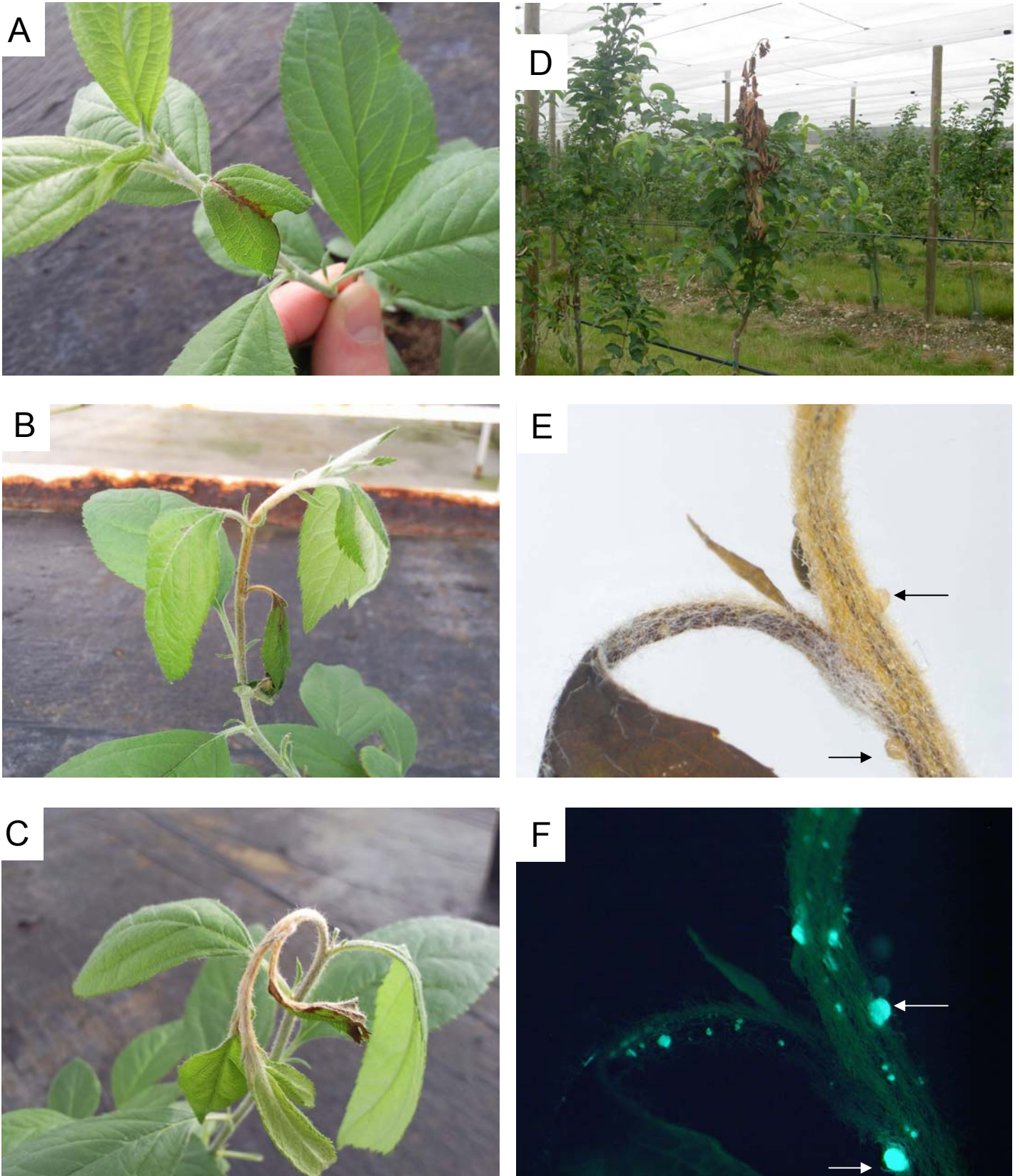


Encart 1 : le feu bactérien - symptômes



A, B et C, évolution du feu bactérien sur MM106 (4, 7 et 11 jours respectivement), après inoculation de la bactérie par coupure d'une jeune feuille à l'aide de ciseaux trempés dans un inoculum fort d'*Ea* (10^9 cfu/mL). Le symptôme caractéristique de recourbement en crosse est visible en C. D, symptômes sur Pommier en verger (clone de la variété Pink Lady), prise dans le Maine-et-Loire en 2007. Noter l'aspect desséché de la principale pousse infectée. E et F, une même pousse de MM106 inoculée avec une souche d'*Ea* exprimant la GFP, observée en lumière visible et en fluorescence, mettant en évidence de nombreuses gouttes d'exsudats (flèches), second symptôme caractéristique.

Encart 2 : les effecteurs de type III d'*Erwinia amylovora*

Les effecteurs ainsi que les protéines constituant le T3SS sont codés par un ensemble de gènes portant le nom de cluster *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) présent dans un îlot de pathogénicité, récemment séquencé dans son intégralité (Oh et al., 2005), et dont l'expression est induite dans certaines conditions environnementales (Wei et al., 2000). Le nombre d'effecteurs de type III de cette bactérie est réduit, puisque 12 ont été détectés comme sécrétés en milieu inducteur du T3SS (Nissinen et al., 2007), ce qui est relativement faible en comparaison avec celui d'autres bactéries phytopathogènes telles que des *Pseudomonas* (Badel et al., 2006) qui possèdent plusieurs dizaines d'effecteurs, jouant parfois des rôles redondants.

-L'effecteur DspA/E

Les souches mutantes d'*E. amylovora* déficientes pour la synthèse de cet effecteur sont incapables de provoquer la maladie sur plantes hôtes (pommier, poirier,...) mais restent capables d'induire une HR sur tabac (Gaudriault et al., 1997), c'est d'ailleurs la raison de l'appellation de DspA/E (*Disease Specific*). La partie C-terminale de la protéine DspA/E présente des homologies avec la protéine d'avirulence AvrE de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) (Bogdanove et al., 1998), suggérant que DspA/E puisse avoir des propriétés d'avirulence. L'injection de DspA/E dans le cytoplasme de cellules végétales au cours de l'infection a été mise en évidence très récemment par Bocsanczy et al. (2006). La sécrétion de DspA/E par le T3SS requiert les protéines HrpJ (Nissinen et al., 2007) et HrpN (voir ci-dessous ; Bocsanczy et al., 2008).

-La harpine HrpN

Les premières études ont montré que les mutants d'*E. amylovora* déficients pour HrpN, une harpine, sont incapables de produire la maladie sur jeunes poires et d'induire l'HR sur tabac (Wei et al., 1992). Cependant, des travaux plus précis ont révélé que ces mutants sont toujours capables d'induire des symptômes caractéristiques (bien que très limités) de feu bactérien sur des plantules et des microboutures de poirier *in vitro* ainsi que des HR faibles sur tabac de manière irrégulière (Barny, 1995). Sur pommier, quel que soit le matériel biologique utilisé, aucun symptôme n'a pu être obtenu par un mutant *hrpN*. La harpine a été visualisée dans les espaces intercellulaires de feuilles de plantules de pommier, mais elle n'a pas pu être détectée au sein des cellules végétales (Perino et al., 1999). Le site d'action de HrpN n'est pas encore connu, mais par analogie avec HrpZ de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, il se pourrait qu'elle agisse au niveau des membranes plasmiques, plutôt que dans le cytoplasme même des cellules végétales (Lee et al., 2001).

Encart 2 : les effecteurs de type III d'*Erwinia amylovora* (suite)

-Les autres effecteurs : *HrpW*, *EopB*, *HrpJ*, *AvrRpt2_{Ea}*

Les mutants *hrpW* gardent la même capacité que la souche sauvage à induire la maladie sur poirier et sur pommier mais ils induisent une réaction HR sur tabac plus rapidement et pour des inoculum moins forts (Gaudriault et al., 1998). Outre des homologies avec d'autres protéines élicitrices telles que PopA de *Ralstonia solanacearum* et HrpN, HrpW possède en son extrémité C-terminale des similarités avec des pectate lyases fongique et bactérienne (Gaudriault et al., 1998). Cependant aucune activité de ce type n'est présente dans le surnageant de cultures d'*E. amylovora*. Aucun rôle précis n'a pu être jusqu'à présent attribué à cette harpine.

Les mutants *eopB* ne sont pas atteints dans leur aptitude à induire les symptômes du feu bactérien sur poirier et pommier ni la réaction HR sur tabac (Oh et Beer, 2005). Comme DspA/E, EopB (*Erwinia* outer protein B) présente des homologies avec des protéines d'avirulence. Cette protéine est homologue aux effecteurs type AvrRxv/AvrBsT de *Xanthomonas vesicatoria* (Oh et al., 2005). EopB appartient à la famille d'un effecteur de *Yersinia pseudotuberculosis*, YopJ possédant une activité cystéine protéase, tout comme HrpW. Le rôle précis de EopB reste à déterminer.

HrpJ intervient dans la sécrétion de HrpN, HrpW et DspA/E (Nissinen et al., 2007). Les mutants d'*Ea* déficients pour HrpJ sont incapables d'induire la réaction d'hypersensibilité sur tabac et sont très affectés dans leur virulence sur fruits immatures.

L'effecteur AvrRpt2_{Ea} n'a été mis en évidence que très récemment par Zhao *et al.* (2006). Les mutants *avrRpt2_{Ea}* d'*E. amylovora* sont bien moins agressifs sur jeunes poires que les souches sauvages. Cet effecteur est codé par un gène n'appartenant pas au cluster *hrp* tel qu'il a été décrit par Oh *et al.* (2005). AvrRpt2_{Ea} est identique à 58% à AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et appartient à une famille de cystéines protéases (Mudgett, 2005), et est fonctionnellement reconnu par le gène de résistance RPS2 chez *Arabidopsis*.

| Étude | Variété(s) | Inoculation | Inoculum | Méthode d'analyse | Principales observations |
|---------------------------|------------------------|--|--|--------------------------------------|---|
| Huang et Goodman, 1976 | Jonathan | coupure à l'extrémité du pétiole de la plus jeune feuille déroulée | 10 ⁸ | MO, TEM | plasmolyse et altération des organelles des cellules du parenchyme colonisation rapide du xylème, cavités lysogènes |
| Suhayda et Goodman, 1981a | Jonathan | piqûre 5 cm sous l'apex | 5 x 10 ⁵ | SEM, TEM | prolifération dans le xylème mature, site initial de la migration occlusion du xylème corrélant avec le flétrissement, rôle de l'EPS? |
| Suhayda et Goodman, 1981b | Jonathan | coupure de segments de tige isolés | 5 x 10 ⁵ et 10 ⁸ | Comptage radioactivité | progression de la bactérie dans le xylème de manière EPS dépendante |
| Goodman et White, 1981 | Jonathan | sous l'épiderme d'un pétiole de feuille déroulée | 5 x 10 ⁴ | SEM, TEM | collapse et rétrécissement des cellules entourant le xylème plasmolyse et vésiculation du plasmalemma fibrilles ressemblant à des poils de pinneau dans le xylème |
| Bogs et al., 1998 | Semis Golden Delicious | piqûre dans la tige | Colonie bactérienne | GFP, SEM | pénétration par les trichomes présents à la surface, migration par le xylème |
| Momoi et al., 1998 | Golden et Empire | piqûre dans la tige, au-dessus de la plus jeune feuille déroulée | 5 x 10 ⁹ | PCR sur prélèvements | transmission systémique de la bactérie, jusque dans le porte greffe M.26 transmission probable par le système vasculaire, parfois asymptomatique |
| Dellagi et al., 1999 | Semis libres Evereste | coupure de la plus jeune feuille déroulée | 10 ⁸ | immunofluorescence marquage β-gal | bactérie localisée dans espaces intercellulaires du mésophylle dans le xylème et dans les cavités lysogènes du parenchyme cortical structure du xylème altérée (torsions) |
| Heyens et Vaicke, 2004 | M9 | coupure de l'extrémité de la 3e feuille développée | NC | GFP | bactéries visibles face abaxiale, dans la nervure centrale 7 jours après inoculation visibles dans les nervures secondaires 14 jours après inoculation |
| Bogs et al., 2004 | Semis Golden Delicious | coupure de jeunes feuilles à 0,5 cm de l'apex foliaire | 5 x 10 ⁸ | GFP | présence de la bactérie dans la nervure centrale, éloignée du site d'infection migration non forcément associée à la présence de symptômes |

Tableau I.1. Résumé des principales études portant sur la localisation tissulaire d'*Erwinia amylovora* ainsi que la caractérisation des évènements cyto-histologiques associés. L'inoculum est exprimé en cfu/mL, MO, microscopie photonique. SEM, microscopie électronique à balayage. TEM, microscopie électronique à transmission.

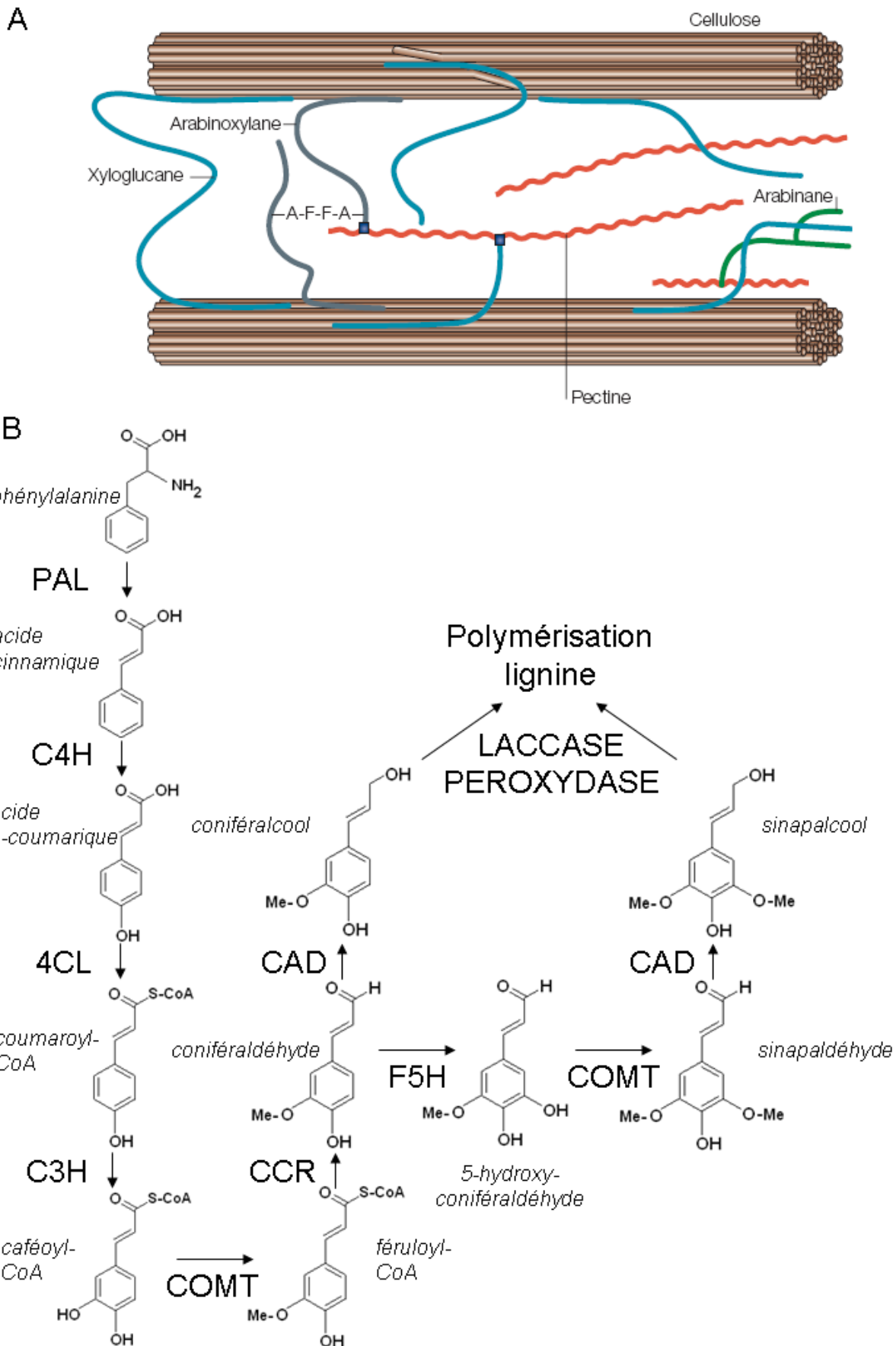


Fig.I.1. A, organisation schématique de la paroi cellulaire végétale. Les fibres de cellulose forment des feuillets reliés entre eux par un réseau d' hémicelluloses (type xyloglucane, arabinoxylane ou arabinane) et de pectine (en rouge). L'interaction entre des hémicelluloses peut aussi être médiée par des acides phénoliques, tel que l'acide férulique (A-F), d'après Cosgrove (2005). B, voie de biosynthèse probable des monolignols chez les angiospermes, tiré de Boerjan et al. (2003), PAL=phénylalanine ammonia lyase, C4H=acide cinnamique 4-hydroxylase, 4CL=4-coumarate CoA ligase, C3H=p-coumarate 3-hydroxylase, COMT=acide caféique o-méthyltransférase, CCR=cinnamoyl CoA réductase, F5H=féruleate 5-hydroxylase, CAD=cinnamyl alcool déshydrogénase.

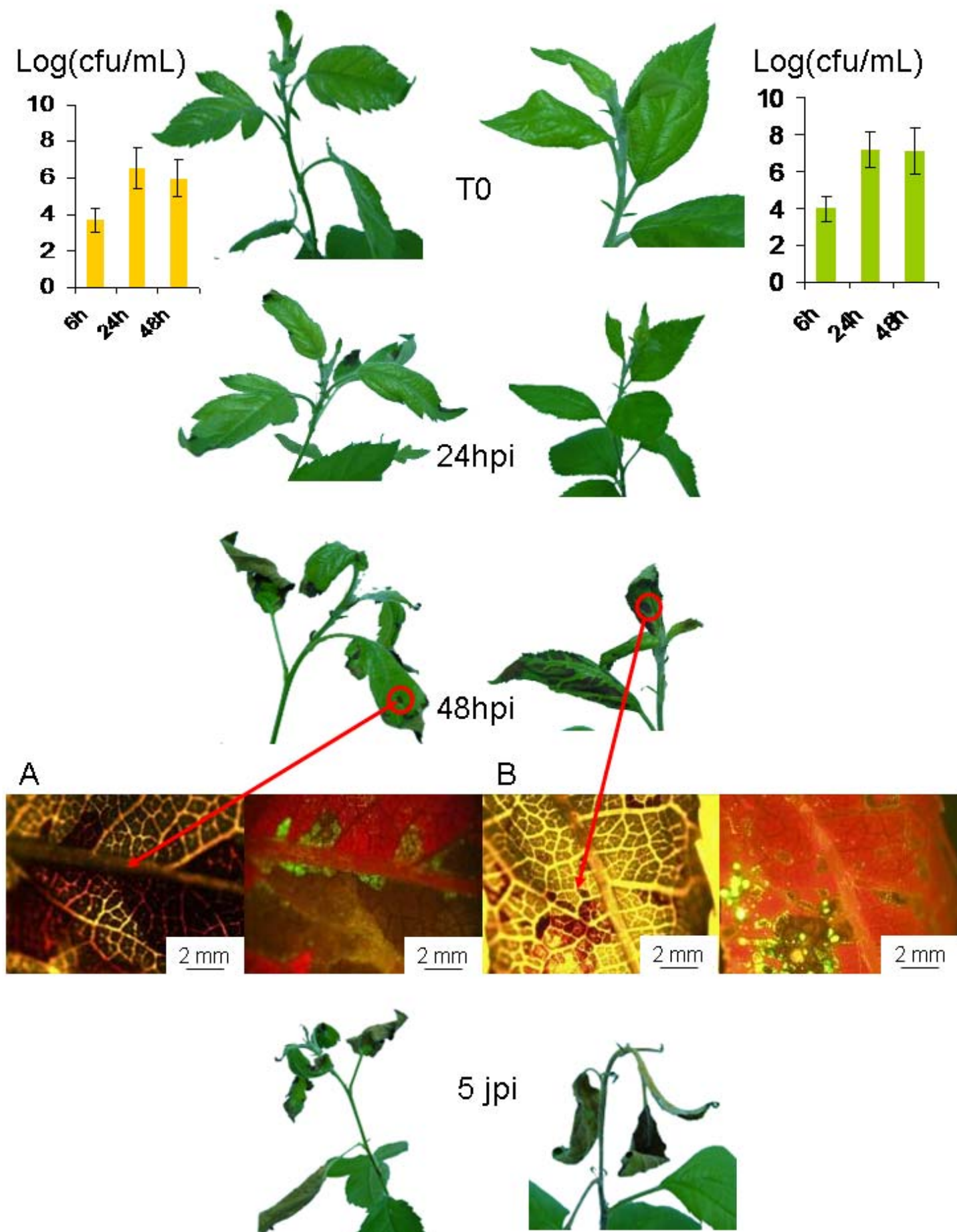


Fig.I.2. Macrophscopie de l'interaction d'*Ea* avec Everest (à gauche) et MM106 (à droite), 24, 48 hpi et 5 jpi, et dénombrements bactériens ($n=2$, \pm SEM) dans les feuilles infectées d'Evereste (orange) et de MM106 (vert). A et B observations au microscope par transparence et à faible grossissement de feuilles nécrosées d'Evereste et MM106 respectivement, en lumière visible (gauche) et en épifluorescence (droite), mettant en évidence la localisation d'*Ea* portant une fusion GFP.

