion (Luscher et al., 1992; Alvarez et al., 2008). This superoxide anion-induced constriction may thus be prevented by biologically active antioxidant compounds. We therefore used phenylephrine on isolated rat mesenteric artery segments to provoke superoxide anion-dependant and endothelium-independent constriction of smooth muscle cells and, test the ability of isolated dihydrochalcones to counteract this process (Alvarez et al., 2008). This assay was previously used to demonstrate the vasorelaxant properties of green tea derivatives of catechin (Huang et al., 1998). As shown in Fig. 6,  $5 \times 10^{-5}$  M phenylephrine induced contraction of rat mesenteric arteries (mock). This contraction could not be prevented by a preincubation with  $10^{-5}$  M phloridzin but a 50% decrease in contraction was obtained with preincubation with sieboldin at the same concentration (corresponding to a final quantity of 50 nmol in the vessel, a quantity found in approximately 1 mg of fresh leaf tissue). Both apocynin (a NADPH oxidase inhibitor) and tempol (a superoxide dismutase mimetic; Wilcox and Pearlman, 2008) were more efficient than the two dihydrochalcones. Cumulative concentration-response curves with sieboldin and phloridzin on pre-contracted arteries (phenylephrine  $10^{-6}$  M) did not show any effect of these compounds (data not shown). Although activation of NO synthase or other relaxing factors cannot be excluded, the strong *in vitro* radical scavenging activity of sieboldin (Fig. 5) suggests it can efficiently trap superoxide anion in an *ex vivo* model. However, as phloridzin is rapidly converted in its aglycone *in vivo* and excreted in the urine (Ehrenkranz et al., 2005), the concentration of sieboldin used here might be relevant *in vivo* only in prolonged administration. Sesamin, a lignan found in sesame seeds and oil, is active *in vivo* in preventing hypertension. It is rapidly converted to other metabolites in liver and plasma

concentrations of sesamin are about 0.2  $\mu\text{mol/l}$  (Nakano et al., 2006). At this concentration, sieboldin might not be active enough to produce physiological effects, but its action would be greatly dependent on its bioavailability and metabolism.

#### *2.4.2. Inhibition of the formation of advanced glycation end products (AGEs)*

A protocol adapted from Vinson and Howard (1996) was used to test the capacity of phloridzin and sieboldin to inhibit AGE formation, in comparison to standard antioxidants ascorbic acid, glutathione, Trolox and anti-AGE aminoguanidine. The Maillard reaction may occur between a reducing sugar and an amino-compound and lead to the formation of N-substituted glycosylamine (Zhang et al., 2009). Amadori products are then formed through intramolecular rearrangement and dehydration. ROS-mediated oxidative degradation of Amadori products results in the formation of carbonyl and dicarbonyl compounds known as intermediate glycation products (IGP) and carboxymethyl-amines (e.g. N-carboxymethyllysine), also considered as AGEs. Subsequent chain-reactions may lead to intra- and inter-protein cross-linking, resulting in physiological disorders (Goldin et al., 2006). AGEs have been correlated with many complications associated with diabetes because hyperglycaemia enhances protein glycation and are also responsible for increased oxidative stress (Singh et al., 2001; Reddy and Beyaz, 2006). Our results (Table 2) indicate that, in comparison with the reference compound aminoguanidine which entered the phase II clinical trials but was withdrawn because of its side effects (Reddy and Beyaz, 2006), the two dihydrochalcones were clearly more efficient in inhibiting the formation of AGEs, since their  $\text{IC}_{50}$  was much lower. Sieboldin displayed a 40-fold lower  $\text{IC}_{50}$  (0.2 mM) than aminoguanidine and a 10-fold lower  $\text{IC}_{50}$  than phloridzin (Table 2). This concentration is found in about 5 g of fresh leaf tissue. Anti-AGE properties are linked to restriction of the Maillard reaction, by direct interference with either the sugar or the protein, or through ROS

scavenging activities blocking the oxidative degradation of Amadori products, or through carbonyl and dicarbonyl compound neutralization by conjugation. AGEs may also be degraded by crosslink breakers (Reddy and Beyaz, 2006). Our AGE inhibition test did not allow us to determine the precise mechanism by which phloridzin and sieboldin are effective against AGEs, but a recent study reports that phloridzin and phloretin are able to quench glyoxal and methylglyoxal, two dicarbonyl species (Shao et al., 2008). Sieboldin, being several fold more efficient than phloridzin in inhibiting AGE and in view of the results of the antioxidant assays, its high radical scavenging activity may also participate in inhibiting the formation of IGPs.

### 3. Conclusion

In conclusion, our data suggest that dihydrochalcones are involved in the overall antioxidant potential of *Malus* leaves. In addition to the demonstration of sieboldin bioactivity, our results highlight the potential and complementary therapeutic properties of this newly characterised dihydrochalcone, in preventing (i) hypertension and (ii) AGE-linked complications. Endothelial dysfunction, hypertension and atherosclerosis risks are not only associated with a high NAPDH activity and superoxide anion overproduction in human blood vessels but also with increased AGEs (Goldin et al., 2006; Guzik et al., 2000). Thus, it will be of interest to assay the capacity of sieboldin to prevent *in vivo* hypertension and to limit atherosclerosis risks. In addition, phloridzin has been widely demonstrated to induce glycosuria and to contribute to overall diminution of glycaemia in animal models (Ehrenkranz et al., 2005). Coupled with the glucosuria-promoting effects of phloridzin, a treatment with sieboldin may be promising in limiting complication associated with diabetes. The two additional tests performed validate the high antioxidant potential of this dihydrochalcone and in addition, provides promising results concerning its potential use as a therapeutic or dietary supplement for oxidative stress related diseases. Hence, sieboldin may be qualified as a “multipotent antioxidant” (Zhang et al., 2006). To the best of our knowledge, this is the first report on the characterisation of sieboldin antioxidant capacities and strong biological activity potential.

## 4. Experimental

### 4.1. General experimental procedures

Trolox ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), fluorescein disodium salt, AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), paraquat dichloride, phloretin, L-ascorbic acid, reduced glutathione, aminoguanidine, D-ribose, bovine serum albumin, dimethyl sulfoxide (DMSO), silica, MeOH and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> of HPLC grade were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Apocynin (acetovanillone) was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). HPLC grade-quality acetonitrile and acetic acid were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Phloridzin was obtained from Extrasynthèse (Genay, France). Highly purified and deionised water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, USA). UV-visible data were monitored with a microplatespectrophotometer (μQuant, Bio-Tek, Colmar, France) and fluorescence was read with a FLUOstar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Analytical HPLC was performed on an HPLC system including a SCM1000 vacuum membrane degasser (ThermoQuest, San Jose, CA, USA), a Surveyor auto-sampler (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) and an 1100 Series binary pump (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The separated compounds were detected both by a photodiode array detector (1100 Variable Wavelength Detector, Agilent Technologies) and after electrospray ionisation through ion trap mass spectrometry (LCQ Deca, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) as described by Bernillon et al. (2004). Flash chromatography was performed on a IntelliFlash 310 (Analogix, Burlington, USA). NMR spectra were recorded on an Avance DRX 500 MHz spectrometer (Bruker, Wissemburg, France). Structure of purified compounds prepared in deuteromethanol (CD<sub>3</sub>OD) was determined with 1D and 2D <sup>1</sup>H (at 500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (at 125 MHz) data together with extensive HMBC and HMQC correlation analyses.

#### 4.2. Plant material

Two *Malus domestica* (Baumg.) genotypes were chosen for their contrasting susceptibility to fire blight, a bacterial disease of pome fruits caused by *Erwinia amylovora*, the resistant ornamental Evereste and the susceptible rootstock MM106 (Venisse et al., 2002). Experiments were performed on young scions of each genotype grafted on MM106 and grown for at least 6 weeks under greenhouse conditions (natural photoperiod and light, temperatures between 17 and 22 °C, 70% relative humidity) before use. Leaf material was obtained from young leaves (F2, second fully expanded leaf, bright green) and mature leaves (F10, the tenth dark-green colored leaf), both harvested on the same growing shoot.

#### 4.3. Analytical HPLC and mass spectrometry

Separation of polyphenols from methanolic extracts was conducted as described previously (Bernillon et al., 2004). The same methanolic extracts used for the DPPH assay were filtered through a 0.45 µm PTFE membrane (Chromafil, Macherey-Nagel, Hoerd, France) before injection. Briefly, samples were injected on a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (2.1 mm x 150 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies) at 30 °C. The following gradient with a two-solvent system, 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B), was applied at a flow rate of 0.2 ml/min: initial, 3% B; 0–5 min, 9% B linear; 5–15 min, 16% B linear; 15–45 min, 50% B linear, followed by washing and reconditioning the column. Quantification of peak areas at 280 nm was achieved by determination of a response coefficient (µmol/OD•s) using pure compounds obtained by HPLC purification at the semi-preparative scale as described below.