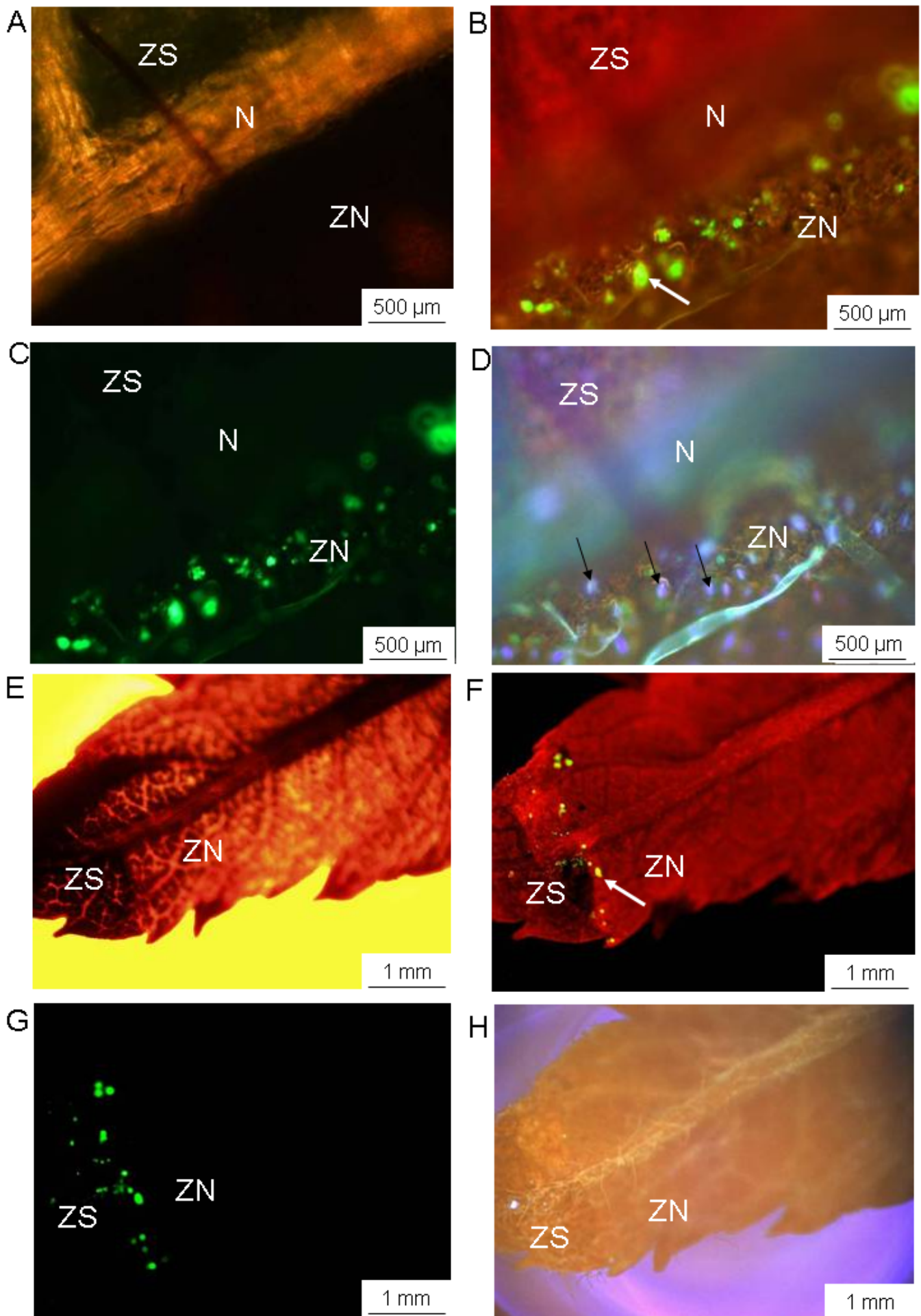


Fig.I.3. A,B,C,D,E,F,G,H: détail d'une nécrose sur la face abaxiale du limbe d'Evereste 24 hpi (A,B,C,D) et 5 jpi (E,F,G,H), en lumière visible (A et E) et en épifluorescence. ZS=zone dépourvue de symptômes, N=nervure, ZN=zone nécrosée. Les flèches blanches sur les photos B et F montrent une colonie bactérienne isolée et les noires sur la photo D indiquent la présence des cellules stomatiques qui fluorescent aux UV,

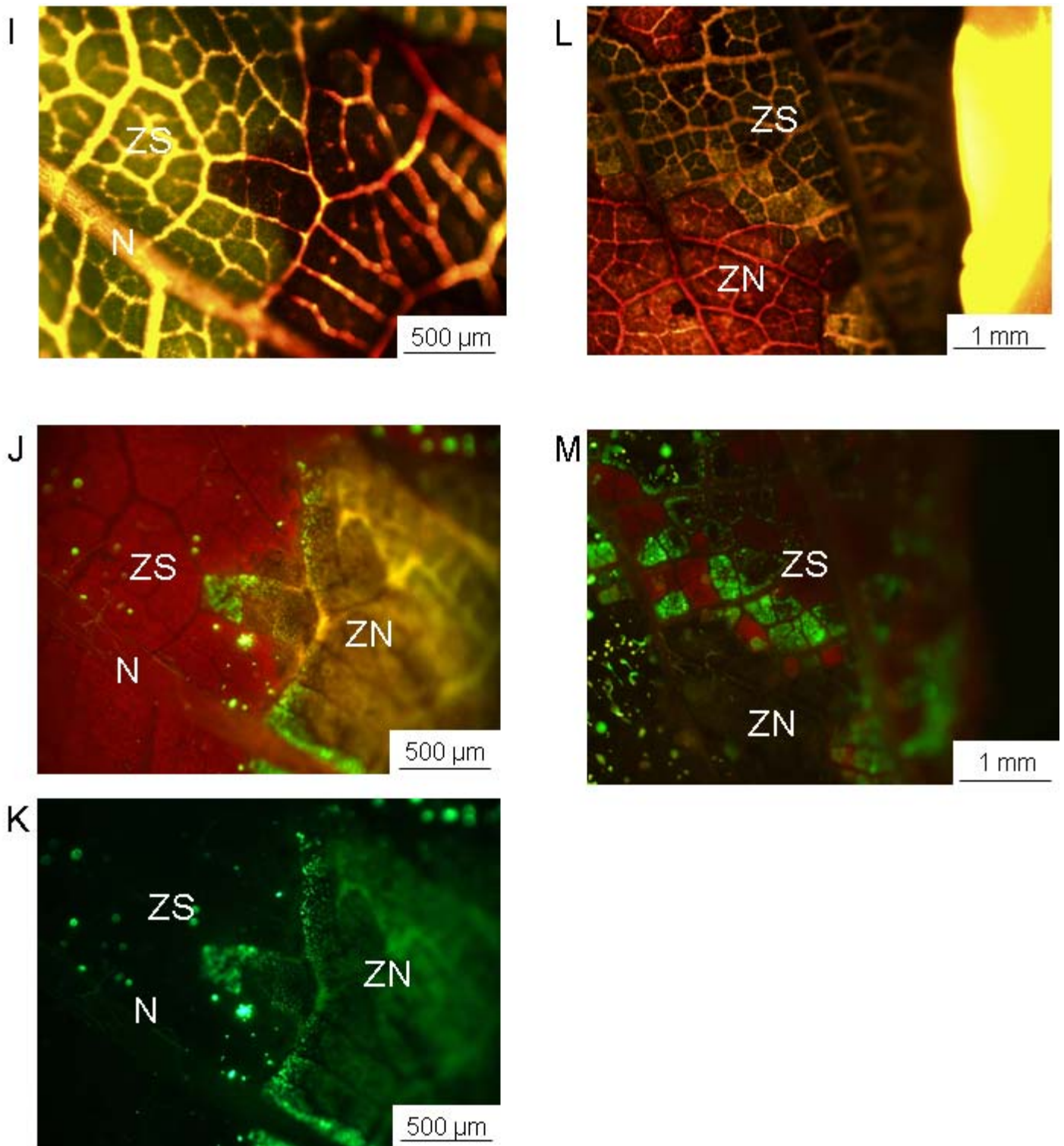


Fig.I.3. I,J,K,L,M: détail d'une nécrose sur la face abaxiale du limbe de MM106 24 hpi (I,J,K) et 5 jpi (L,M), en lumière visible (I et L) et en épifluorescence (filtre bleu, J et M, et GFP, K), ZS=zone dépourvue de symptômes, N=nervure, ZN=zone nécrosée.

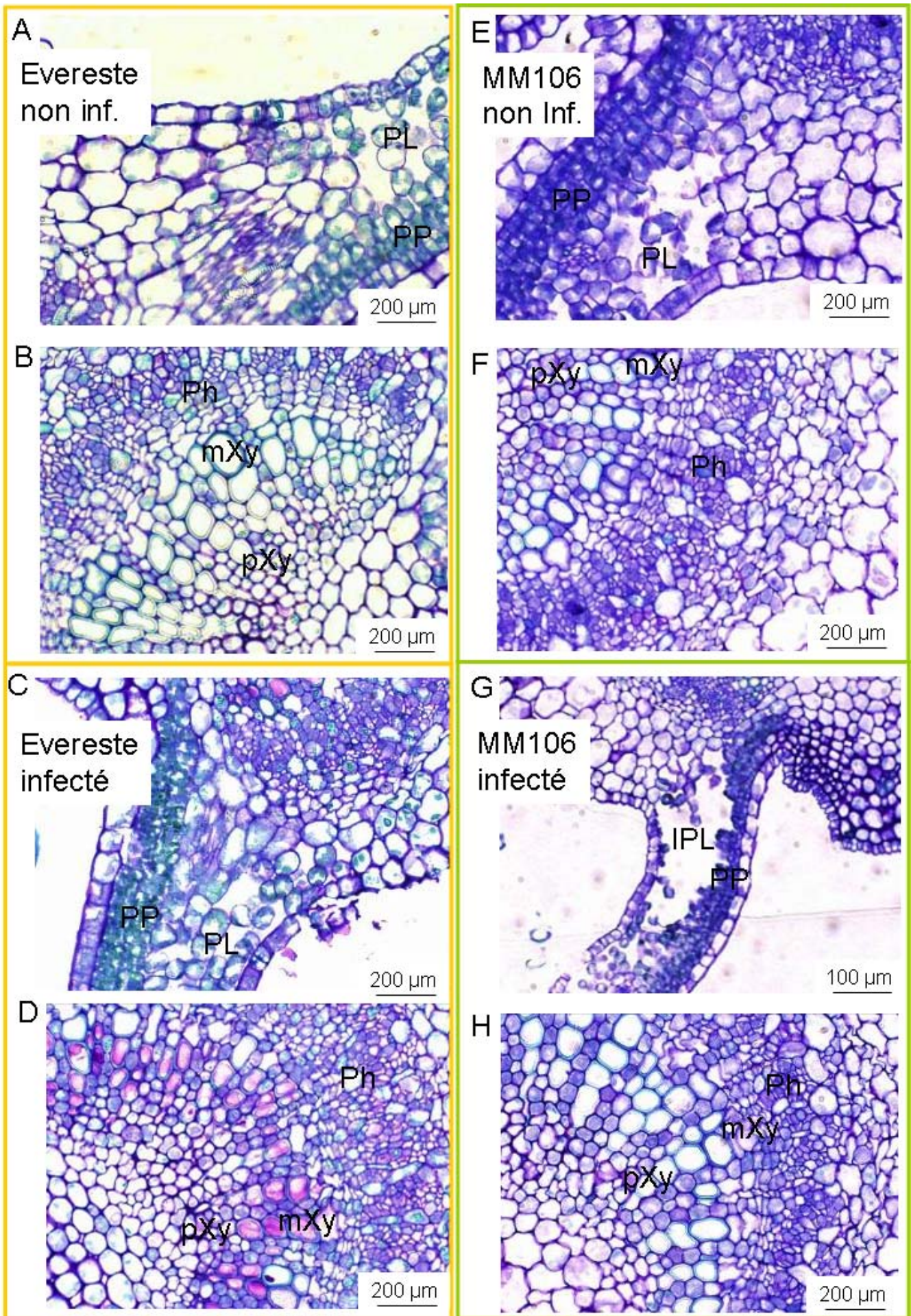


Fig.I.4. Coupes transversales de nervure principale de feuilles saines (A, B, E, F) et infectées (C, D, G, H), d'Evereste (A, B, C, D) et de MM106 (E, F, G, H) 48 hpi. Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine. A, C, E, G détails de l'embranchement nervure/limbe, et B, D, F, H détails de la stèle centrale. PP=parenchyme palissadique, PL=parenchyme lacuneux, LPL=parenchyme lacuneux lysé, Ph=phloème, pXy=protoxylème, mXy=métaxylème.

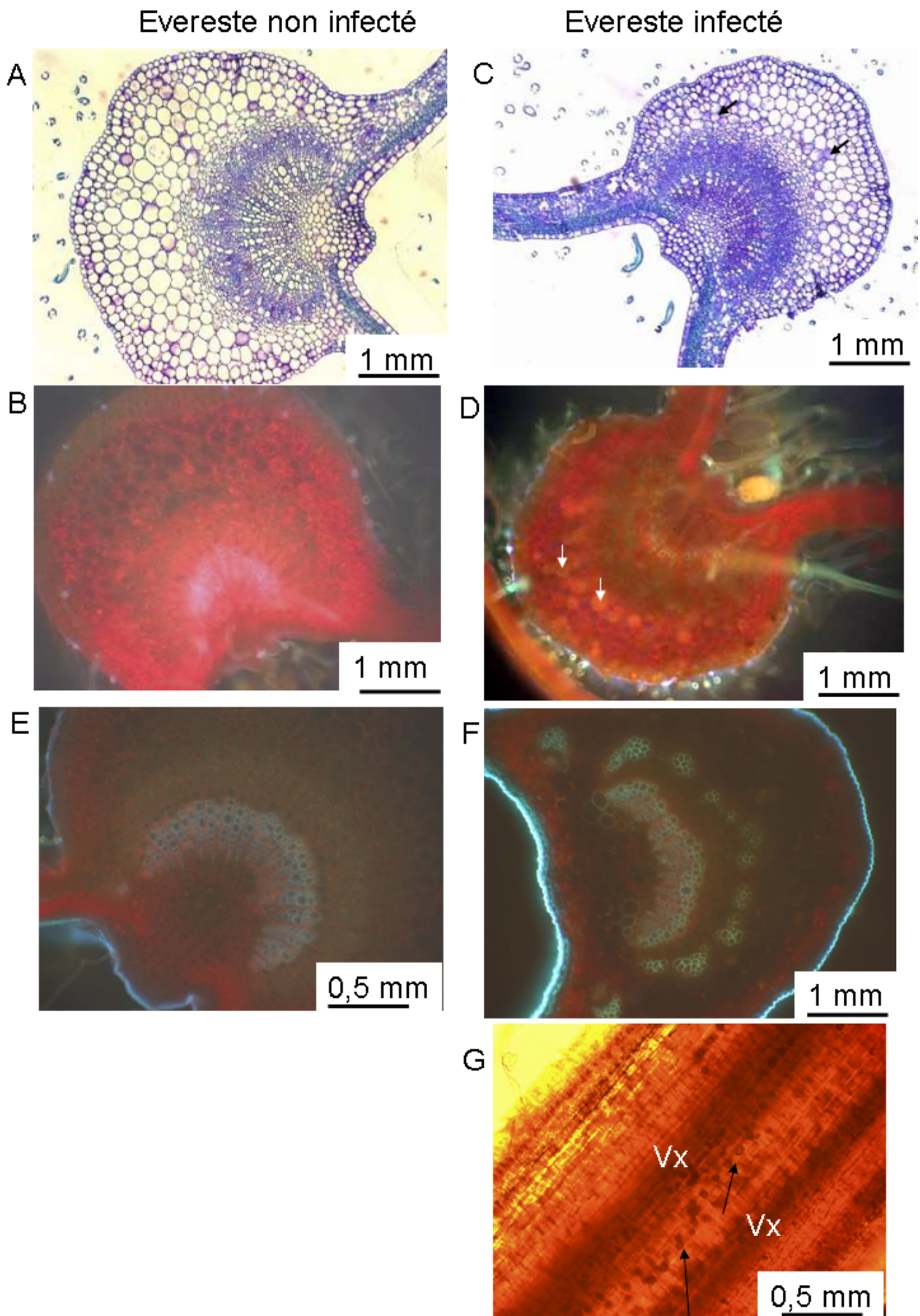


Fig.I.5. Coupes transversales de nervure primaire de feuilles d'Evereste constitutives (non infecté, A, B, E) ou infectées par *Ea* (C, D, F). A et C, coloration au bleu de toluidine. B, D, E et F, observation de l'autofluorescence. La chlorophylle apparaissant en rouge. Les composés phénoliques en bleu ou en jaune. Les flèches indiquent des cellules remplies de composés autofluorescents, E et F, coupes réalisées à la base du pétiole (G), coupe longitudinale de nervure de feuille infectée d'Evereste montrant les vaisseaux conducteurs (Vx) plus en profondeur dans la coupe ainsi que de la présence de tannins dans les vacuoles de quelques cellules (flèches).

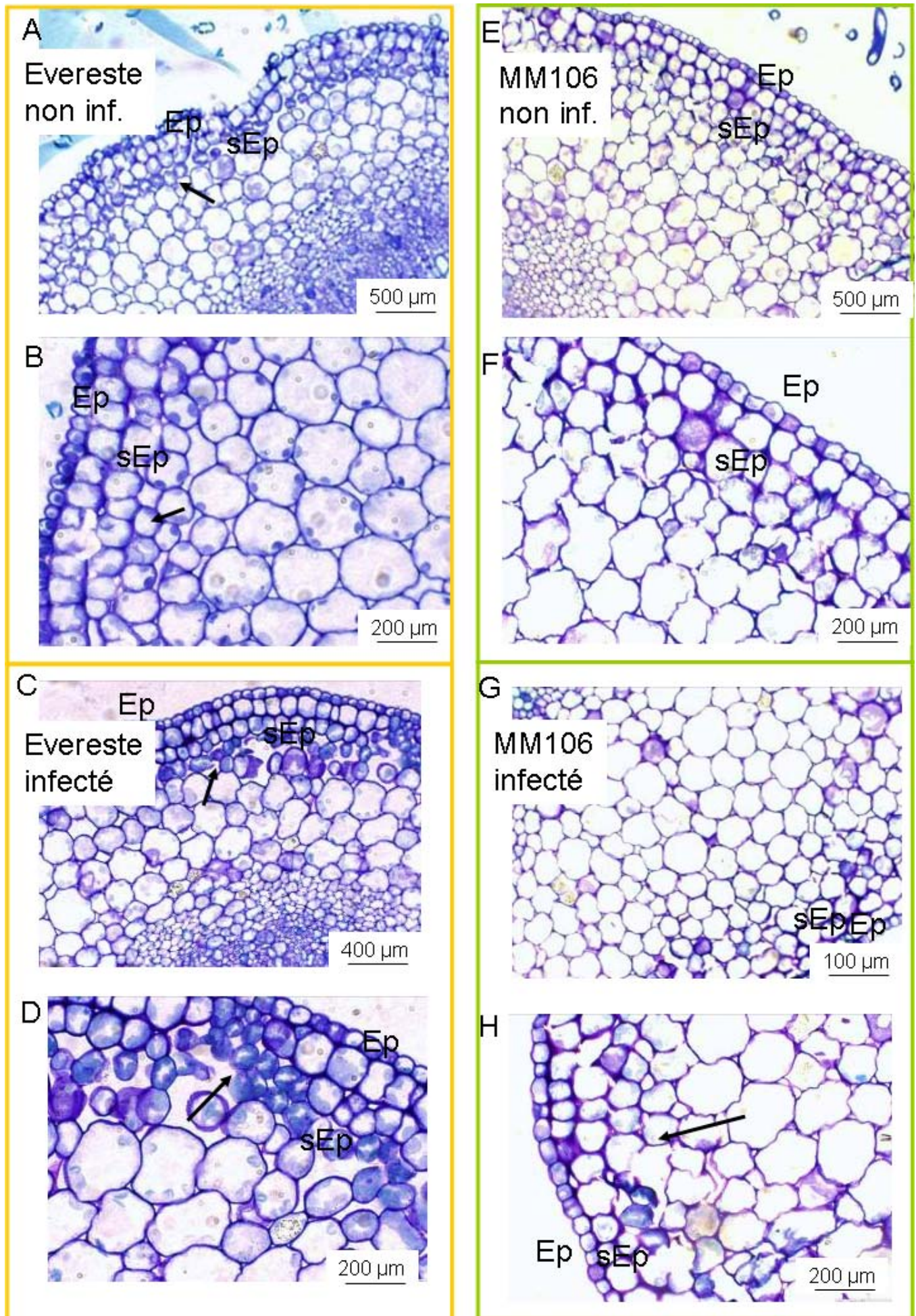


Fig.I.6. Sections de pétioles prélevées 48 heures après infiltration d'eau (non infecté, A,B,E,F) ou d'*Ea* (C,D,G,H). Evereste, A, B, C, D et MM106, E, F, G, H, Ep=épiderme, sEp=sous-épiderme de type collenchyme. A, C, E, G, plans sur l'épiderme et le parenchyme cortical, B, D, F, H, détails du sous-épiderme. Les flèches indiquent les chloroplastes dans les cellules.

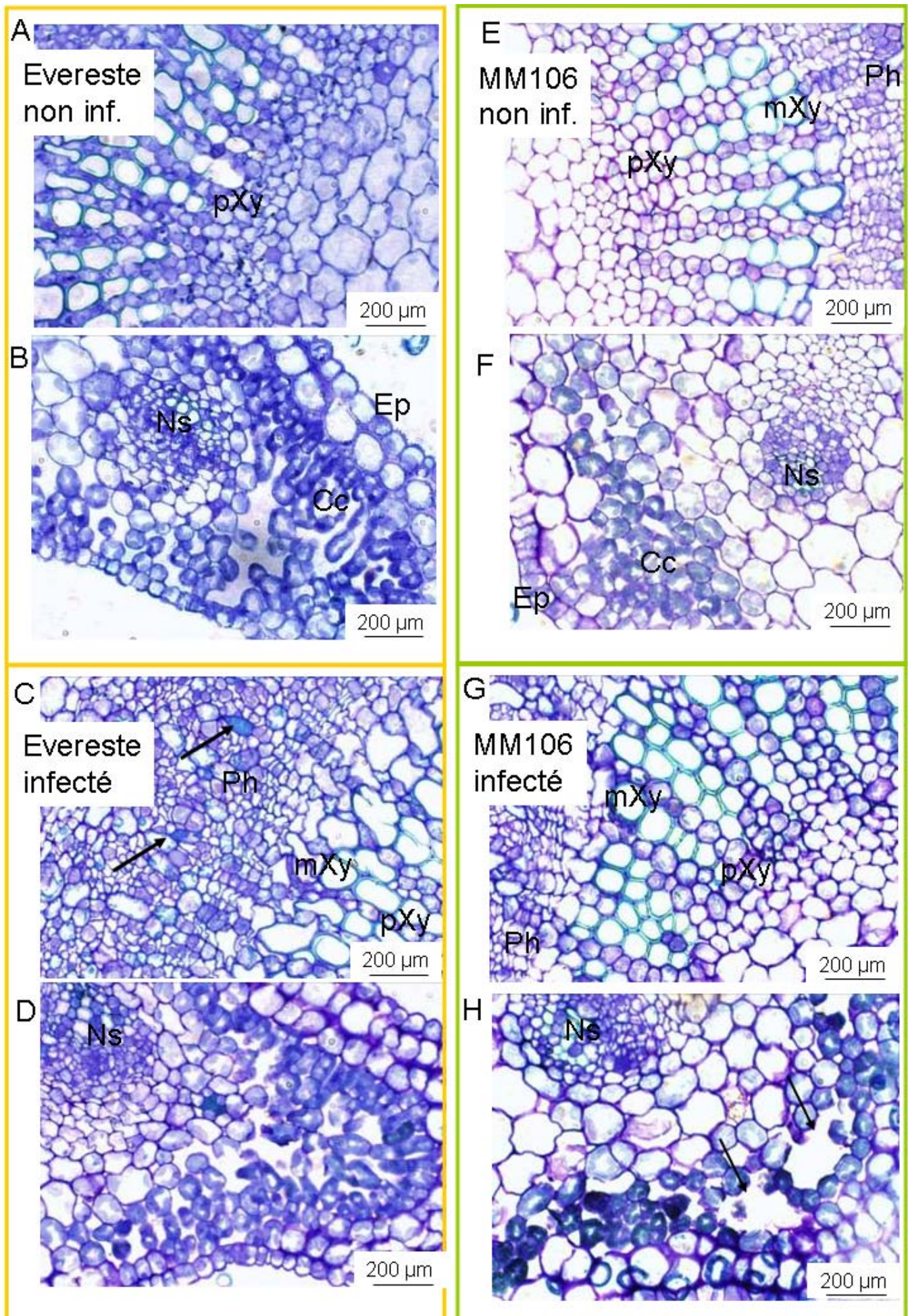


Fig.1.7. Sections de pétioles prélevées 48 heures après infiltration d'eau (A,B,E,F) ou d'*Ea* (C,D,G,H), Evereste. A, B, C, D et MM106, E, F, G, H. A, E, C, G, détails des stèles centrales, B, D, F, H, départ des nervures secondaires et parenchyme cortical, Ns=nervure secondaire, Cc=cellules chlorophylliennes. Flèches en C : cellules remplies de polyphénols, en H: cavités lytiques.

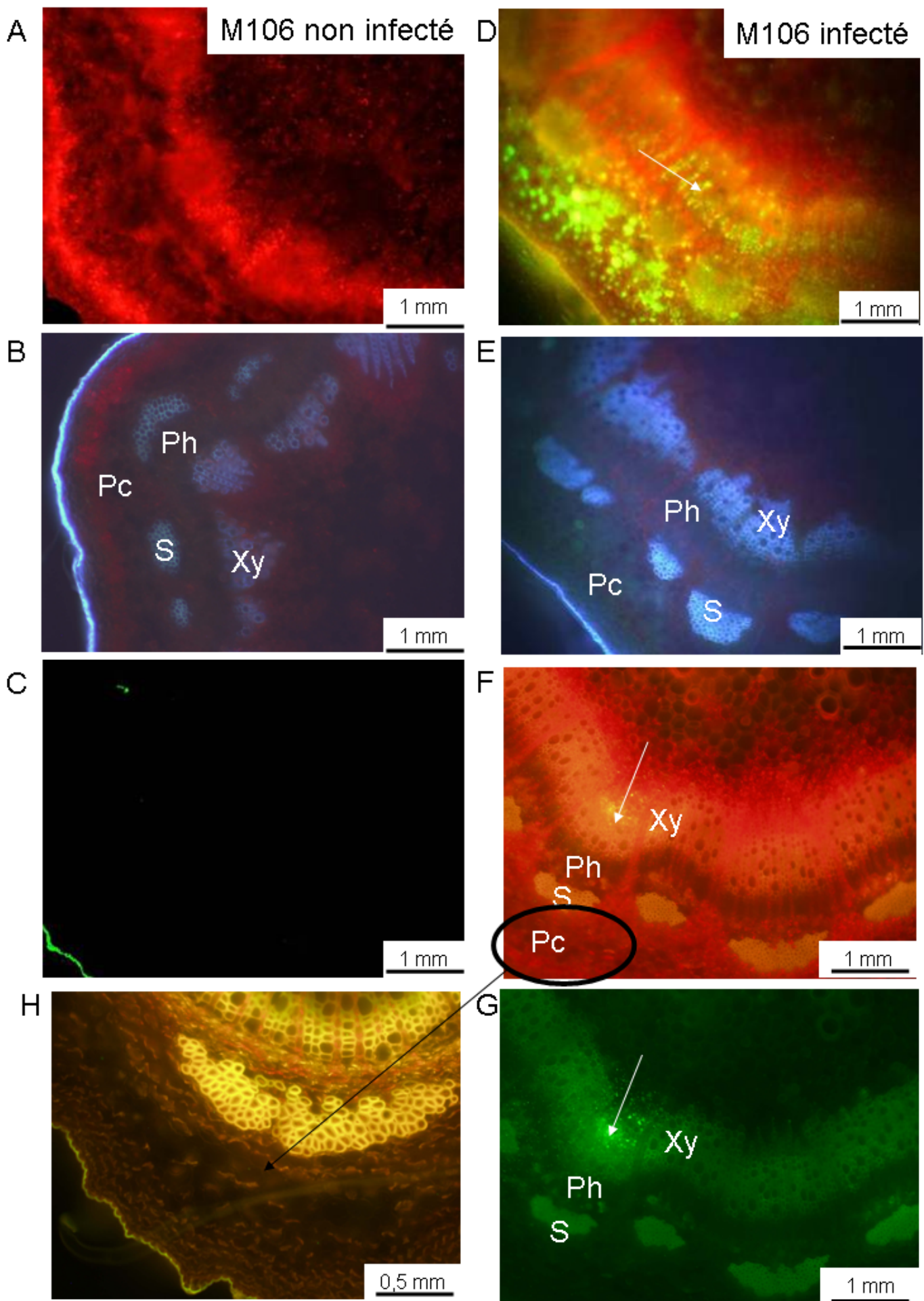


Fig.I.8. Sections de tiges de MM106, saines (A, B, C) et infectées (D, E, F, G), 5 jours après infiltration. Observations en épifluorescence avec les filtres 490 nm (A, D, F), UV 350 nm (B,E) et GFP 504 nm (C,G). H, détail du parenchyme cortical de MM106 infecté, montrant sa déstructuration importante. Flèches blanches=bactérie GFP dans les vaisseaux du xylème (Xy), Ph=phloème, Pc=parenchyme cortical, S=sclérenchyme.

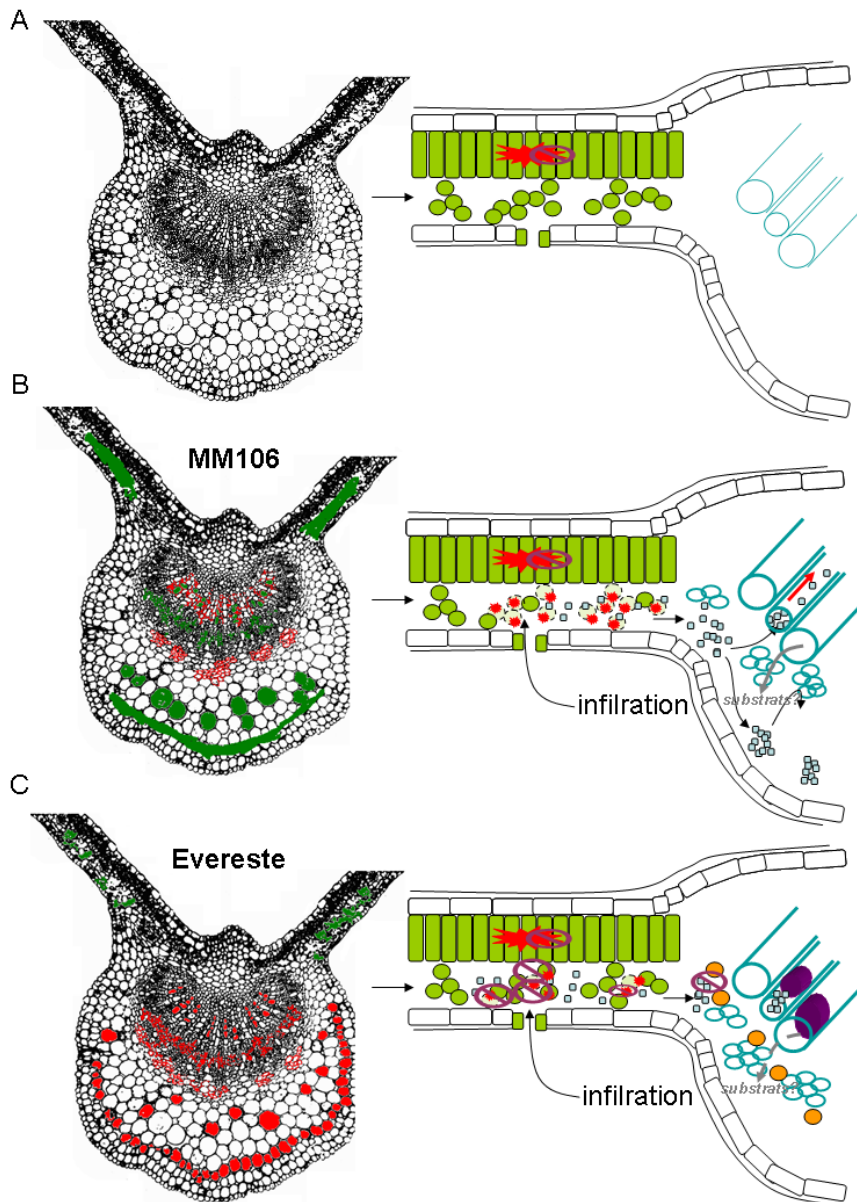


Fig.I.9. Schémas récapitulatifs des observations histologiques sur l'interaction: A=MM106/Evereste non infecté, B=MM106 infecté, C=Evereste infecté; en vert, les régions où la bactérie a été détectée majoritairement; en rouge, les régions ayant subi des renforcements ou enrichissements en polyphénols. A droite, schématisation de l'interaction et hypothèses. Les cellules du parenchyme palissadique où l'activité photosynthétique est élevée produisent constitutivement des FAO (étoile rouge) ainsi que des flavonoïdes antioxydants et potentiellement antibactériens (symbole interdit mauves). Les bactéries pénètrent au cours de l'infiltration par les stomates et interagissent avec les cellules du parenchyme lacuneux. Dans les deux cas il y a production de FAO (choc oxydant), mais la mort cellulaire progresse chez MM106 tandis qu'elle est contrôlée chez Everest, hypothétiquement par la production de systèmes antioxydants plus performants. *Ea* n'attaque pas le parenchyme palissadique car il contiendrait des produits antibactériens en forte concentration (FAO ou flavonoïdes). Il semble que la bactérie parvienne tout de même à progresser et à atteindre le cylindre central chez MM106, mais rarement chez Everest. A ce niveau, il y a beaucoup d'imprégnation de lignine dans les vaisseaux et les cellules du sclérenchyme. Chez Everest, certaines cellules apparaissent remplies de polyphénols condensés (cellules oranges). Dans le cas de l'interaction avec MM106, la bactérie forme des cavités où elle est présente en très forte concentration et parvient à atteindre les vaisseaux du xylème, par lesquels elle peut être transmise à toute la plante. A l'inverse chez Everest, la bactérie atteint parfois les vaisseaux du xylème, mais elle y est rapidement confinée car des occlusions sont formées. Les occlusions pourraient également avoir pour conséquence une diminution de l'approvisionnement du tissu infecté en eau et en nutriments, susbtrats indispensables à la croissance bactérienne.