#### 4.4. Purification of dihydrochalcones from apple leaves

Lyophilized leaves were ground and weighed (14 g), then extracted twice for 24 h with 2 l of acidic methanol (0.1% of acetic acid). Between each step, extracts were vacuum-filtrated on a sintered glass funnel (porosity 4). Filtrates were subjected to evaporation and the resulting powder was mixed with 20 g of silica. Soluble dihydrochalcones were eluted from the silica using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (5:1). Presence of major dihydrochalcones was checked by analytical LC-MS as described in 4.3. Each compound of interest was separated using normal-phase flash chromatography technology (SuperFlash SF 25-40g CV 52 ml cartridge, Analogix, Burlington, USA) with the following gradient consisting of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (A) and MeOH (B) at a flow rate of 40 ml/min: initial, 5% B; 0-3 min, 10% B; 3-6 min isocratic 10% B; 6-11 min 15% B; 11-20 min isocratic 15% B; 20-25 min 20% B. Polyphenols were detected by UV-vis spectrophotometry. Each fraction was checked by analytical HPLC as described in 4.3 before being pooled.

#### *4.5. DPPH scavenging activity*

Free radical scavenging activity was assayed as described in Brand-Williams et al. (1995) and Sharma and Baht (2009) with some modifications. Fresh leaf tissue (150 mg) was placed in 2-ml centrifuge tubes with 3 mm-tungsten carbide beads (Qiagen, Courtaboeuf, France), frozen in liquid nitrogen and ground with a mixer mill (MM301, Restch, Haan, Germany) at 30 Hz for 30 s. The resulting powder was then extracted with 1 ml of acidic methanol (1% acetic acid) for 15 min in the mixer mill (10 Hz) at room temperature. Homogenates were centrifuged 5 min at 13000g and the supernatant was transferred to a new 1.5 ml centrifuge tube (called methanol extract afterwards). Pure compound solutions were prepared in methanol at 10X concentrations ranging from 6.25 µM to 3 mM. Assays were performed in microplates (Nunc-Immuno Modules, Nunc, Roskilde, Denmark). Thirty µl of methanol extract or 10X solutions of each compound was added to 240 µl of methanol in microplate

wells. The reaction was started with the addition of 30  $\mu\text{l}$  of a 3.2 mM methanol solution of DPPH and the OD was monitored at 515 nm every minute for 120 min with a UV-Visible microplate spectrophotometer. A Trolox standard dilution curve was included as an internal control in each run. Antioxidant activity was evaluated by calculating the concentration of the tested molecule or raw extract corresponding to 50% reduction of the DPPH radical at steady state ( $\text{EC}_{50}$ ). Trolox equivalent antiradical capacity was calculated as the ratio between the Trolox  $\text{EC}_{50}$  and that of the compound/extract tested. Reduction kinetics were also analysed to classify the compounds as slow or rapid (Sanchez-Moreno et al., 1998). The experiment was repeated three times with internal duplicate-measurements for both extracts and compounds ( $n = 3$ ).

#### *4.6. Oxygen radical absorbance capacity*

ORAC based on AAPH-initiated chain-oxidation of fluorescein was performed as described in Ou et al. (2001) with minor modifications. Fresh leaf tissue were ground as described for the DPPH assay and extracted with a solvent mixture of water/acetone (50/50). Each compound solution and subsequent dilutions were prepared in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4). The reaction was performed in a 96-well black opaque plate (Costar, Cambridge, MA) as follows: 150  $\mu\text{l}$  of 10 nM of fluorescein were added in each well and 25  $\mu\text{l}$  of Trolox or extract or pure compound were pipetted in triplicate. Trolox dilutions ranged from 62.5  $\mu\text{M}$  to 1000  $\mu\text{M}$  with a 2-fold dilution factor, pure compounds from 12.5  $\mu\text{M}$  to 100  $\mu\text{M}$  and extracts were diluted 800 and 400 times. The background signal was determined after a 30 min incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$  and the reaction was started with the automatic injection of 100  $\mu\text{l}$  of 240 mM AAPH. Fluorescence was measured every 90 s for 10 cycles. Fluorescence data were plotted and the area under the curve (AUC) was calculated as described in Ou et al. (2001). A Trolox equivalent ( $\mu\text{M}$ ) was calculated with a Trolox regression curve ( $Y = 1$

68.18X – 20.269,  $R^2 = 0.9977$  with  $X = \text{AUC sample} - \text{AUC blank}$ ). Each measurement was performed in triplicate. The analysis was carried out on three independent leaf extracts ( $n = 3$ ) and two different dilutions of the purified compound with two independent measurements ( $n = 4$ ).

#### *4.7. Tolerance to herbicide-derived photooxidative-stress*

The tolerance to a photooxidative herbicide (paraquat) was assessed by monitoring electrolyte leakage by conductimetry as described previously (Brisset and Paulin, 1991) with the following modifications. Ten leaf discs (0.7 cm in diameter, 40 to 50 mg of total fresh weight) from young F2 leaves of Evereste and MM106 were vacuum-infiltrated with 1, 10 or 100  $\mu\text{M}$  paraquat (methyl viologen ; Donahue et al., 1997) prepared in 1 mM MES buffer after surface-sterilisation (in 1.25% active Cl). The controls consisted in 1 mM MES infiltrated leaf discs. The discs were then blotted dry and immediately transferred for incubation in fresh 1 mM MES buffer with continuous stirring at 25 °C under artificial light provided with a GW84011M Mercurio floodlight (170  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , Gewiss, Les Ulis, France). Conductivity of the bathing MES solution was measured every 2 h for 24 h. The experiment was repeated four times, each measurement being performed in triplicates within each experiment.

#### *4.8. Vasorelaxant effects of dihydrochalcones*

Adult male Wistar rats (Iffa-Credo, L'Arbresle, France) were anesthetized (pentobarbital sodium, 50 mg/kg ip). Segments of first order mesenteric arteries (2 mm long) were dissected and mounted on a wire myograph (DMT, Aarhus, Denmark) in physiological salt solution as described previously (Loufrani et al., 2008). Tensions were monitored using the v3.7.2 of the AcqKnowledge software (BIOPAC Systems, Inc., Goleta, CA). A control of endothelium integrity was achieved by testing acetylcholine-induced relaxation as described in Loufrani et

al. (2008). A cumulative concentration-response curve to phenylephrine ( $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M) was performed. After washout, dihydrochalcones prepared in DMSO and diluted in ultra-pure water were added to the vessel at a final concentration of  $10^{-5}$  M. Sieboldin and phloridzin inhibitory activities were compared to that of control compounds, tempol ( $10^{-5}$  M) and apocynin ( $10^{-5}$  M), used under the same conditions. Vessels were then allowed to stabilize for 30 min and a new cumulative concentration-response curve to phenylephrine was performed. Each experiment was repeated three times, corresponding to three different animals. Cumulative concentration-response curves to sieboldin or phloridzin ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M) after precontraction of the artery with  $10^{-6}$  M phenylephrine were also performed.

#### *4.9. Inhibition of advanced glycation end products (AGEs) formation*

A Maillard fluorescence-based assay adapted from Vinson and Howard (1996) was optimized to screen compounds able of inhibiting the formation of AGEs. The assay involved incubating bovine serum albumin (BSA) (10 mg/ml) with D-ribose (0.5 M) and the tested compound ( $10^{-5}$  to  $10^{-2}$  M) in a Na-phosphate buffer (50 mM pH 7.4). Solutions were incubated in black microtitre plates (96 wells) at 37 °C for 24 h in a closed system. AGEs fluorescence (excitation: 370 nm; emission: 440 nm) was measured using a spectrofluorimeter Infinite M200 (Tecan, Lyon, France). To avoid quenching phenomena, the fluorescence resulting from incubation in the same conditions with BSA (10 mg/ml) and the tested compound or extract was subtracted from each measure. Tests were performed in technical triplicate. The negative control, i.e., 100% inhibition of AGEs formation consisted of wells with only BSA. The positive control, i.e., no inhibition of AGEs formation consisted of wells with BSA (10 mg/ml) and D-ribose (0.5 M). The final volume assay was 100  $\mu$ l. The compound concentration for 50 percent inhibition ( $IC_{50}$ ) was calculated from the data and compared with that of the reference compound aminoguanidine (Reddy and Beyaz, 2006).

#### *4.10. Statistical analysis*

A Bartlett's test was performed using R (R Development Core Team, 2008) to test for heteroscedasticity. When heterogeneity of variances was detected ( $p < 0.05$  for the Bartlett's test), data were represented with box-and-whiskers plots (Chambers et al., 1983). For each plot, the two hinges correspond to the first and the third quartile, median and mean are symbolised by a horizontal line and a cross respectively. Such a representation has the advantage to give information about biological variability. The whiskers extend to the most extreme data point which is no more than 1.5 times the interquartile range from the box. Notches represent a 95% confidence interval for the medians. Thus, if the notches of two plots do not overlap, medians may be considered significantly different, allowing to conclude about statistical significance like in classical parametric tests used for homoscedastic data. Data for which homogeneity of variances was verified ( $p > 0.05$  for the Bartlett's test) were analysed using a one-way anova and Student's t pairwise comparison of Benjamin-Hochberg adjusted p-values of means.