| Gène | Gènes d'intérêts | | amorce antisens 5'-3' | | N° accession EST | amorce sens 5'-3' | | N° accession | Nom du transcrit | Score | Couverture moy | e-value | identité |
|------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|--|------|--------------|------------------|-------|----------------|---------|----------|
| | amorce sens 5'-3' | amorce antisens 5'-3' | amorce sens 5'-3' | amorce antisens 5'-3' | | | | | | | | | |
| AO3 | GACAAAGAGAGACGACGAGGAG | TGAATGTGTGTGAGAAGCGGAG | GACAAAGAGAGACGACGAGGAG | TGAATGTGTGTGAGAAGCGGAG | EF491600.1 | Pisum sativum aldehyde oxidase 3 (AO3) mRNA | 434 | 86% | 3.00E-118 | 78% | | | |
| ACO | GTCCGTGGTGGGTAATAC | ACGGAGTGGGTTGATGTG | ACGGAGTGGGTTGATGTG | ACGGAGTGGGTTGATGTG | X77232.1 | P. persica PAO1 for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase | 1348 | 88% | 0.0 | 87% | | | |
| ACL | CGTGTAGACACAGATTGTAGCG | GCCACACAGATAAGAGATAGAGC | GCCACACAGATAAGAGATAGAGC | GCCACACAGATAAGAGATAGAGC | AJ344107.1 | Lupinus albus mRNA for ATP citrate lyase α -subunit (ada gene) | 473 | 66% | 8.00E-130 | 84% | | | |
| ALLJ | CACCTGTCTGTCCCAATCG | AGCAATCTTATCTCTCCCTCTC | AGCAATCTTATCTCTCCCTCTC | AGCAATCTTATCTCTCCCTCTC | FJ786257.1 | Allium sativum allinase mRNA, complete cds | 84.2 | 44% | 1.00E-12 | 82% | | | |
| ANS2 | GCCTCAAGTCCACCACATCG | GAAGTAGTCTCCACACAAAGC | GAAGTAGTCTCCACACAAAGC | GAAGTAGTCTCCACACAAAGC | DQ156905.1 | Malus x domestica anthocyanidin synthase mRNA, complete cds | 1938 | 100% | 0.0 | 100% | | | |
| CAH | AAGGAAGTGAAGGAAAGAGATTTC | TTGGTTGTGTAGCGCTTTGTGC | TTGGTTGTGTAGCGCTTTGTGC | TTGGTTGTGTAGCGCTTTGTGC | FJ554929.1 | Rubus occidentalis cinnamate-4-hydroxylase mRNA, complete cds | 1781 | 77% | 0.0 | 85% | | | |
| CAD | GGAGCCCAAGACAGACTTCAAC | CGCCTTCCACAACTCCCAACAG | CGCCTTCCACAACTCCCAACAG | CGCCTTCCACAACTCCCAACAG | EF685346.1 | Eriobotrya japonica cimamonyl alcohol dehydrogenase 1 (CAD1) mRNA | 1636 | 89% | 0.0 | 91% | | | |
| CALS | GATGAAATTTGGTTGGAAGGG | GCCACACACCTAAAGTAATGTTC | GCCACACACCTAAAGTAATGTTC | GCCACACACCTAAAGTAATGTTC | XM_002283262.1 | PREDICTED: Vitis vinifera similar to Callose synthase 3 (LOC100265625) | 612 | 99% | 6.00E-172 | 86% | | | |
| CAT3 | TCGCTCTTATCCACCTCCAG | CCTGCTCCACCAACAAACAGC | CCTGCTCCACCAACAAACAGC | CCTGCTCCACCAACAAACAGC | AJ466418.1 | Prunus persica mRNA for catalase (cat1 gene) | 816 | 96% | 0.0 | 90% | | | |
| CBP | CGATACTGATGGTAATGAACCTG | GAAGGTCCTGTTAGTAGAGC | GAAGGTCCTGTTAGTAGAGC | GAAGGTCCTGTTAGTAGAGC | AB00681.1 | Fagus cretata mRNA for chlorophyll a/b-binding protein, complete cds | 462 | 70% | 1.00E-126 | 83% | | | |
| CHS | ATTGTGCGCCAGCAGCTGC | AAATCCAGAAGATGAGTCCAGTCC | AAATCCAGAAGATGAGTCCAGTCC | AAATCCAGAAGATGAGTCCAGTCC | EU187156.1 | Malus x domestica clone mch546 chalcone synthase mRNA, complete cds | 780 | 100% | 0.0 | 99% | | | |
| COI | CTGACTTCCCTTAGGACTTGTGG | CAACTGCTCTGGAGGAATCAAC | CAACTGCTCTGGAGGAATCAAC | CAACTGCTCTGGAGGAATCAAC | EU138028.1 | Hevea brasiliensis coronatine-insensitive 1 (COI1) mRNA, complete cds | 372 | 77% | 2.00E-89 | 78% | | | |
| CN853884.1 | AAAAATTTGAACAGGGTACCAGA | CGTGAAGTAAAGTAACCTGTGC | CGTGAAGTAAAGTAACCTGTGC | CGTGAAGTAAAGTAACCTGTGC | EU922186.1 | Geranium carolinianum cytochrome b6 (peb) gene, complete cds; chloroplast | 235 | 100% | 4.00E-59 | 94% | | | |
| CN44885 | CGTGAAGTAAAGTAACCTGTGC | AAGCATCTACGGCGTAAG | AAGCATCTACGGCGTAAG | AAGCATCTACGGCGTAAG | AY078426.1 | Prunus persica defensin protein 1 (DFN1) mRNA, complete cds | 230 | 35% | 2.00E-56 | 90% | | | |
| CN494066 | TGGAGWRGTGTMTTTGGAGAAGC | AGAACCAATGTTGRCARCGC | AGAACCAATGTTGRCARCGC | AGAACCAATGTTGRCARCGC | AF480489.1 | Nicotiana tabacum EDS1 mRNA, complete cds | 73.4 | 10% | 3.00E-09 | 84% | | | |
| EIN3 | CGTATGGCTTGGTTAGG | GCTGAACCCCTTCTCTCC | GCTGAACCCCTTCTCTCC | GCTGAACCCCTTCTCTCC | XM_002308946.1 | Populus trichocarpa ein3-binding Foxo protein 4 (EBF4), mRNA | 333 | 71% | 2.00E-87 | 76% | | | |
| FPPS | TCCTGGTGGTGGTGAAG | CTGCCTCTGTAATCTTGC | CTGCCTCTGTAATCTTGC | CTGCCTCTGTAATCTTGC | U20771.1 | Lupinus albus farnesyl pyrophosphate synthase (fps) mRNA | 1049 | 73% | 0.0 | 82% | | | |
| GPPS | AY1347796 | GTGAGTCTCTGCTGTTGC | GTGAGTCTCTGCTGTTGC | GTGAGTCTCTGCTGTTGC | AB294744.1 | Hevea brasiliensis HbGGPS mRNA for geranylgeranyl-diphosphate synthase, complete cds, note: HBEST_Nr125 | 3296 | 98% | 5.00E-25 | 72% | | | |
| GST | FE96955 | GAGCCCTCATCTCCCTCAATCC | GAGCCCTCATCTCCCTCAATCC | GAGCCCTCATCTCCCTCAATCC | AB040439.1 | Medicago sativa mRNA for glutathione S-transferase | 318 | 95% | 2.00E-83 | 71% | | | |
| HMGR | AY043490 | AACAGGTCAAGAGATTC | AACAGGTCAAGAGATTC | AACAGGTCAAGAGATTC | AY043490.1 | Malus x domestica 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (hmg1) mRNA, complete cds | 3296 | 100% | 0.0 | 100% | | | |
| JAR | CN879199 | GTCCGAGCCGAAAGATAGTTC | GTCCGAGCCGAAAGATAGTTC | GTCCGAGCCGAAAGATAGTTC | XM_002329372.1 | Populus trichocarpa GH3 family protein (GH3-1), mRNA | 322 | 65% | 3.00E-54 | 77% | | | |
| JMT | DR92117 | CGTCCGAGCCGAAAGATAGTTC | CGTCCGAGCCGAAAGATAGTTC | CGTCCGAGCCGAAAGATAGTTC | XM_002510378.1 | Ricinus communis Jasmonate O-methyltransferase, putative, mRNA | 226 | 97% | 2.00E-55 | 68% | | | |
| LAC3 | CV628852 | CGCTTCCCTTCCCAATATCC | CGCTTCCCTTCCCAATATCC | CGCTTCCCTTCCCAATATCC | AY182241.2 | Populus trichocarpa lacasease 1d (LAC1d), mRNA | 215 | 95% | 3.00E-52 | 74% | | | |
| LIM | CV52140 | TCTGCTGAACAATGGAATTAG | GAGGATCTGAAGTGTAAATGC | GAGGATCTGAAGTGTAAATGC | DQ131179.1 | Malus x domestica EE-alpha-farnesene synthase (AFS1) mRNA | 1166 | 100% | 0.0 | 99% | | | |
| LOX2 | CN651675 | GTGGGTATGGAGAGATGG | GGTAGTAGTGGTTAAGTAGTAGTG | GGTAGTAGTGGTTAAGTAGTAGTG | DQ131179.1 | Populus deltoides lipoxygenase LOX2 (LOX2) mRNA, complete cds | 452 | 100% | 3.00E-123 | 76% | | | |
| LTP | CV523837 | ACCGCTGACCCGACAGCTG | TGGTGGAGTGTGATCTGTAGG | TGGTGGAGTGTGATCTGTAGG | AY374225.1 | Malus x domestica allergen Mal d 3 (mald3) mRNA, complete cds | 610 | 52% | 4.00E-48 | 80% | | | |
| LYTB | AY347830 | AATCATGGCGAGTTGGTC | CTTGATACAGCTAGTTC | CTTGATACAGCTAGTTC | XM_002519566.1 | Ricinus communis 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase putative mRNA | 201 | 54% | 4.00E-48 | 80% | | | |
| NPR1 | CN496210 | AAGAGATGGCAGACTACTTC | CCTCTGATCTTGGCTCTCC | CCTCTGATCTTGGCTCTCC | XM_002300827.1 | Populus trichocarpa NPR1/NIM1-like regulatory protein, mRNA | 291 | 98% | 5.00E-75 | 71% | | | |
| PAL | AF494401 | GGATCTCTCAAAAGTTGTC | CTCACTCTCCCAATTTGTC | CTCACTCTCCCAATTTGTC | DQ230992.2 | Pyrus communis phenylalanine ammonia lyase mRNA, complete cds | 509 | 100% | 6.00E-138 | 97% | | | |
| PIN | AY173139 | CCTCGCTCTCCGACATC | CTCTTTCGCTTCAACAACACTAC | CTCTTTCGCTTCAACAACACTAC | AJ845186.1 | Fragaria x ananassa mRNA for cystatin CP-1 (cp1 gene) | 84.4 | 67% | 1.00E-140 | 78% | | | |
| PK6 | AY347782 | TGCCAGCAAAAGGGTTC | TGCCAAGCCTGAAATTTTC | TGCCAAGCCTGAAATTTTC | NM_126108.1 | ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase (MAPKKK19) mRNA, complete cds | 383 | 89% | 1.00E-102 | 79% | | | |
| PK7 | AY347832.1 | GAGTGTGTTATGGAGTTGGCTGAC | GGAGGAGTGTCTTGGGATGG | GGAGGAGTGTCTTGGGATGG | XM_002521189.1 | Ricinus communis protein kinase, putative, mRNA | 1719 | 100% | 0.0 | 90% | | | |
| PLD | EU295487 | GTCTTACCATGTCACTCATCAACCAG | ATTCTCTCTCTGATCTCCCATTTG | ATTCTCTCTCTGATCTCCCATTTG | EU929810.1 | Prunus persica phospholipase D alpha (PLD) mRNA, complete cds | 143 | 100% | 0.0 | 100% | | | |
| PPO | L29450 | TGCCCGCCGCTCCAC | GCTCCATCGCTTGTAGTATTTGTC | GCTCCATCGCTTGTAGTATTTGTC | L29450.1 | Malus domestica polyphenol oxidase mRNA, complete cds | 3595 | 100% | 0.0 | 100% | | | |
| PR-1 | AF507974 | AGCACAGAGTTCGACTCATAA | CACAAACTACGCCAACCAA | CACAAACTACGCCAACCAA | X12737.1 | Tobacco PR-1a gene for pathogenesis-related protein 1a | 398 | 97% | 2.00E-30 | 70% | | | |
| PR-2 | AF494404.1 | AATTTATATTCGGAGAGTG | TGCCAAGCCTGAAATTTTC | TGCCAAGCCTGAAATTTTC | EF177487.1 | Prunus avium beta-1,3-glucanase 1 (Glu-1) gene, complete cds | 277 | 100% | 2.00E-107 | 87% | | | |
| PR-4 | CN877594 | GAAGGTGCTCTTGGTG | CGTCGGTGTCAATTTGG | CGTCGGTGTCAATTTGG | AF362989.1 | Prunus persica class 4 pathogenesis-related protein mRNA, partial cds | 1532 | 98% | 0.0 | 95% | | | |
| PR-5 | AJ243427 | GCTTCCCTCCGTTGG | CGTAGTCAAGTCCACAC | CGTAGTCAAGTCCACAC | FJ201995.1 | Pyrus pyrifolia thaumatin-like protein (tlp) mRNA | 163 | 75% | 2.00E-36 | 66% | | | |
| SAMT | EX878999 | TTCAGGTTCATCCAGGGTCTTAC | TCAATCAAACTTCCGAGCCCTCAG | TCAATCAAACTTCCGAGCCCTCAG | EU106367.2 | Chimonanthus praecox S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT) mRNA, complete cds | 215 | 39% | 2.00E-52 | 85% | | | |
| SID2 | CN956953 | CTTCTCTCACCAAGTCCACGAG | ACTCACTCGCCCTCCACCAAC | ACTCACTCGCCCTCCACCAAC | XM_002317953.1 | Populus trichocarpa isochorismate synthase (ICS) | 125 | 72% | 0.0 | 78% | | | |
| SOT1 | AY237400 | TTCAATCGACACAAACCGTTC | GGCTATATACCTAGAGGCTTGC | GGCTATATACCTAGAGGCTTGC | AF482011.1 | Prunus cerasus sorbitol transporter mRNA, complete cds | 1267 | 85% | 0.0 | 78% | | | |
| SOT2 | AY237401 | AAGAAATGCTCTCATCCACGAC | CGACAGAGTCTATACCTGACGATG | CGACAGAGTCTATACCTGACGATG | AY100638.1 | Prunus cerasus putative sorbitol transporter (SorT2) mRNA, complete cds | 1243 | 83% | 0.0 | 77% | | | |
| SOT3 | AB125646 | CGGTGAAGCGCTTTCGGAAG | TATGAAGAGCTTGGTGTGCGATG | TATGAAGAGCTTGGTGTGCGATG | AY100638.1 | Prunus cerasus putative sorbitol transporter (SorT2) mRNA, complete cds | 1387 | 74% | 0.0 | 79% | | | |
| SOT4 | AB125647 | GCTGGTATGATATGTTGGTATG | TGAGGCTGCTTGTGATAGATTTGC | TGAGGCTGCTTGTGATAGATTTGC | AY100638.1 | Prunus cerasus putative sorbitol transporter (SorT2) mRNA, complete cds | 1723 | 95% | 0.0 | 80% | | | |
| SUT1-2 | CV882165.1 | CAGTGTCCGATGCTTGG | CACCTGTGGGATTAATTTGC | CACCTGTGGGATTAATTTGC | AY445915.1 | Malus x domestica sucrose transporter (SUT1) mRNA, complete cds | 614 | 100% | 1.00E-172 | 99% | | | |
| SOT5 | CV883659.1 | TGGCAATGTCTTGGCTATG | GCAATGAAGGCAAGTGTGC | GCAATGAAGGCAAGTGTGC | AY445915.1 | Malus x domestica sucrose transporter (SUT1) mRNA, complete cds | 735 | 100% | 0.0 | 93% | | | |
| WRKY TF | AY347836 | AATATACATGGGAGCAAAAGATC | AGATTCAGCATGGAAAGCGC | AGATTCAGCATGGAAAGCGC | XM_002513542.1 | Ricinus communis WRKY transcription factor, putative, mRNA | 145 | 81% | 5.00E-31 | 71% | | | |
| α C2H2-FT | CV465935 | TTGCTTCAGAAAGCTGCTCA | TCAATTTCCACCTCTGTGTA | TCAATTTCCACCTCTGTGTA | XM_002521831.1 | Ricinus communis zinc finger protein, putative, mRNA | 104 | 28% | 2.00E-18 | 75% | | | |
| actin2 | CV151413 | CAACCTCTGCTGTGATAATG | GCATCCTTCTGTCCCATCC | GCATCCTTCTGTCCCATCC | XM_0022298946.1 | Populus trichocarpa actin 2 (ACT2), mRNA | 852 | 94% | 0.0 | 88% | | | |
| GAPDH | CN494000 | CTTGTCTCCGCTTCC | CGTAGTTCACCTCCATTTGC | CGTAGTTCACCTCCATTTGC | J05223.1 | M.cristallinum glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD-GAPDH) mRNA, complete cds | 562 | 90% | 1.00E-166 | 85% | | | |
| TUA | CO065788 | GTTCAATGCTGTTGGTGGTG | CTGCGAGGAAAGGATAGATGG | CTGCGAGGAAAGGATAGATGG | XM_002297595.1 | Populus trichocarpa tubulin alpha-4 chain (TUA4), mRNA | 700 | 100% | 0.0 | 86% | | | |

Tableau I.2. Gènes de Pommier dont l'expression a été suivie par qPCR dans des feuilles d'Evereste et de MM106 au cours de différentes conditions. Les amorceurs dessinés pour la qPCR sont indiquées ainsi que les n° d'accèsion des EST de Pommier à partir desquels elles l'ont été. Les résultats de BLASTn sur la banque de donnée du NCBI Nucleotide collection (nr/nt) obtenus après clonage de chacun des amplicons sont également indiqués,

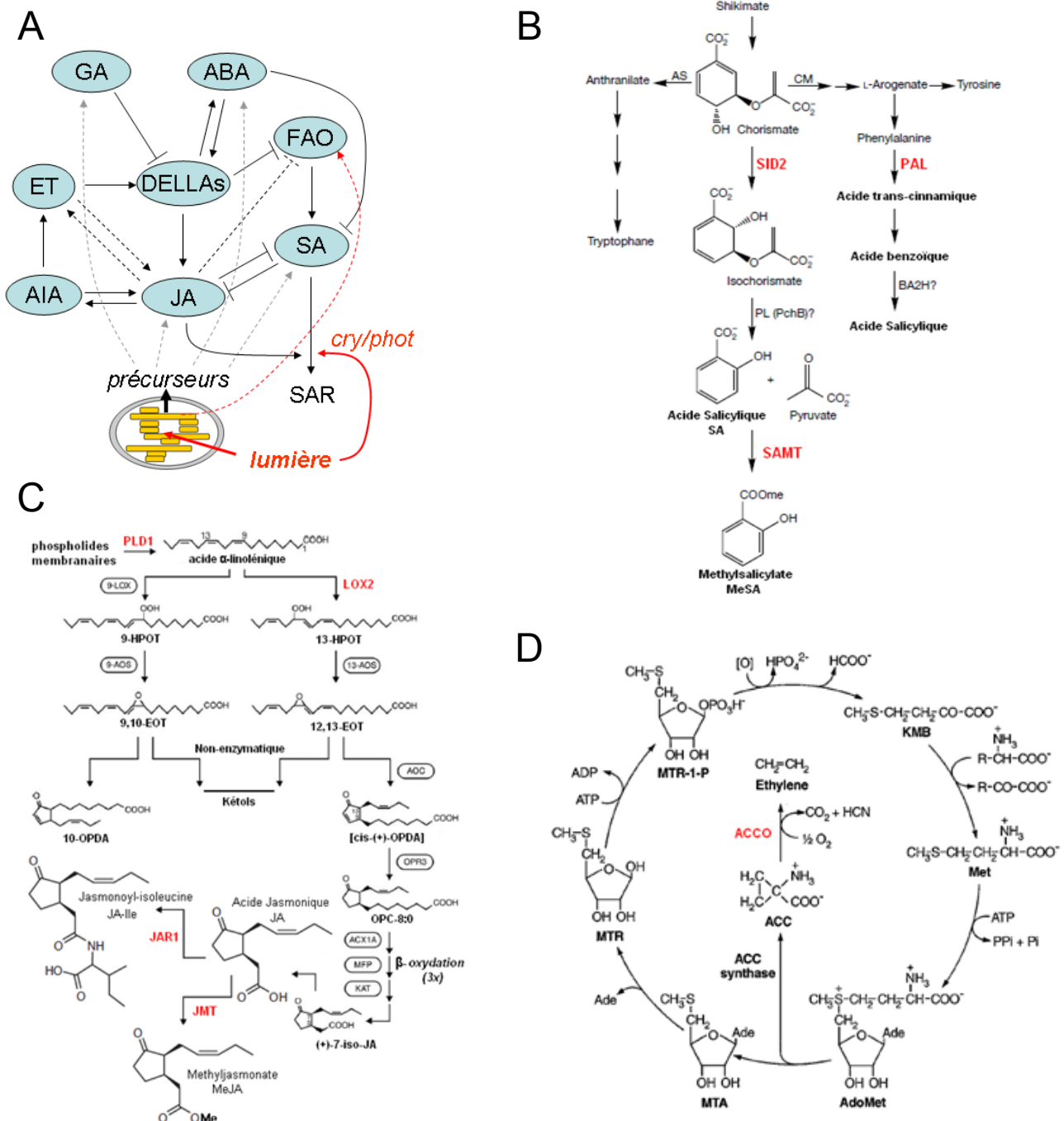


Fig.1.10. (A) Aperçu du réseau de régulation hormonal des défenses chez les plantes. Les principales hormones exercent un rôle modulateur (AIA=auxine, ABA=acide abscissique, GA=gibbérellines) ou régulateur fort (SA=acide salicylique, JA=acide jasmonique, ET=éthylène). Les formes actives de l'oxygène (FAO) sont également impliquées dans ce réseau. Les interactions positives sont représentées par des flèches pleines et les négatives par le symbole d'inhibition. L'interaction entre JA et ET (flèches noires en pointillés) implique à la fois des antagonismes et agonismes. Le chloroplaste occupe une part importante dans ce réseau car il est le lieu de synthèse de plusieurs précurseurs d'hormones (flèches grises en pointillés), ainsi que des FAO et son activité est régulée par la lumière qui elle-même régule l'expression de la SAR (résistance systémique acquise) *via* les cryptochromes (cry) et phototropines (phot). D'après Grant et Jones, 2009 ; Griebel et Zeier, 2008; Vlot et al. 2008. (B) Biosynthèse de l'acide salicylique (d'après Wildermuth et al., 2001), AS=anthranilate synthase, CM=chorismate mutase, BA2H=benzoic acid 2-hydroxylase, PL=pyruvate lyase. (C) Biosynthèse de l'acide jasmonique (d'après Wasternack, 2007 et Browse, 2009); PLD1=phospholipase D, 9/13HPOT=9/13 acide hydroperoxyoctadecatriénoïque, 9,10/12,13EOT=9,10/12,13 acide époxyoctadecatriénoïque, OPDA=acide cis-(+)-12-oxophytodiénoïque, OPC=acide 10,11-Dyhydro-12-oxophytodiénoïque. (D) Biosynthèse de l'éthylène (d'après Blecker et Kende, 2000), ACC=acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, AdoMet=S-adenosyl-L-méthionine, MTA=5'-méthylthioadénosine, MTR=5'-méthylthioribose, MTR1P=5'-méthylthioribose-1-phosphate, KMB=2-oxo-4-méthylthiobutyrique acide, Met=méthionine. Les gènes codant les enzymes indiquées en rouge ont été suivis par qPCR au cours de l'interaction.