## Acknowledgements

T.D.D.B. was a recipient of a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France. The authors wish to thank Christelle Heintz and Roland Chartier for excellent technical assistance.

## References

Alvarez, Y., Briones, A.M., Perez-Giron, J.-V., Alonso, M.J., Salaices, M., 2008. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 153, 926-935.

Bernillon, S., Guyot, S., Renard, C.M.G.C., 2004. Detection of phenolic oxidation products in cider apple juice by high-performance liquid chromatography electrospray ionisation ion mass trap spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 939-943.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 28, 25-30.

Brisset, M.-N., Paulin, J.-P., 1991. Relationships between electrolyte leakage from *Pyrus communis* and virulence of *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 443-453.

Chambers, J.M., Cleveland, W.S., Kleiner, B., Tukey, P.A., 1983. *Graphical Methods for Data Analysis*. Chapman & Hall/CRC, Pacific Groves.

Donahue, J.L., Okpodu, C.M., Cramer, C.L., Grabau, E.A., Alscher, R.G., 1997. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (relationships to resistance). *Plant Physiol.* 113, 249-257.

Ehrenkranz, J.R.L., Lewis, N.G., Kahn, C.R., Roth, J., 2005. Phloridzin: a review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21, 31-38.

Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M., Creager, M.A., 2006. Advanced glycation end products. *Circ.* 114, 597-605.

Gosch, C., Halbwirth, H., Kuhn, J., Miosic, S., Stich, K., 2009. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus x domestica*, Borkh). *Plant Sci.* 176, 223-231.

Guzik, T.J., West, N.E.J., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K.M., 2000. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase-association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 86, 85-90.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2000. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.

Hernandez, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., Munné-Bosch, S., 2008. How relevant are flavonoids as antioxidant in plants? *Trends Plant Sci.* 14, 125-132.

Hilt, P., Schieber, A., Yildirim, C., Arnold, G., Klaiber, I., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R., 2003. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2896-2899.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856.

Huang, Y., Zang, A., Lau, C.-W., Chen, Z.-Y., 1998. Vasorelaxant effects of purified green tea catechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 63, 275-283.

Hunter, L.D., 1975. Phloridzin and apple scab. *Phytochemistry* 14, 1519-1522.

Hunter, L.D., Hull, L.A., 1993. Variation in the concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry* 34, 1251-1254.

Judgé, H., Danny, N., Nguy, I., Moller, J., Cooney, J.M., Atkinson, R.G., 2008. Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple. *FEBS J.* 275, 3804–3814.

Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.-T., Rupasinghe, H.P.V., 2008. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Comp. Anal.* 21, 396-401.

Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D.-O., Lee, H.J., Lee, C.Y., 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6516-6520.

Ling, T.J., Lin, L.D., Wu, P., Zhou, W.H., Ye, H.G., Liu, M.F., Wei, X.Y., 2004. Dihydrochalcones from *Symplocos vacciniifolia*. *Chin. Chem. Lett.* 15, 182-184.

Loufrani, L., Retallau, K., Bocquet, A., Dumont, O., Danker, K., Louis, H., Lacolley, P., Henrion, D., 2008. Key role of  $\alpha_1\beta_1$ -integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H1906-H1913.

Lu, Y., Foo, L.Y., 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* 68, 81-85.

Luscher, T.F., Boulanger, C.M., Dohi, Y., Yang, Z., 1992. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19, 117-130.

Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H., Osawa, T., 2003. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3309-3312.

Nakano D., Kwak C.-J., Fujii K., Ikemura K., Satake A., Ohkita M., Takaoka M., Ono Y., Nakai M., Tomimori N., Kiso Y., Matsumura Y., 2006. Sesamin metabolites induces an endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation through their antioxidative property-independent mechanisms: possible involvement of the metabolites in the antihypertensive effect of sesamin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 318, 328-335.

Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619-4626.

Picinelli, A., Dapena, E., Mangas, J.J., 1995. Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance: A preliminary study. *J. Agric. Food Chem.* 3, 2273–2278.

Pontais, I., Treutter, D., Paulin, J.-P., Brisset, M.-N., 2008. *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiol. Plant.* 132, 262-271.

Puel, C., Quintin, A., Mathey, J., Obled, C., Davicco, M.J., Lebecque, P., 2005. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation condition. *Calcif. Tissue Int.* 77, 311-318.

R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.

Reddy, V.P., Beyaz, A., 2006. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today* 11, 646-654.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152-159.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270-276.

Shao, X., Bai, N., He, K., Ho, C.-T., Yang, C.S., Sang, S., 2008. Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 2042-2050.

Sharma, O.P., Baht, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202-1205.

Singh, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L., 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146.

Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113, 1226-1233.

Tanaka, T., Uehara, R., Nishida, K., Kouno, I., 2005. Galloyl, caffeoyl and hexahydroxydiphenoyl esters of dihydrochalcone glucosides from *Balanophora tobiracola*. *Phytochemistry* 66, 675-681.

Treutter, D., 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul.* 34, 71-89.

Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 147-157.

Venisse, J.-S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J.-P., Brisset, M.-N., 2002. Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 1204-1212.

Vinson, J.A., Howard III, T.B., 1996. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.* 7, 659-663.

Wilcox, C.S., Pearlman, A., 2008. Chemistry and hypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharm. Rev.* 60, 418-469.

Williams, A.H., 1964. Dihydrochalcones; their occurrence and use as indicators in plant chemical taxonomy. *Nature* 202, 824-825.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., Laskowski, P., 2008. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6520-6530.

Zhang, H.-Y., Yang, D.-P., Tang, G.-Y., 2006. Multipotent antioxidants: from screening to design. *Drug Discovery Today* 15/16, 749-754.

Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Baynes, J.W., Metz, T.O., 2009. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J. Proteome Res.* 8, 755-769.

**Fig. 1.** UV-chromatogram at 280 nm of extracts of young (black) and mature (grey) leaves from Evereste (A) and MM106 (B) separated by reversed-phase HPLC. Retention times,  $m/z$  (M-H) and chemical structures obtained from NMR spectra are given for each compound. (C) Chemical structures of compounds 1, 2 and 3. (D) and (E) mass spectra of sieboldin (D) and phloridzin and trilobatin (E) which are identical for those two compounds. A typical fragmentation of sieboldin in the negative mode is represented in panel D, this fragmentation is similar for the two other compounds.

**Table 1.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) assignments for 1 and 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

**Fig. 2.** Quantification of major dihydrochalcones (sieboldin (SIE), phloridzin (PLZ) and trilobatin (TRI)) from MM106 (A) and Evereste (B) young and mature leaves. Concentrations are expressed in mg per gram of fresh weight (FW). Data from three independent biological measurements. For interpretation of box-and-whisker plots, see Experimental.

**Fig. 3.** ORAC and DPPH scavenging activity of sieboldin (SIE), phloridzin (PLZ), trilobatin (TRI), phloretin (PLT) and reference compounds, ascorbic acid (AA) and glutathione (GSH). Measured ORAC using concentrations of compounds ranging from  $62.5\ \mu\text{M}$  to  $1\ \text{mM}$  (panel A) and DPPH scavenging activity and kinetics using concentrations ranging from  $6.25\ \mu\text{M}$  to  $3\ \text{mM}$  (panels B and C) of individual compound expressed in  $\mu\text{mol}$  of Trolox/ $\mu\text{mol}$  of compound. Panel D, calculated contribution to whole leaf antioxidant activity, in  $\mu\text{mol}$  of Trolox/g of fresh weight (FW), calculated as the product of the leaf concentration of the compound (Fig. 2) by its antioxidant activity and molecular weight. Data from Fig.4. are also represented in panel D (black histograms) for comparison.

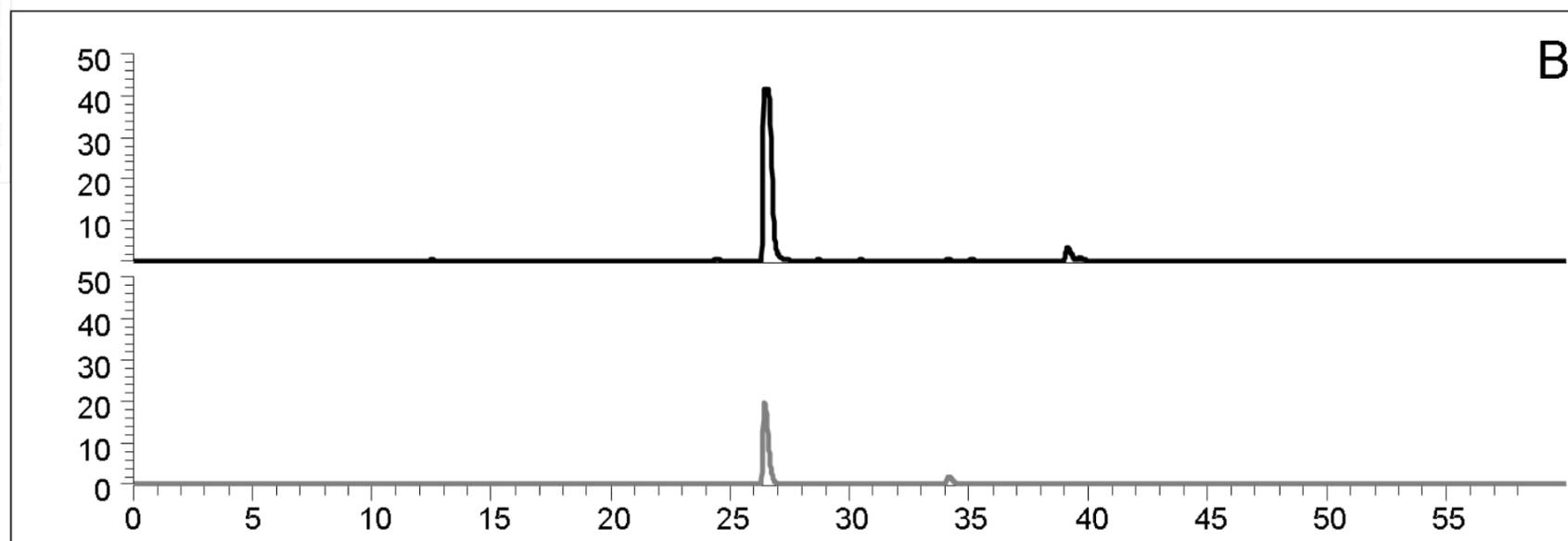
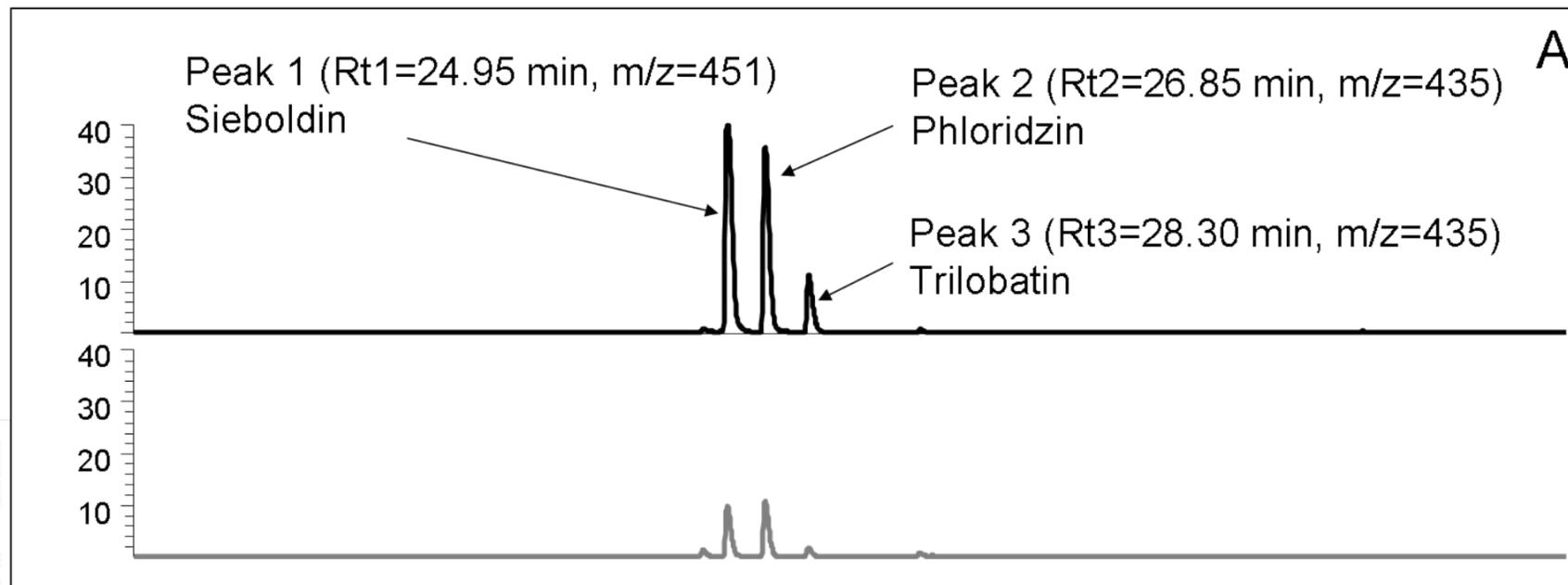
**Fig. 4.** Box-and-whisker plots of antioxidant capacities of methanolic extracts of young and mature leaves extracts (initial concentrations were  $150\ \text{mg}$  of fresh weight per ml) of Evereste (Ev) and MM106 (M) *Malus* genotypes assayed by the ORAC (A) and DPPH scavenging assays (B). Data represent duplicates from three independent experiments and are expressed in  $\mu\text{mol}$  of Trolox per g of fresh weight (FW).

**Fig. 5.** Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ ) of bathing solutions containing leaf discs of MM106 (A) and Evereste (B) pre-infiltrated with paraquat at  $1$  (open circles),  $10$  (grey) and  $100$  (black)  $\mu\text{M}$  or assay medium (crosses) under constant illumination (means of triplicates from one typical experiment). The dot line at  $200\ \mu\text{S}/\text{cm}^2$  was drawn for comparative purposes between the two apple genotypes.