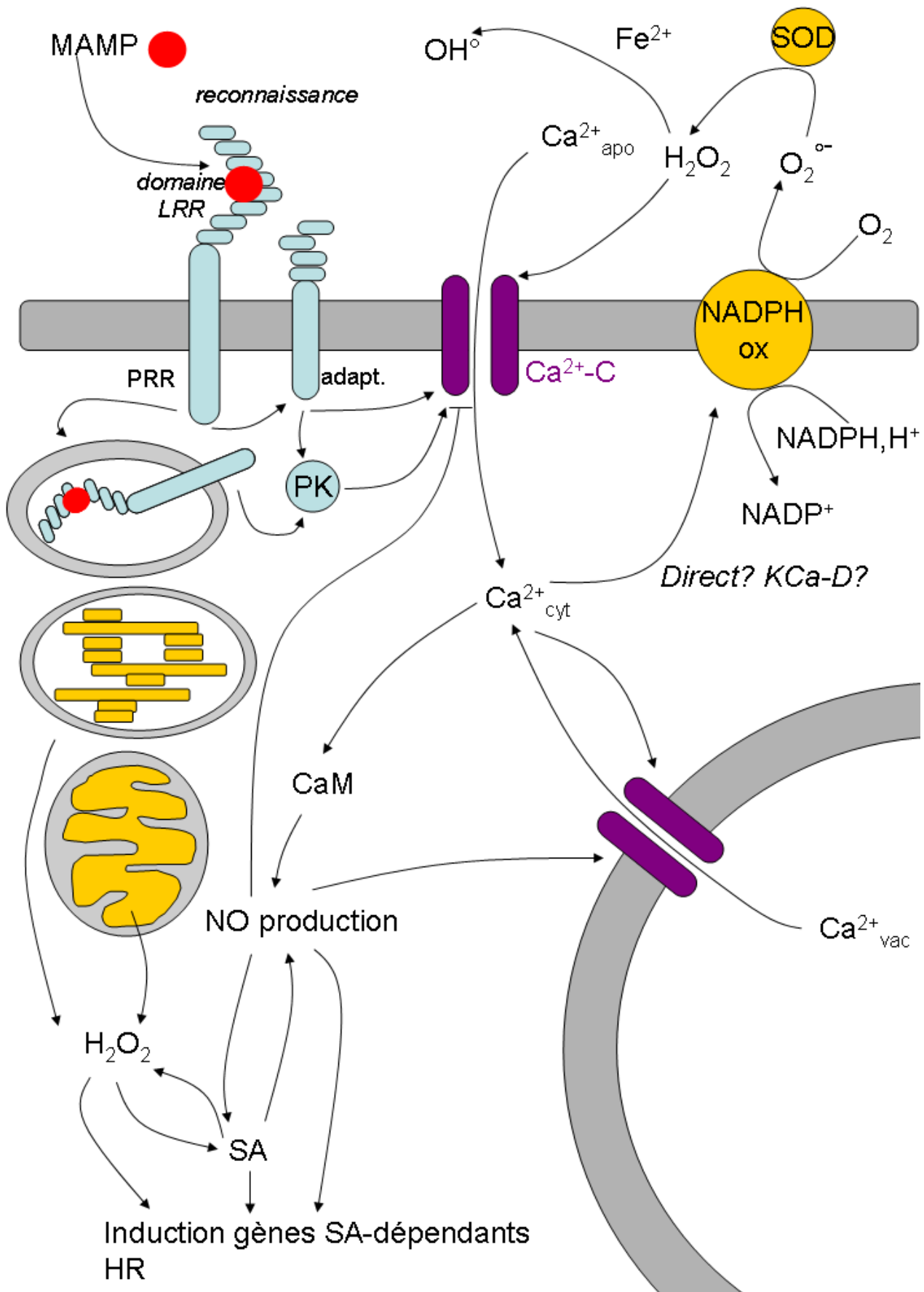


Fig.I.11. Évènements précoces liés à la reconnaissance d'un MAMP (en rouge), pouvant provoquer l'internalisation du complexe récepteur/ligand, et impliquant des cascades de phosphorylation. La mobilisation du calcium (violet), des calmodulines kinases calcium-dépendantes. Le NO et les ROS (sources en jaune), PRR = pattern recognition receptor, CaM = calmoduline kinase calcium-dépendante, KCA-D = kinase calcium dépendante, Ca^{2+} -C = canal calcique.

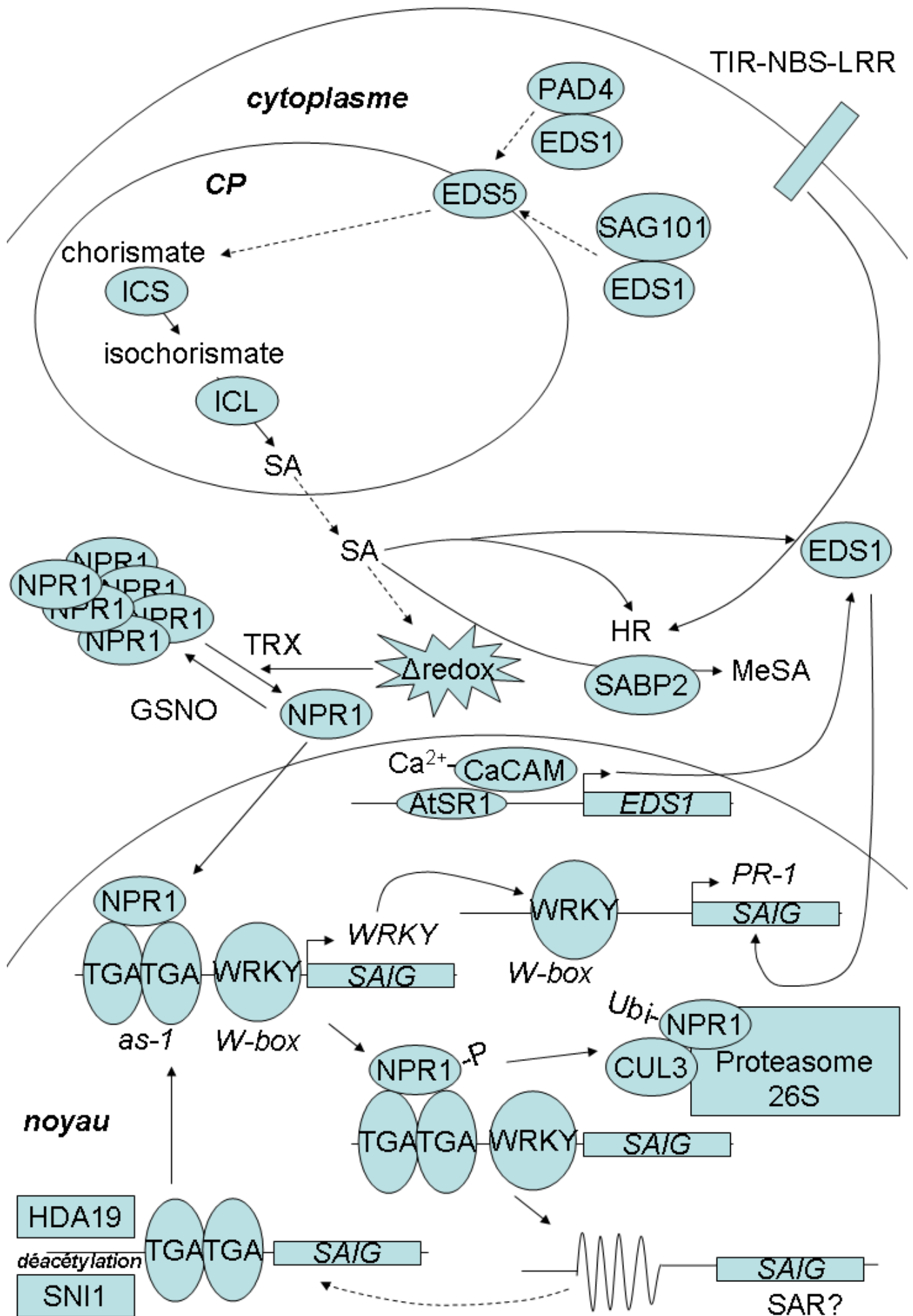


Fig.I.12. Voie de signalisation de l'acide salicylique, CP = chloroplaste, GSNO = S-nitroglutathion, TRX = thioredoxine, Ubi = ubiquitine, SAIG = Salicylate-induced genes.

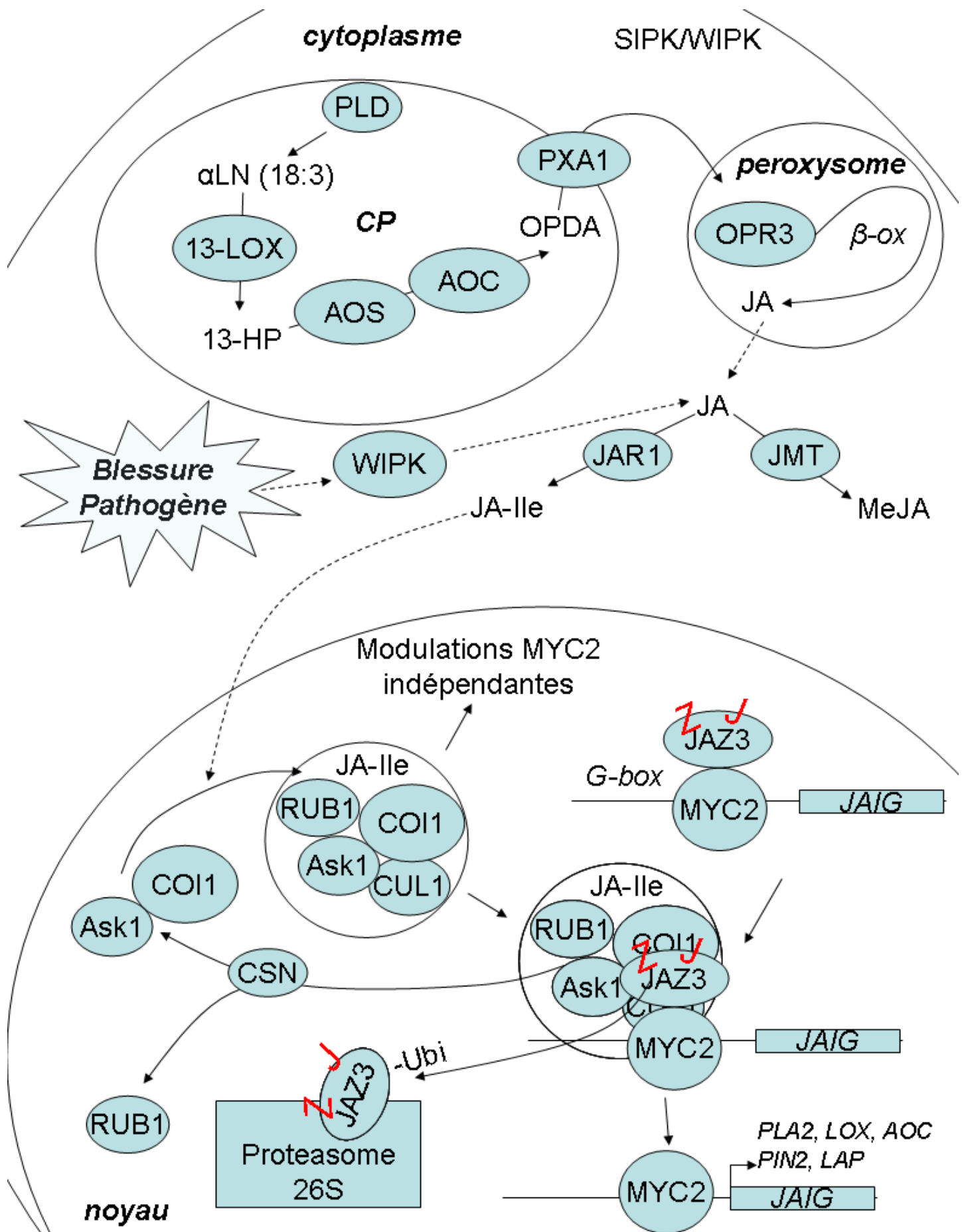


Fig.I.13. Voie de signalisation de l'acide jasmonique, JAIG = Jasmonate-inducible genes. Pour les facteurs JAZ, Z = domaine ZIM, J = domain Jas.

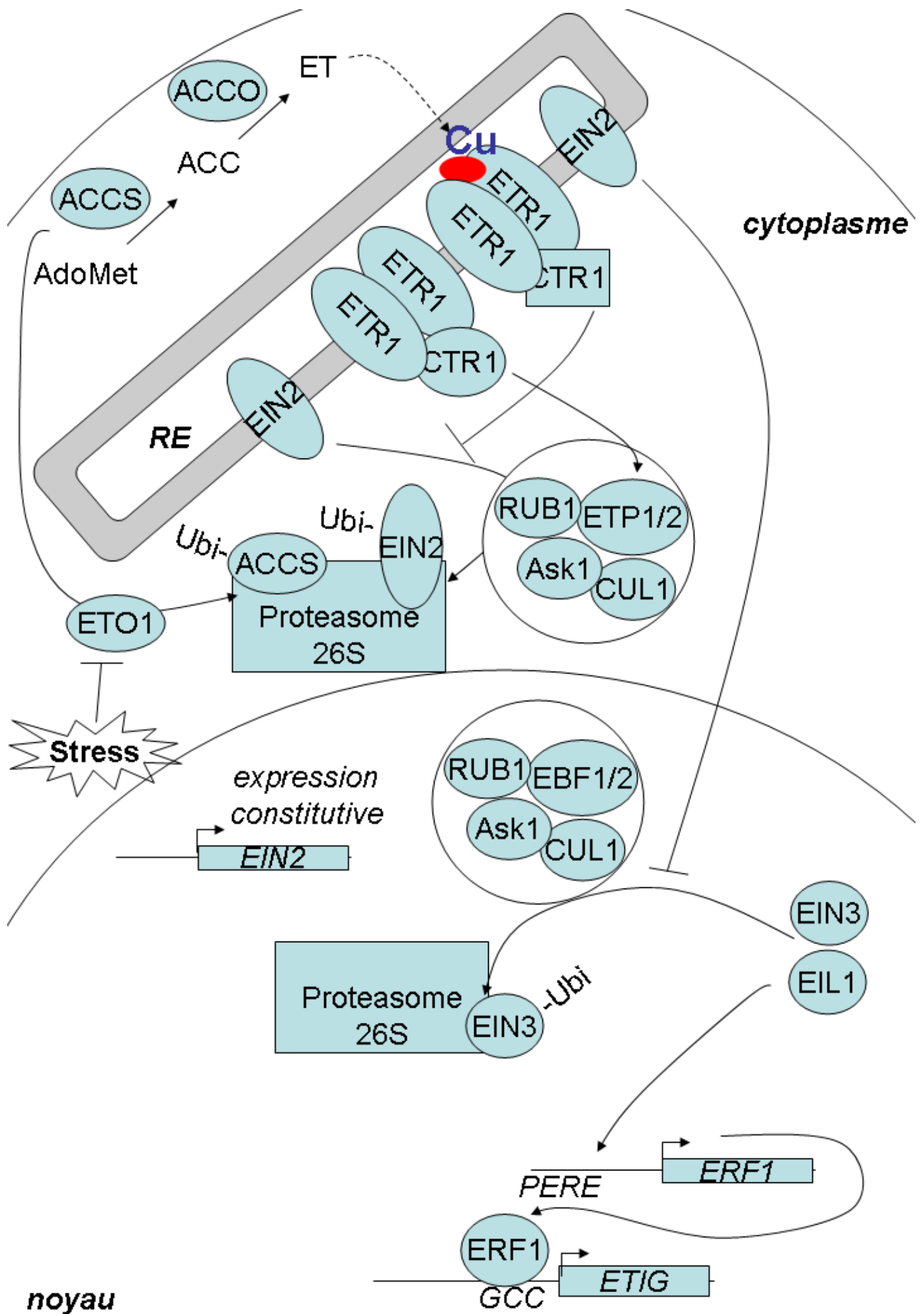


Fig.I.14. Voie de signalisation de l'éthylène, ETIG = ethylene-induced genes, RE = réticulum endoplasmique.