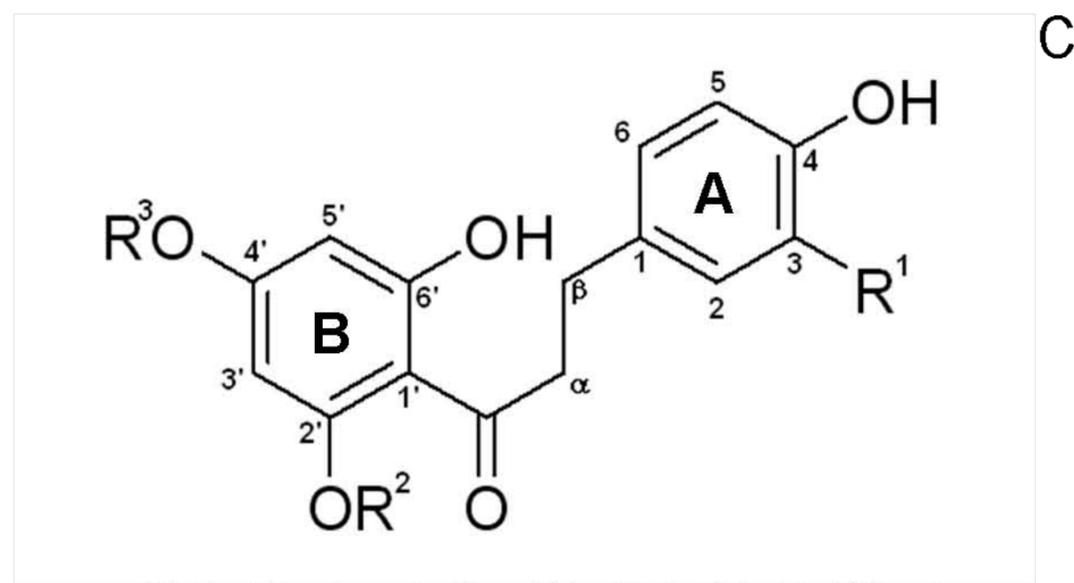
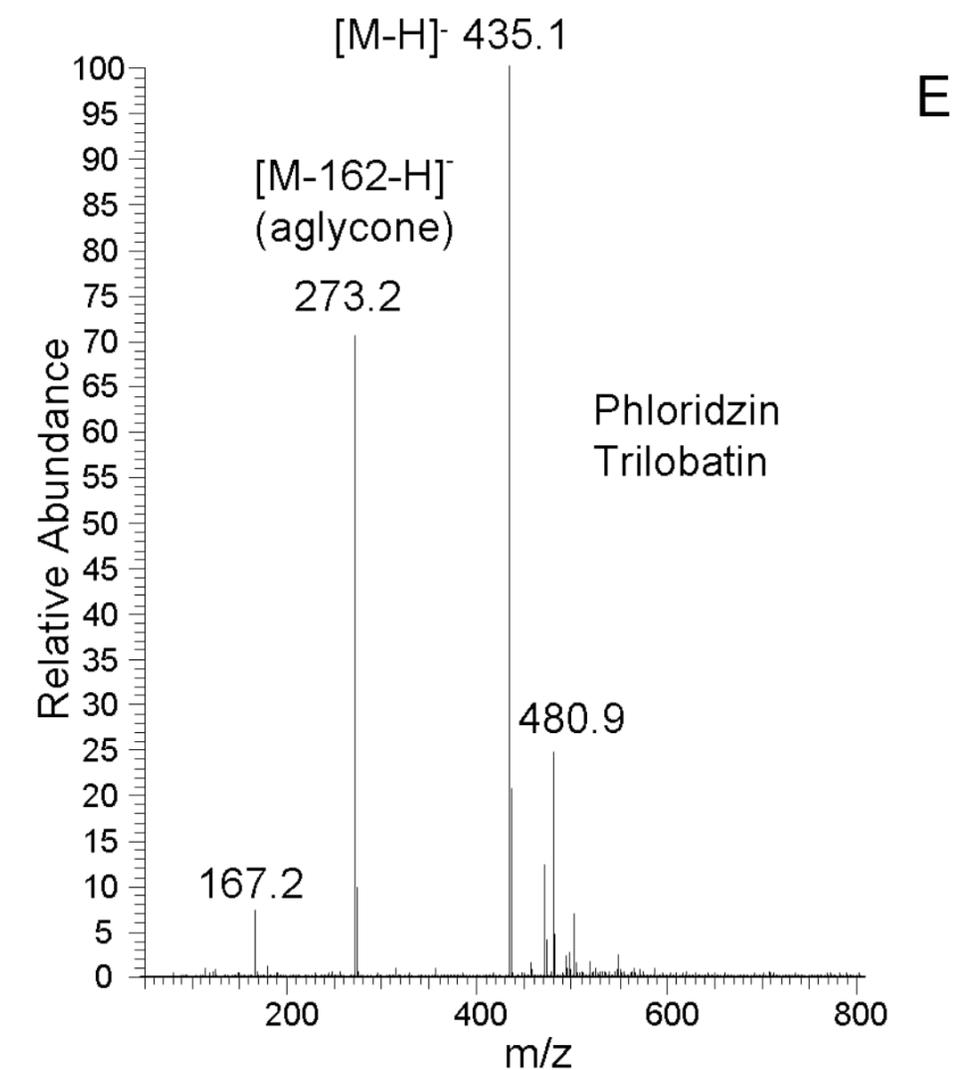
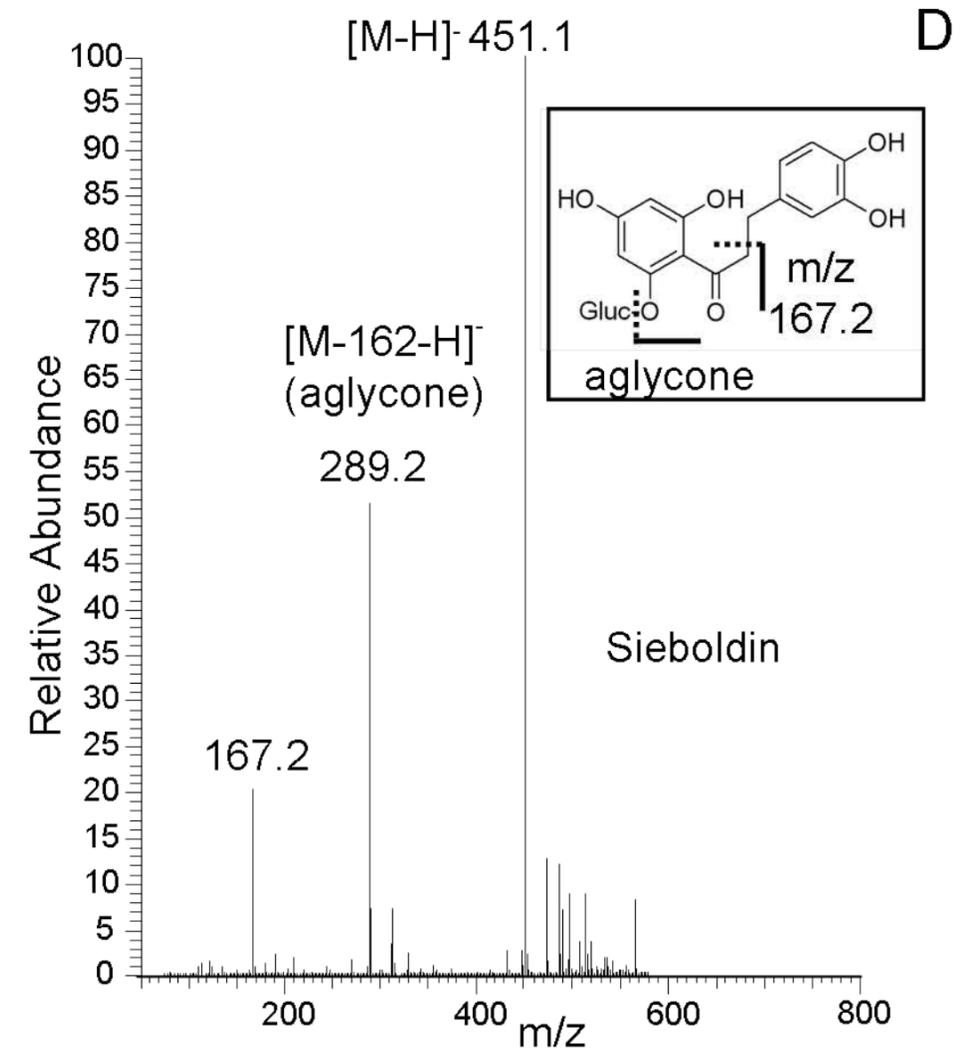
**Fig. 6.** Contraction of isolated mesenteric arteries in response to  $5 \times 10^{-5}\ \text{M}$  phenylephrine, with  $30\ \text{min}$  preincubation of  $10^{-5}\ \text{M}$  phloridzin, sieboldin or control vasorelaxants, tempol and apocynin ( $n = 3$ , means from three independent artery segments). Mock indicates the result of artery contraction before preincubation. Letters indicate statistical classes for both assays ( $p < 0.01$ )

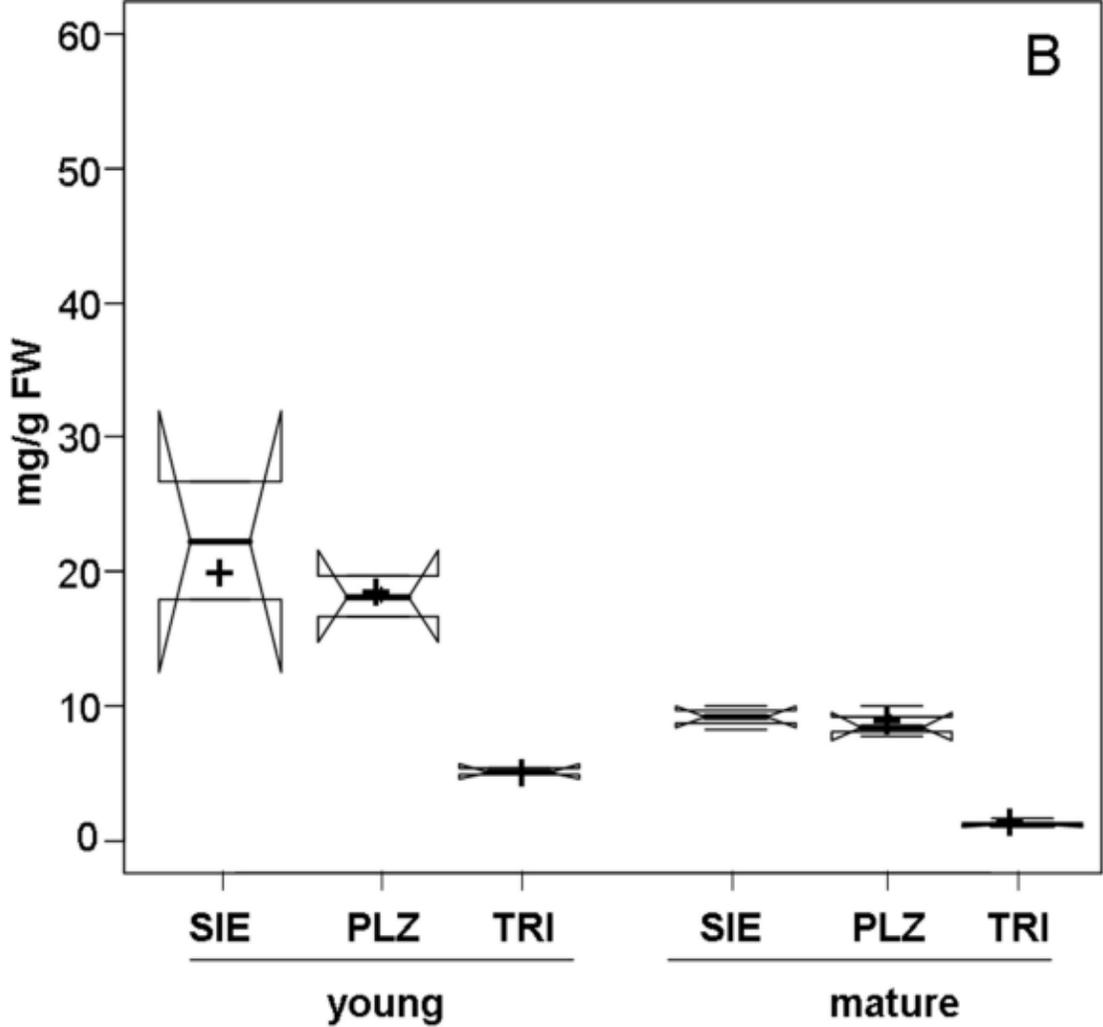
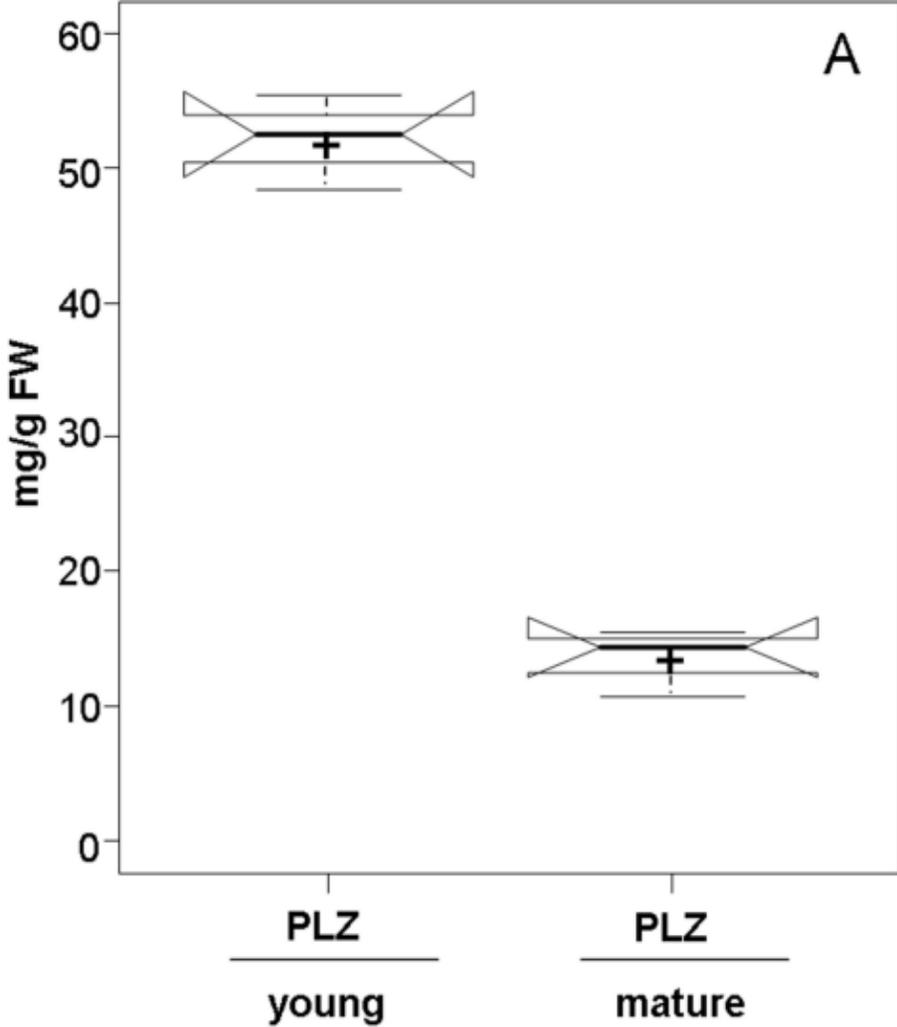
**Table 2.** Inhibitory concentration for 50% formation of AGEs. Aminoguanidine was used as a reference