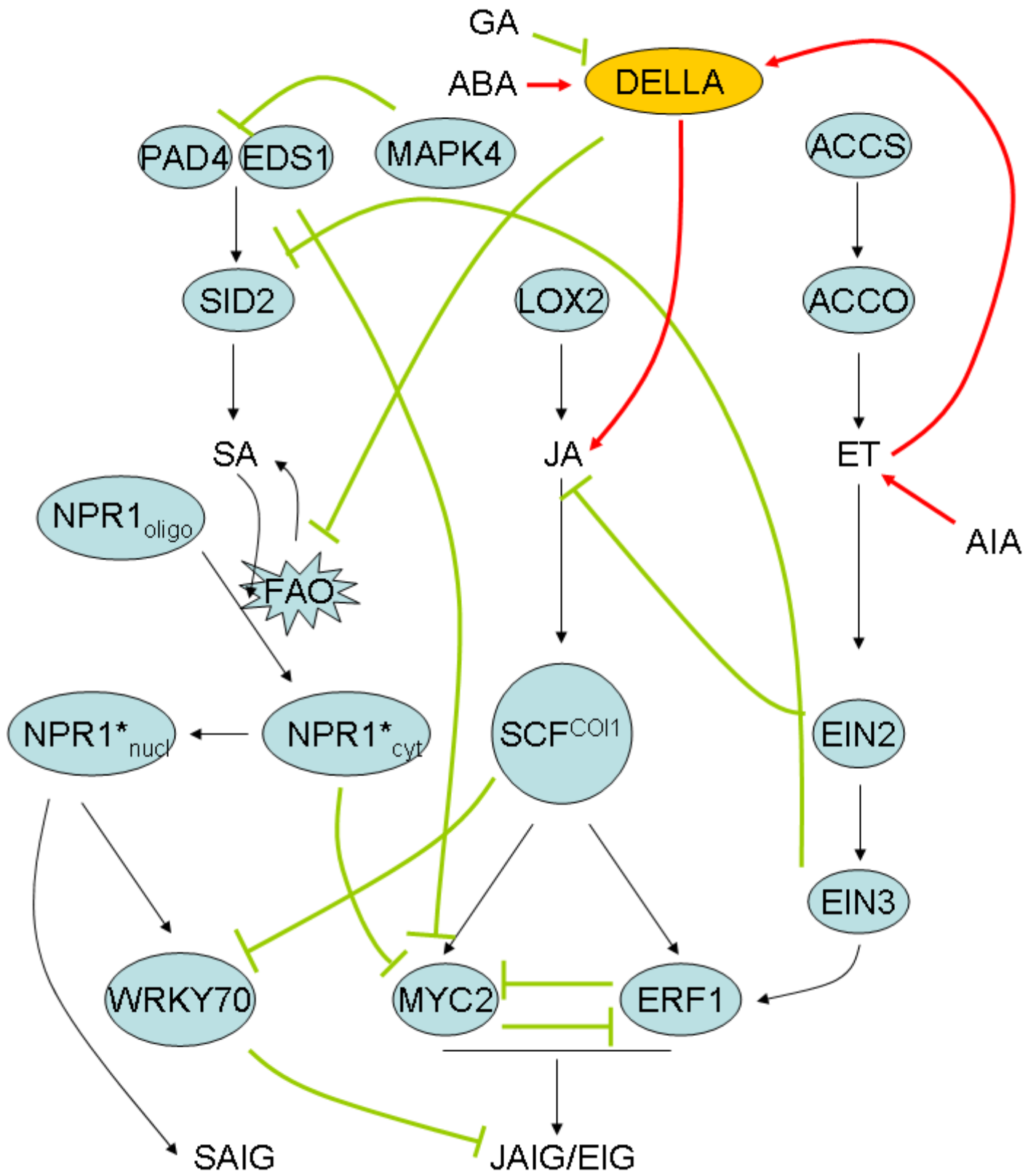


Fig.I.15. Principales interactions entre les voies SA, JA et ET, et modulations exercées par les protéines DELLA et les hormones acide absicissique (ABA), auxine (AIA) et gibbérellines (GA). SAIG = gènes régulés par l'acide salicylique, JAIG = gènes régulés par l'acide jasmonique et EIG = gènes régulés par l'éthylène. D'après Pieterse et al., 2009; Grant et Jones, 2009; Brodersen et al., 2006; Li et al., 2004; Leon-Reyes et al., 2009.

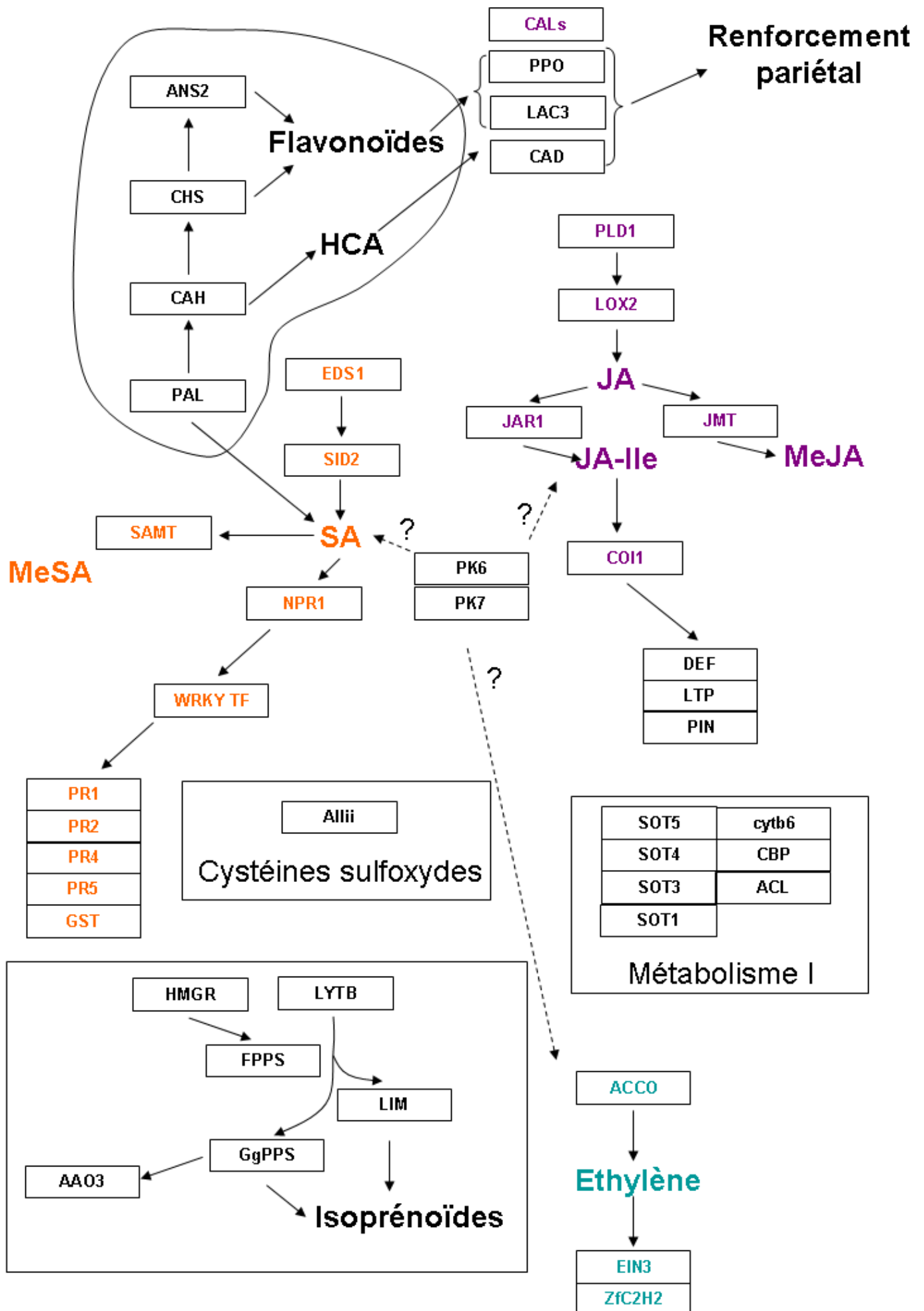


Fig.I.16. Gènes étudiés au cours de l'interaction et leur possible rattachement aux voies de signalisation; SA (orange), JA (violet) et éthylène (vert).

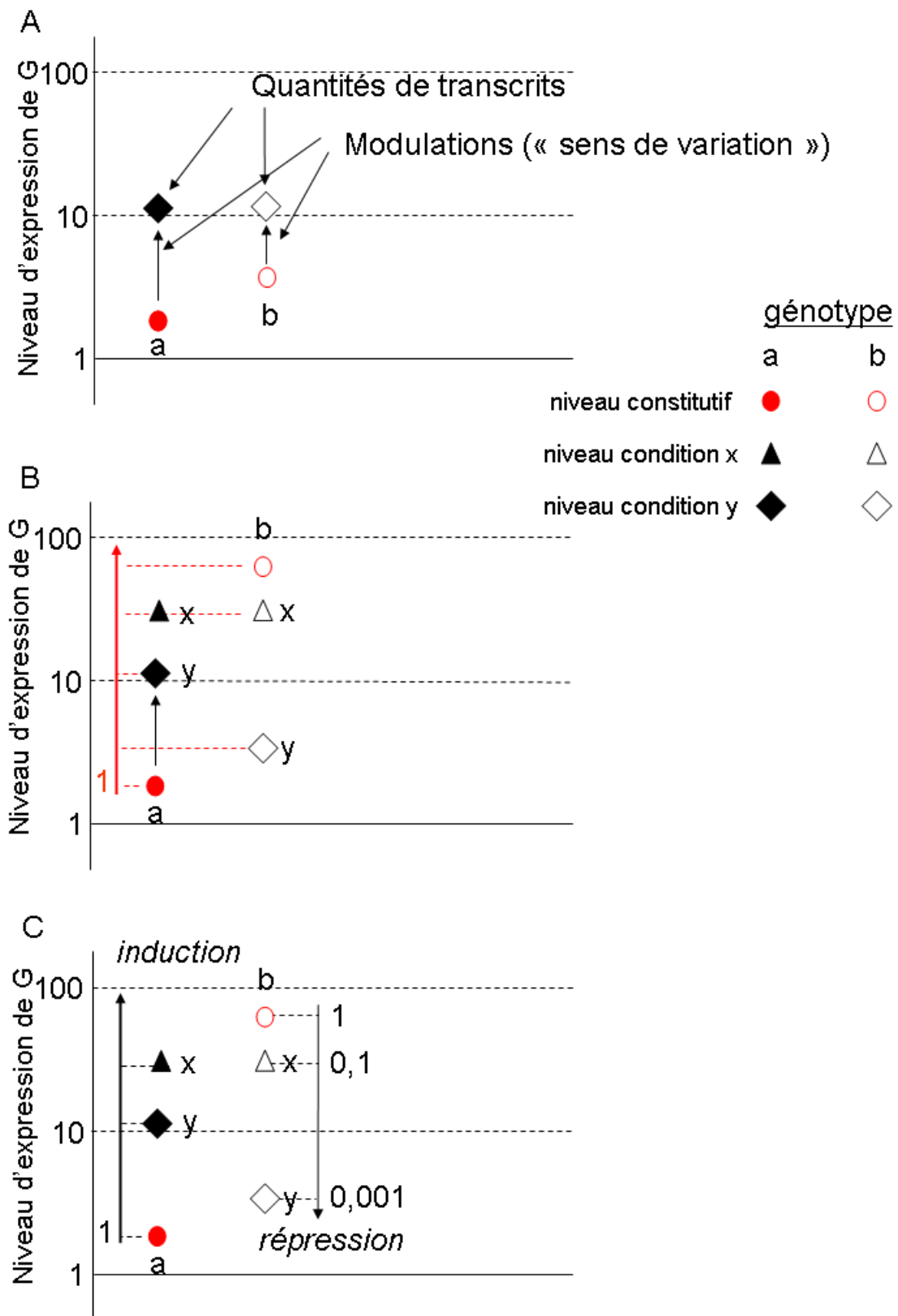


Fig.I.17. Diagrammes représentant les possibilités de calibration des données de qPCR pour un gène G: en rouge, Les niveaux constitutifs des génotypes a (symboles pleins) et b (symboles creux); en noir, Les conditions étudiées, x (triangles) et y (losanges). (A) Définitions des quantités de transcrite et des modulations. (B) Calibration commune à tous les génotypes, avec le niveau d'expression constitutif du génotype a: cet échantillon prend la valeur de 1. Dans ce cas, G est exprimé à un même niveau dans les deux génotypes, pour la condition x, par contre il est plus exprimé dans le génotype a dans la condition y. (C) Les niveaux d'expression du G dans un génotype sont rapportés au calibrateur de ce même génotype (tous les calibrateurs sont donc fixés à 1). Le sens de la modulation peut alors être déterminé au sein d'un même génotype (induction ou répression). D'après les données de (B) et (C), G est plus exprimé dans la condition y chez a que chez b mais G est induit chez a dans la condition y tandis qu'il est réprimé chez b, pour la même condition y,

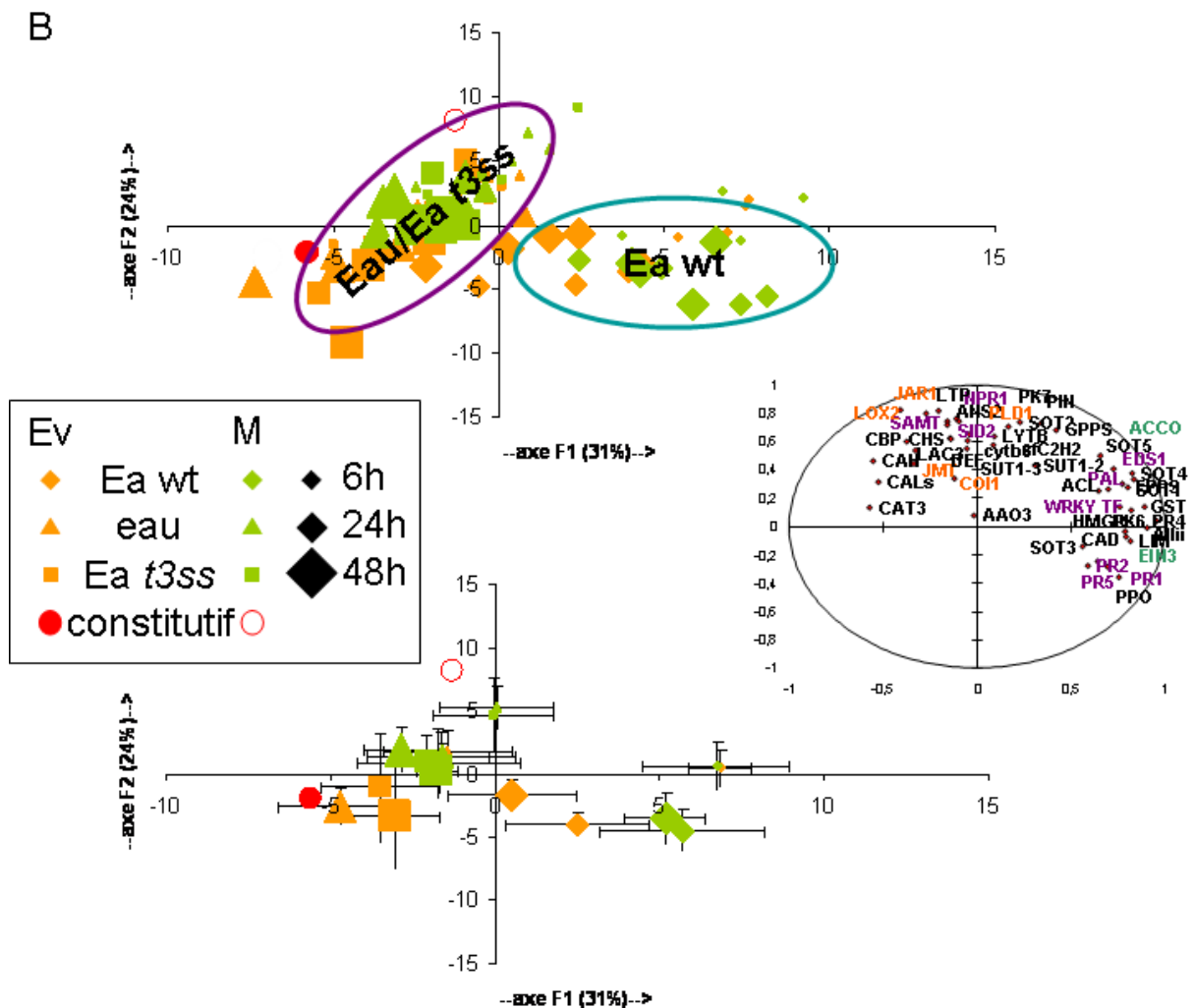
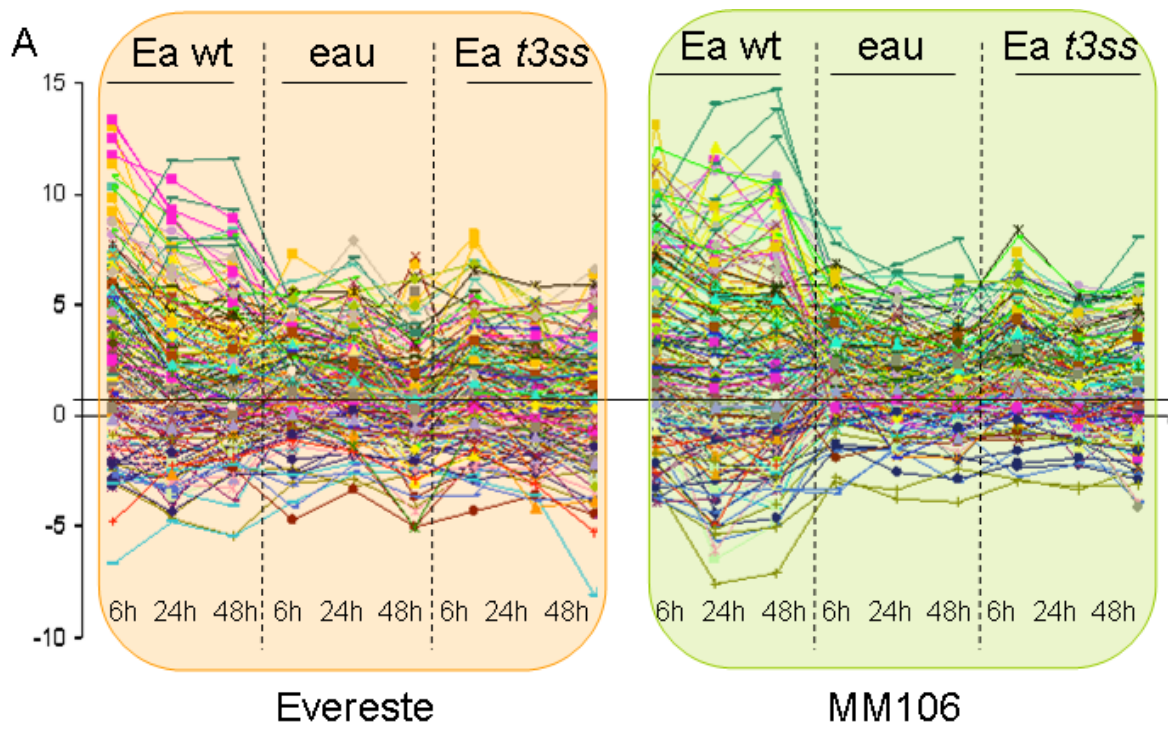


Fig.I.18. (A) Niveaux d'expression relative de chacun des gènes représentés pour chaque répétition biologique; à chaque tracé correspond un gène donné dans une des répétitions. (B) Analyse en composantes principales des 4 répétitions biologiques (en haut), projetées dans le plan F1-F2 (55% de la variance initiale) des variables (gènes). En bas, même plan de projection mais les données ont été moyennées. Les barres horizontales et verticales correspondant à l'intervalle de confiance à 95 %. Le cercle de corrélation des variables est représenté sur le même plan. En violet, les gènes connus pour être SA-dépendants, en vert ET-dépendants et en orange JA-dépendants.

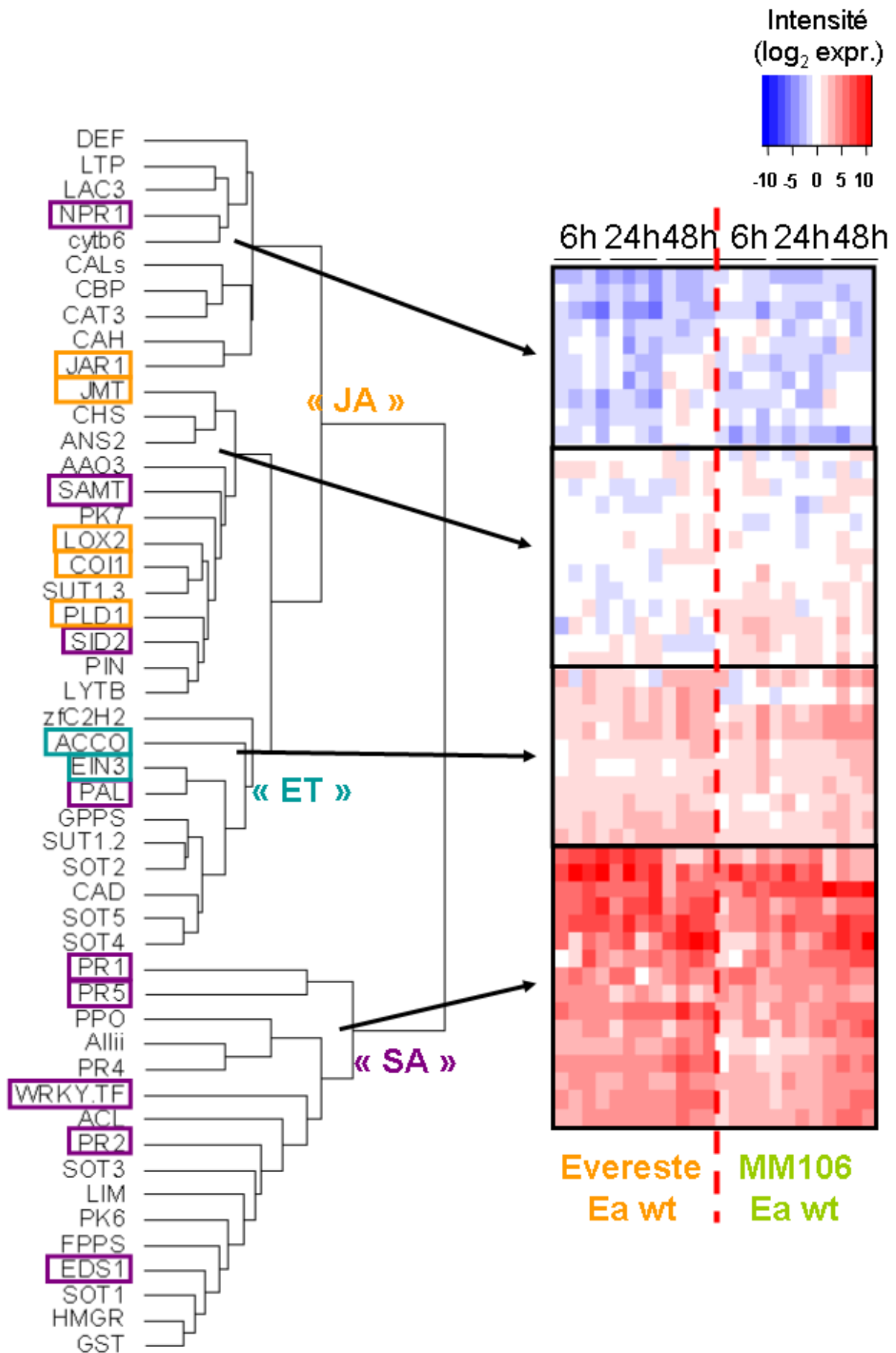


Fig.I.19. Groupage hiérarchique de l'ensemble des gènes. L'arbre a été construit à partir des niveaux d'expressions relatives aux trois temps après infection par la souche sauvage et calibrés par Everest constitutif. Les couleurs violet, vert et orange, désignent respectivement des gènes hypothétiquement marqueurs des voies de signalisation de l'acide salicylique, de l'éthylène et de l'acide jasmonique. Chacun des clusters obtenus avec l'arbre est relié à son profil d'expression (fortement induit, faiblement induit, non modulé, ou réprimé).

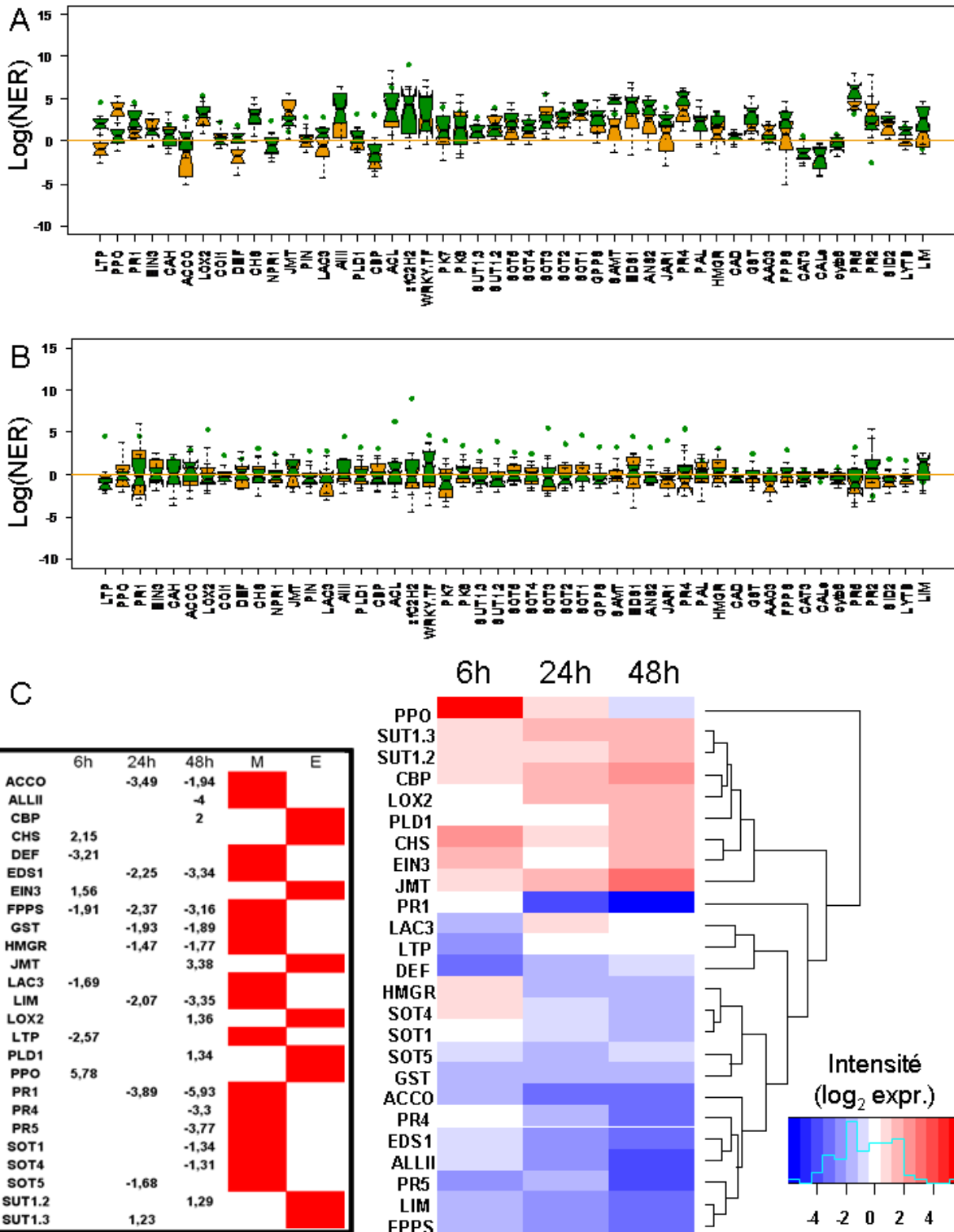


Fig.I.20. (A) Niveaux d'expression relative (NER) des gènes candidats dans les feuilles d'Evereste et de MM106 après infiltration par l'eau (sur les 3 temps), calibrés par rapport à Evereste constitutif. Points verts, M106 constitutif; boxplots verts, M106, et oranges, Evereste. (B) Les NER atteints après infiltration par l'eau ont été retranchés aux NER correspondant après infiltration par *Ea t3ss*. Les valeurs de MM106 constitutif ont également été ajoutées (ronds verts). (C) Différence des niveaux d'expression entre Evereste et MM106, après infection par la souche sauvage d'*Ea*, pris avec un même calibrateur (Evereste constitutif) pour les gènes significativement différentiels entre les deux génotypes. Le tableau indique des différences des expressions moyennes calculées sur les 4 répétitions entre Evereste et MM106 pour les temps où les niveaux d'expression sont significativement différents. Un rectangle rouge est ajouté dans la colonne M ou E si le gène est plus exprimé chez M (valeur négative) ou E (valeur positive) respectivement. Concernant la carte de densité, pour les valeurs en rouge, la différence entre Evereste et MM106 est positive, donc le gène est plus exprimé chez Evereste que chez MM106. Pour les valeurs en bleu, la différence entre Evereste et MM106 est négative, donc le gène est moins exprimé chez Evereste que chez MM106.

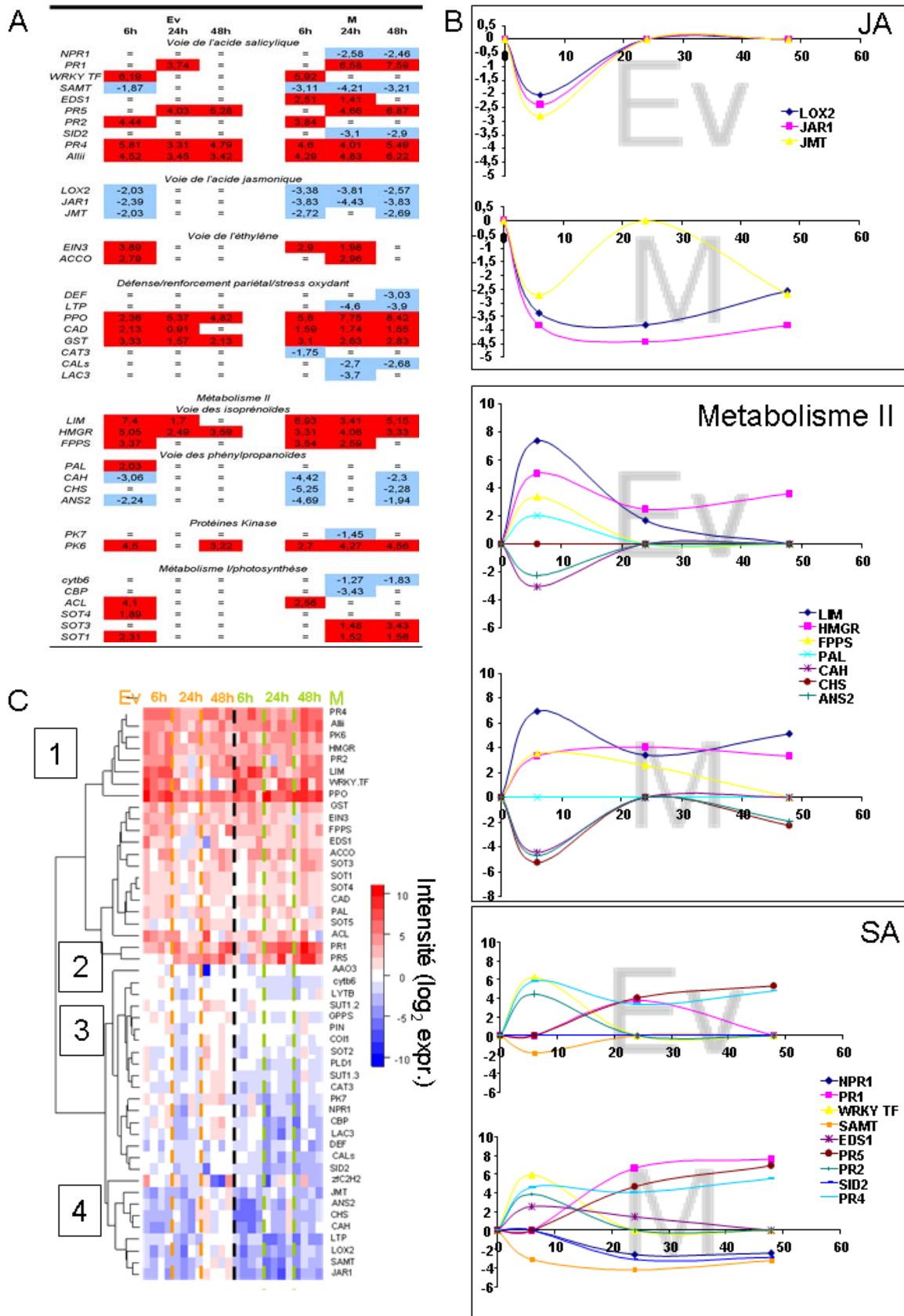


Fig.I.21. (A) Gènes significativement induits ou réprimés par la souche sauvage d'*Ea* pour chacun des génotypes par rapport à son propre niveau constitutif. La valeur indiquée correspond à la moyenne des \log_2 du facteur de modulation de chaque répétition biologique; les gènes induits dans un génotype par rapport à son propre niveau constitutif sont en rouge et en bleu pour les gènes réprimés. Le signe = signifie qu'il n'y pas de différence, au niveau statistique, entre les niveaux constitutif et au cours de l'infection, au temps donné. (B) Valeurs du tableau (moyenne de 4 répétitions biologiques) représentées pour l'acide jasmonique (JA), le métabolisme secondaire et pour l'acide salicylique (SA) sous forme de courbes, en fonction du temps (en heure). (C) groupage hiérarchique des facteurs de modulation présentés en (A) et numérotation des principaux groupes; à chaque temps correspondent 4 répétitions biologiques.

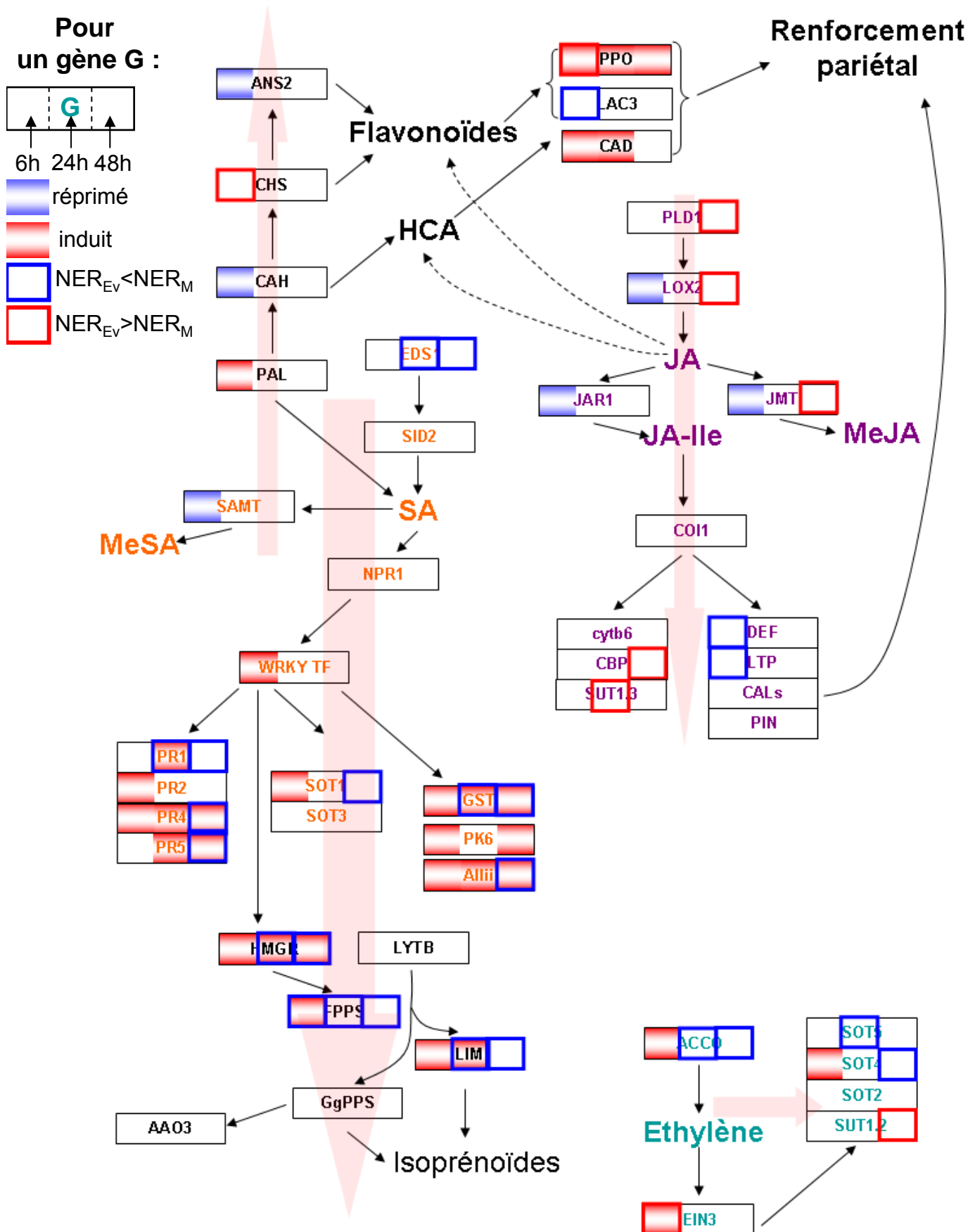
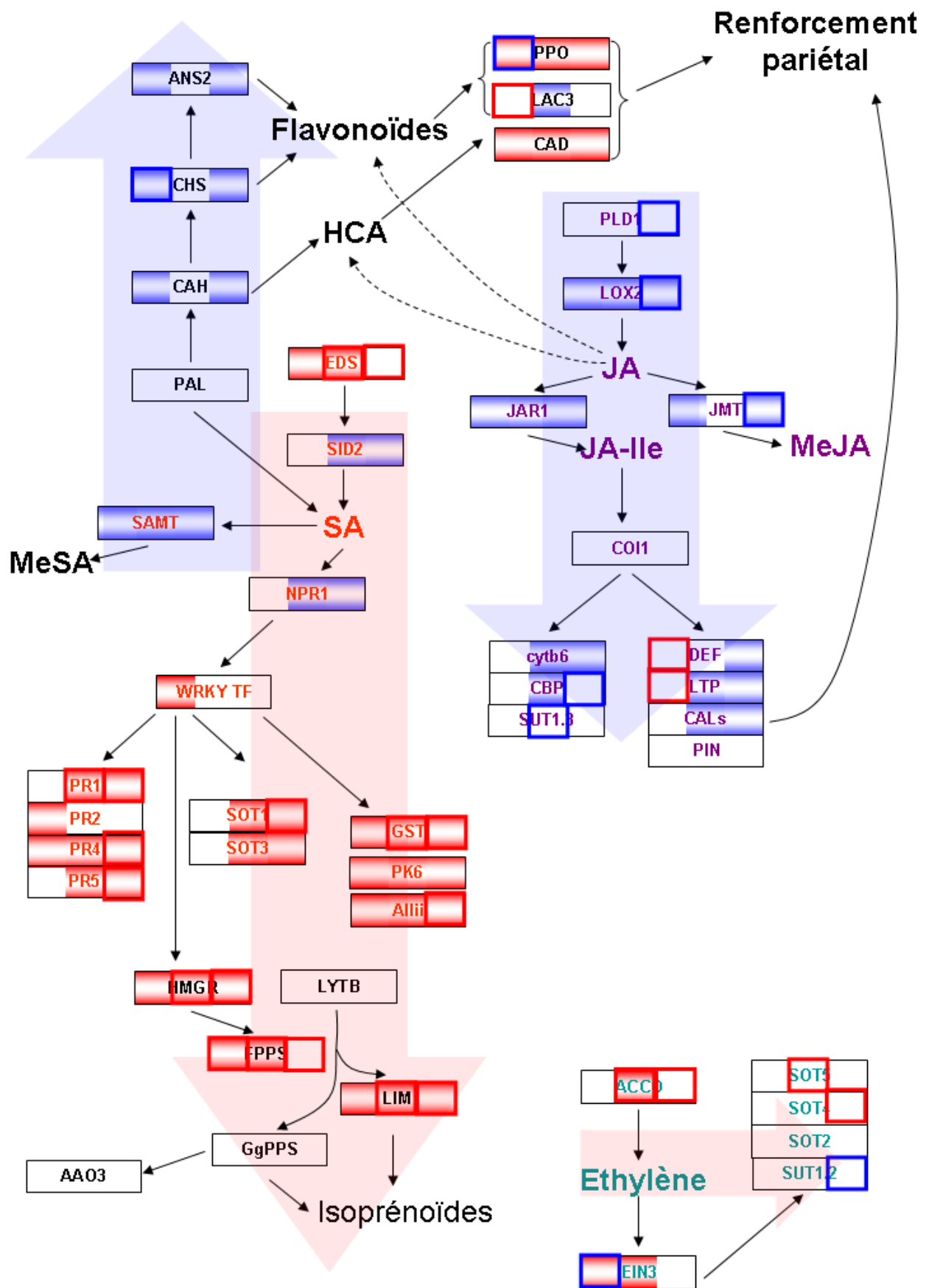


Fig.I.22. Récapitulatif des gènes étudiés et de la manière dont ils se placent les uns par rapport aux autres en fonction des corrélogations décrites dans la Fig.I.19. Chaque rectangle est divisé en trois carrés, correspondant aux trois temps de prélèvement (6, 24 et 48 h après infiltration). La couleur à l'intérieur des carrés indique le sens de variation du gène au temps donné par rapport à son niveau constitutif (d'après Fig.I.21.A), et lorsque les arrêtes d'un carré sont colorées, des différences de niveaux d'expression significatives ont été observées (en rouge, plus exprimé chez Everest, en bleu plus exprimé chez MM106; d'après Fig.I.21.C). (A) Résumé des variations de gènes observées chez Everest. La voie de signalisation de l'acide salicylique est induite modérément, celle de l'acide jasmonique est faiblement induite, et celle de l'éthylène plutôt réprimée.