compound. NA means no detectable activity.

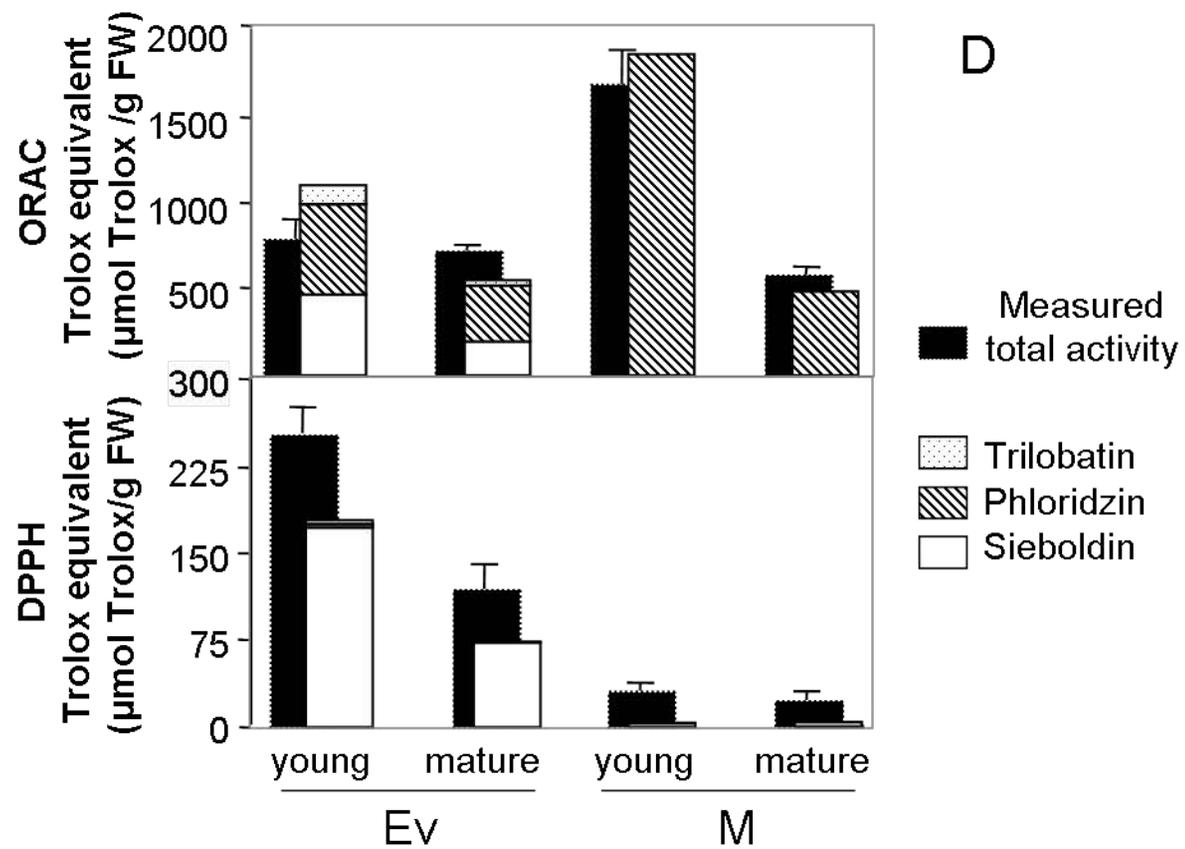
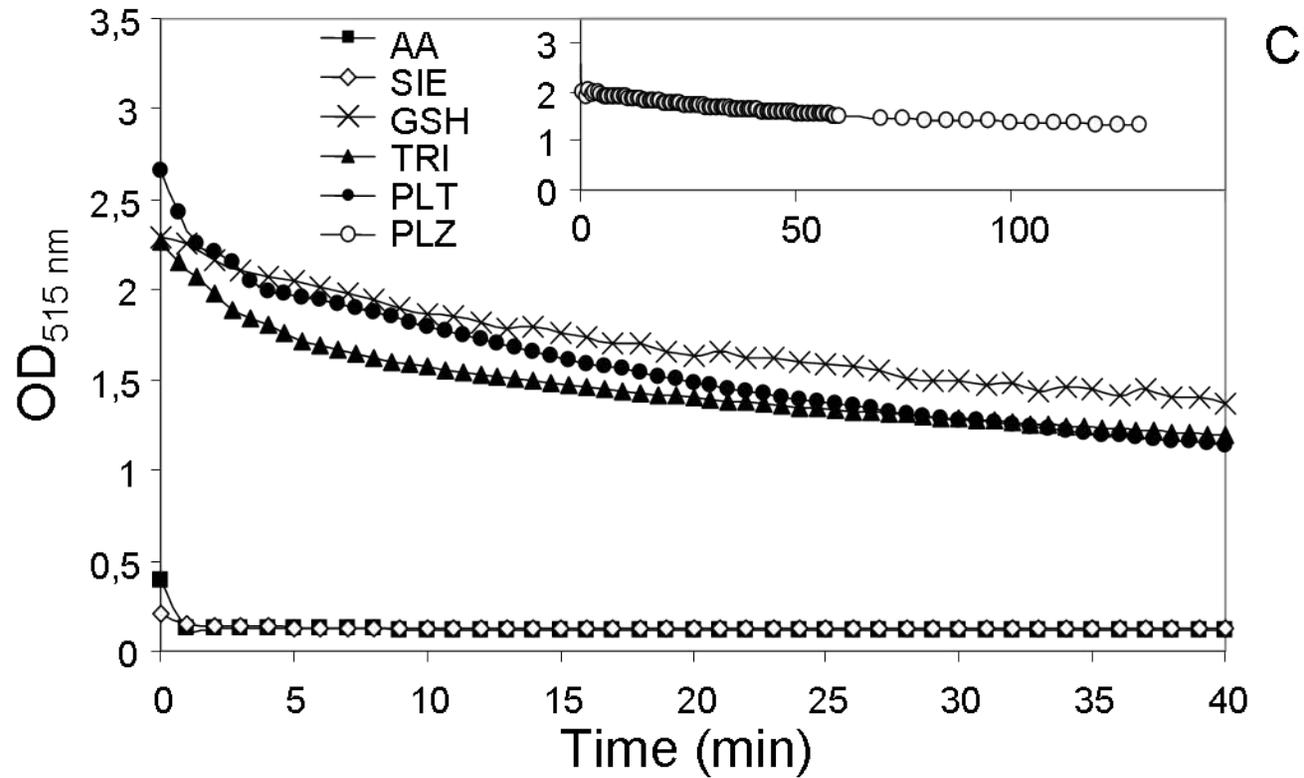
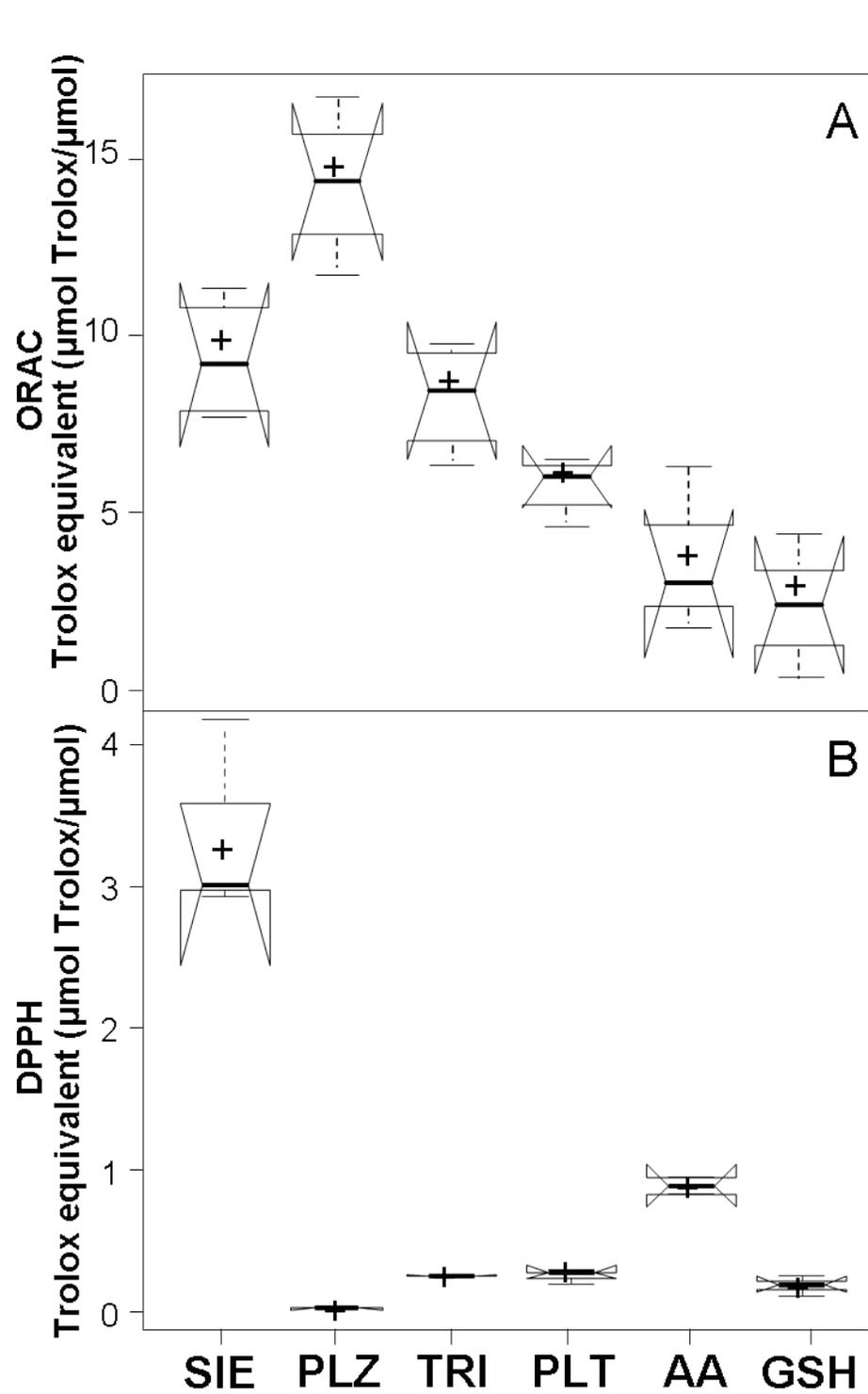
Absorbance Units

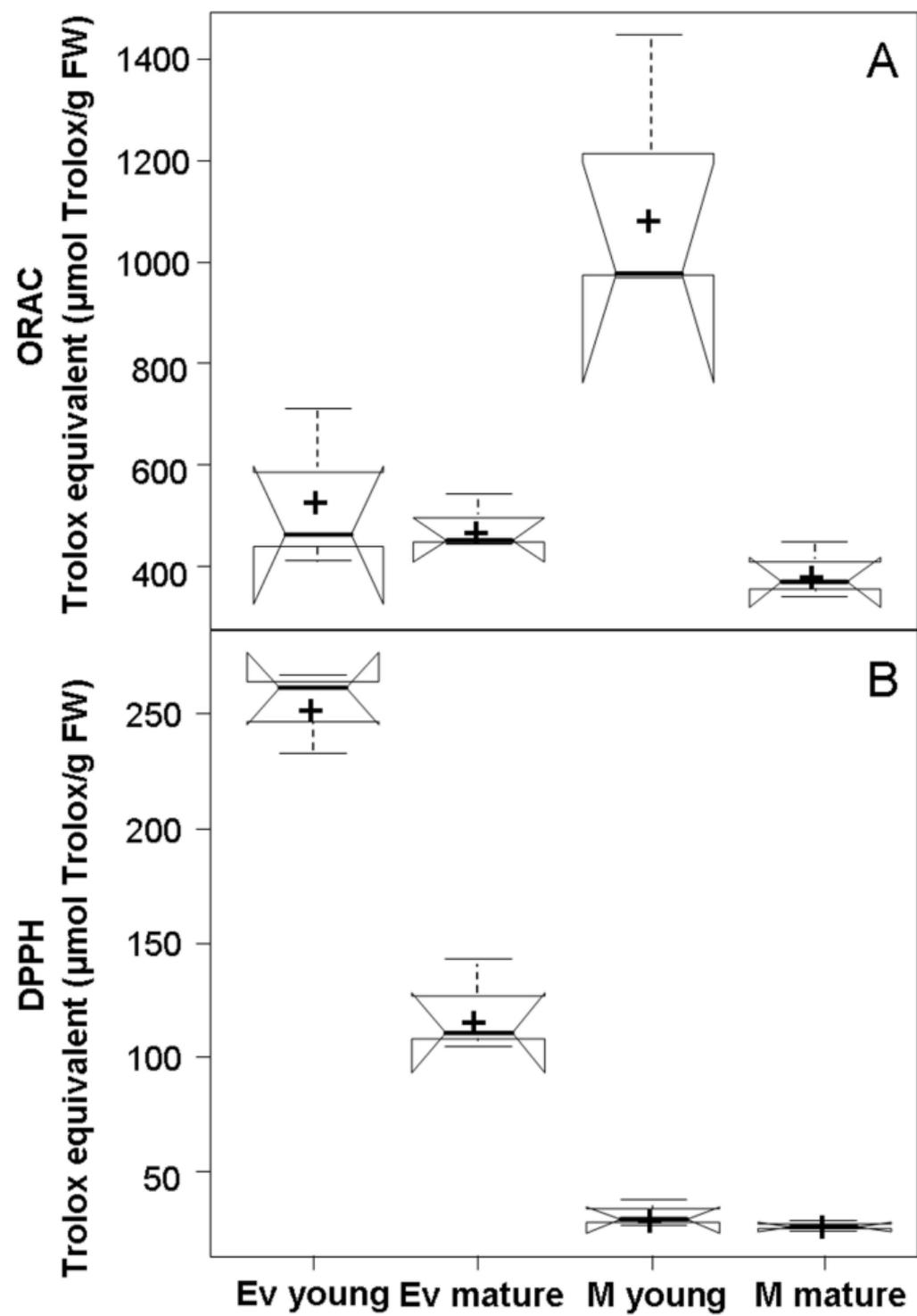


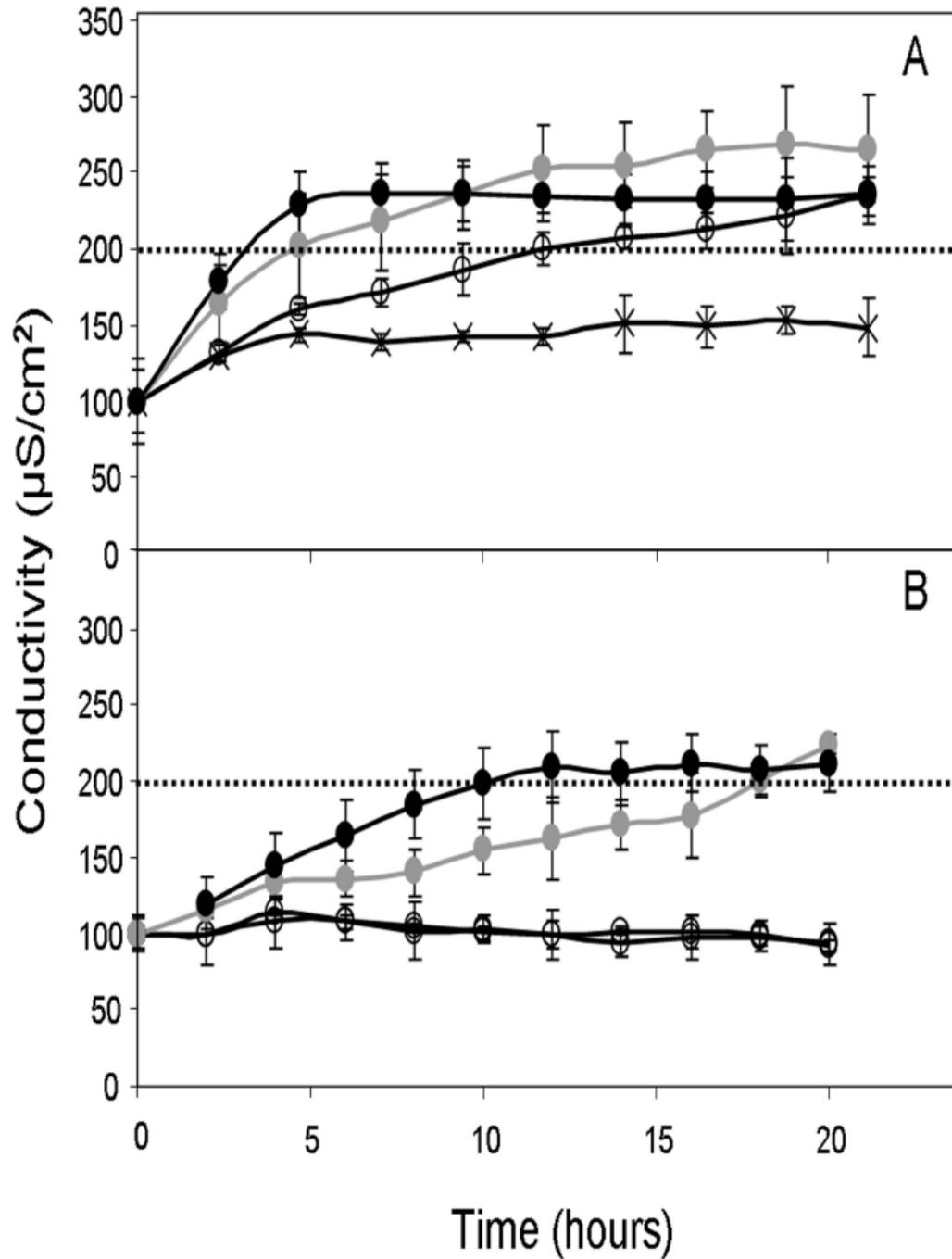
Retention Time (min)

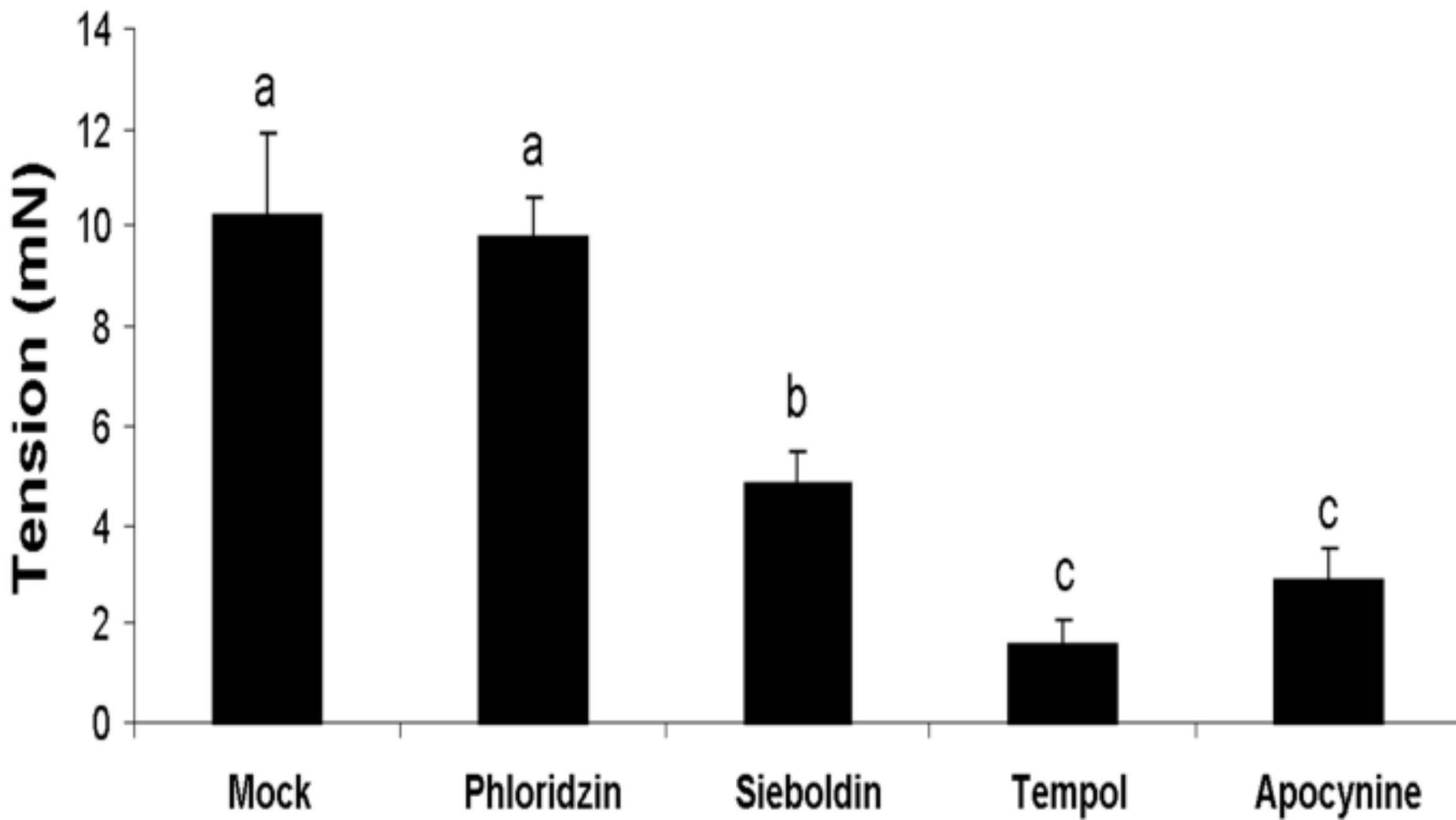
Sieboldin (peak 1) : R<sup>1</sup>=OH, R<sup>2</sup>=H, R<sup>3</sup>=glucosePhloridzin (peak 2) : R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=glucose, R<sup>3</sup>=HTrilobatin (peak 3) : R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R<sup>3</sup>=glucose











	Attribution	Compound 1	Compound 3
Ring A	1	134.6	133.9
	2	116.5	130.2
	3	146.1 (OH)	116.2
	4	144.3 (OH)	156.4 (OH)
	5	116.3	116.2
	6	120.6	130.2
	$\alpha$	47.5	47.3
	$\beta$	31.4	31.2
	CO	207.0	207.2
Ring B	1'	106.8	107.1
	2'	165.4	165.3
	3'	96.4	96.6
	4'	165.0	164.9
	5'	96.4	96.6
	6'	165.4	165.3
Glucose	1''	101.1	101.3
	2''	74.6	74.7
	3''	78.3	78.3
	4''	71.1	71.3
	5''	77.9	78.1
	6''	62.3	62.5

Assignments were based on HMQC and HMBC experiments

<b>Compound</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>
Aminoguanidine	8.5
Phloridzin	2.5
Sieboldin	0.2
Ascorbic acid	NA
Glutathione	NA
Trolox	1.7