(B) Résumé des variations de gènes observées chez MM106. La voie de signalisation de l'acide salicylique est fortement induite, celle de l'acide jasmonique fortement réprimée, et celle de l'éthylène plutôt induite.

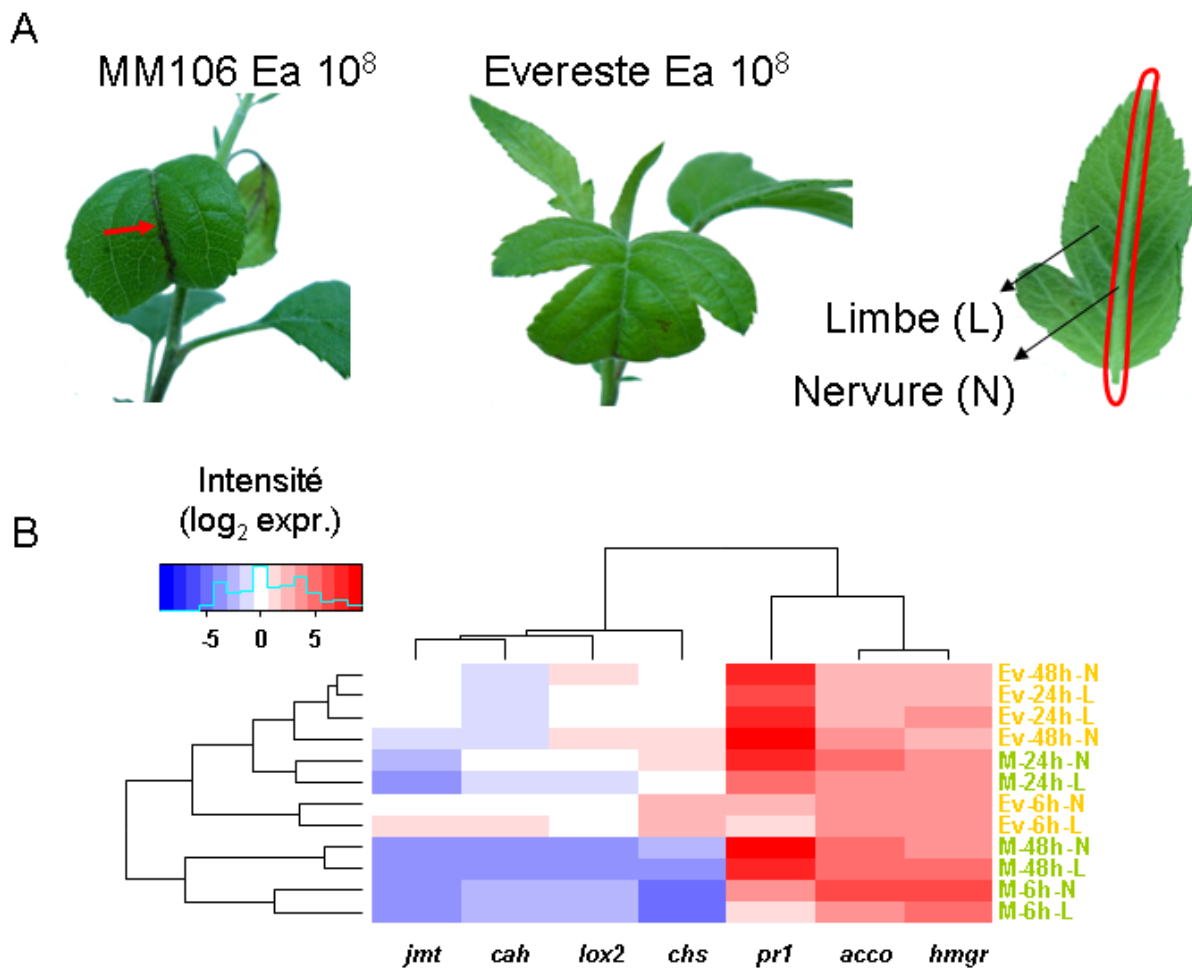


Fig.I.23. (A) Jeunes feuilles de MM106 (à gauche) et d'Evereste (au milieu et à droite), 5 jours après inoculation par coupure avec des ciseaux préalablement trempés dans une suspension d'*Ea* à 10^8 cfu/mL, illustrant la progression des symptômes chez MM106 le long de la nervure principale (flèche). A droite, exemple de prélèvement du limbe et de la nervure sur une jeune feuille d'Evereste. (B) Expression de quelques gènes (calibrés par rapport à Evereste constitutif) marqueurs des voies SA, JA et ET, suivis dans le limbe (L) et la nervure (N) de feuilles infectées d'Evereste (Ev) et de MM106 (M), 6, 24 et 48 h après infiltration de la souche sauvage d'*Ea*.

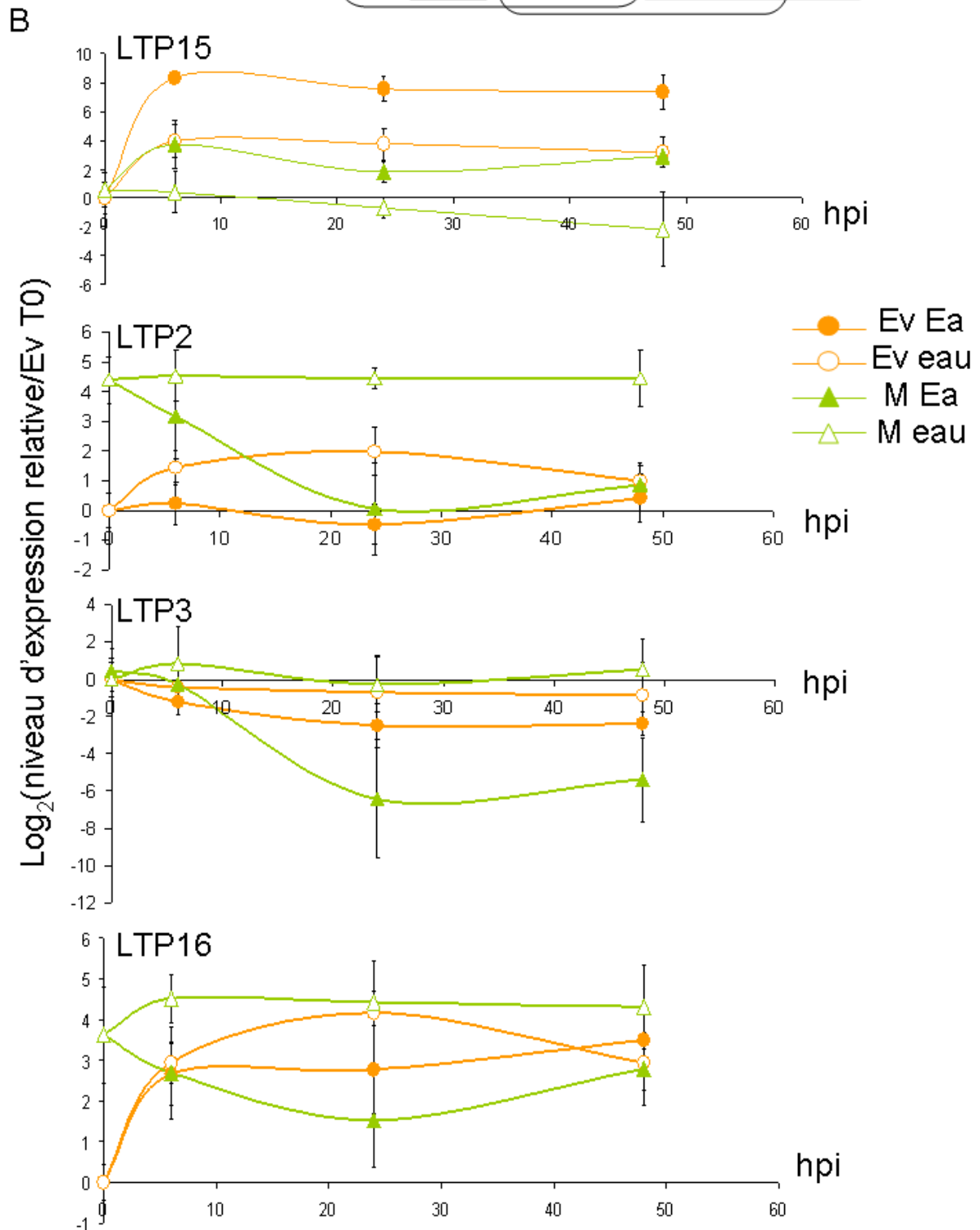
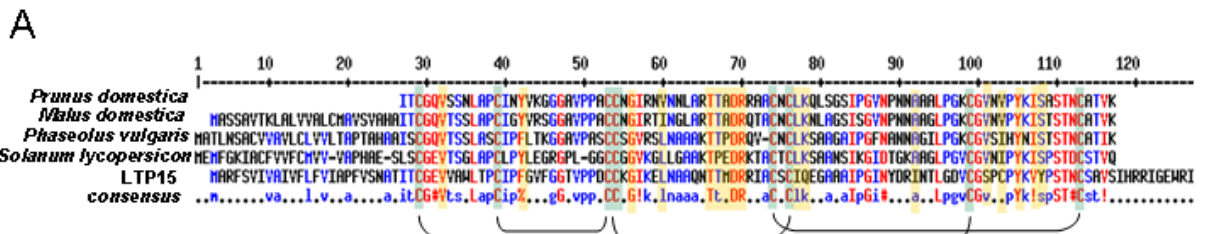


Fig.I.24. (A) Alignement de la séquence protéique hypothétique de LTP15, avec les LTP de *Prunus domestica* (P82534.1), *Malus domestica* (Mal d3, Q9M5X7.1), *Phaseolus vulgaris* (O24440) et *Solanum lycopersicon* (P93224.1). Les 8 cystéines conservées sont surlignées en vert, et les motifs conservés remarquables des LTP1 en jaune (d'après De Oliveira Carvalho et Gomes, 2007). (B) niveaux d'expressions (moyenne et intervalle de confiance sur 4 répétitions biologiques), calibrés par rapport à Everest constitutif, de *LTP15*, *LTP2*, *LTP3* et *LTP16* dans des feuilles d'Evereste (orange) et de MM106 (vert), 6, 24 et 48 h après infiltration par de l'eau ou la souche sauvage d'*Ea*.

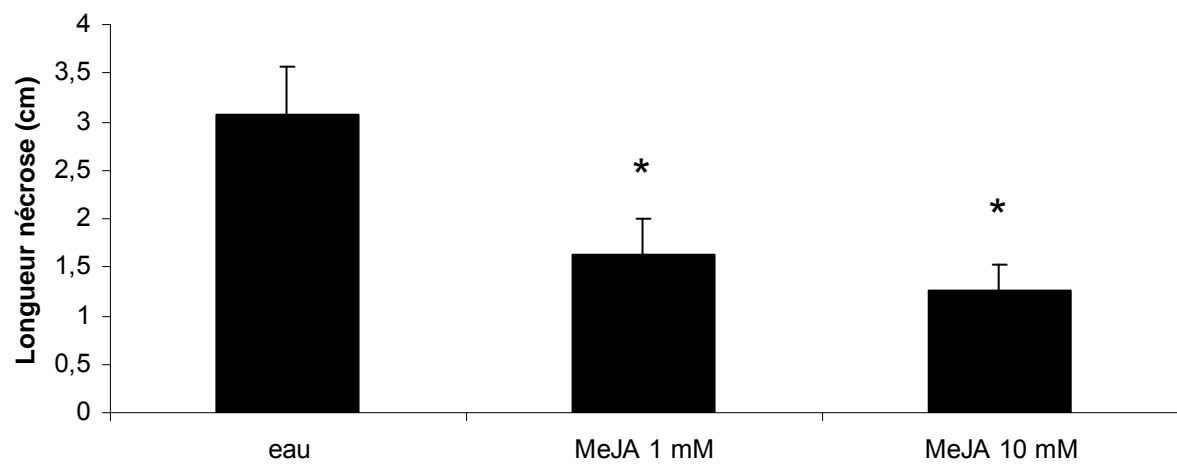


Fig.I.25. Test de protection de semis ouverts de Golden avec du MeJA 1 et 10 mM. Les traitements ont été appliqués en une fois, par arrosage du substrat avec 5 mL d'eau osmosée ou de la solution de MeJA. La longueur des nécroses a été mesurée 15 jours après inoculation par coupure de la plus jeune feuille développée des semis, à l'aide de ciseaux trempés dans une suspension d'Ea à 10^8 cfu/mL. *, valeur significativement différente du contrôle eau ($p < 0,05$), $n=30$.

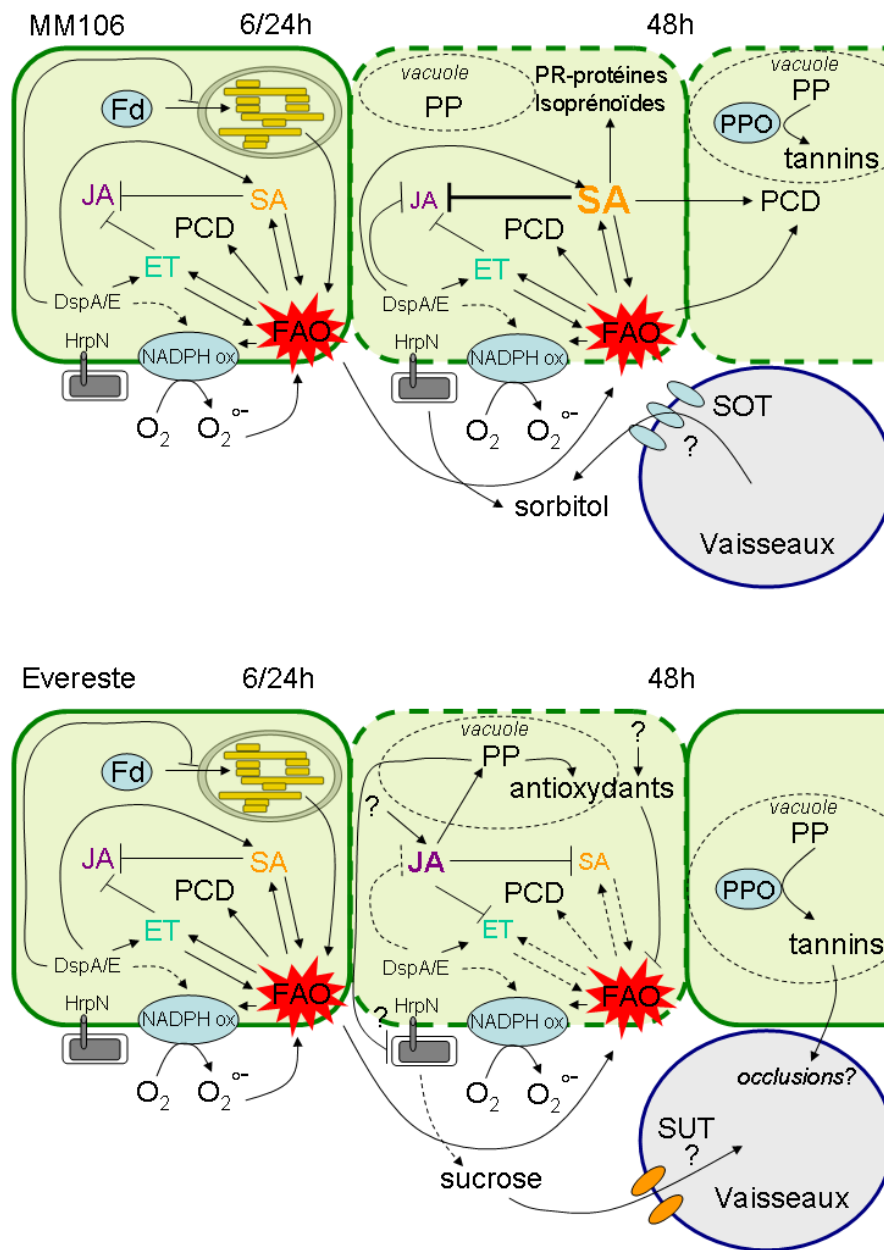


Fig.I.26. Schématisations des interactions *Ea*-MM106 (en haut) et *Ea*-Evereste (en bas). Le schéma initial se base sur celui proposé par Overmeyer et al. (2003) qui met en jeu les hormones acide salicylique (SA) et éthylène (ET) comme stimulateurs de la production de FAO (d'origine membranaire par les NADPH oxydases, ou cytosoliques, par exemple par les chloroplastes). Dans ce modèle, SA et ET répriment la voie de l'acide jasmonique (JA). La production importante de FAO provoque la mort cellulaire qui se propage de proche en proche, dans le cas de MM106. L'induction de la voie SA vraisemblablement provoquée par les effecteurs DspA/E et HrpN amplifie le phénomène, par augmentation de la production de FAO et en réprimant la voie de l'acide jasmonique. Les inductions de PR-protéines et de la biosynthèse des isoprénoides accompagnent ce processus, qui semble incontrôlé et conduit à l'établissement de la nécrose (propagation de la mort cellulaire [PCD]). Les transporteurs de sorbitol pourraient hypothétiquement approvisionner les espaces intercellulaires pour la bactérie. Dans le cas d'Evereste, les étapes initiales seraient identiques (aux temps 6 h et 24 h après infiltration les réponses transcriptionnelles ne sont pas encore très différentielles, bien qu'amorcées à partir de 24 h), mais le génotype réussit à contrecarrer les effets de la bactérie en maintenant l'expression de la voie JA (par exemple par perception de DAMPs), ce qui a pour effet de limiter la production de ROS et de contrôler le développement de la mort cellulaire. Les feuilles du génotype résistant pourraient également contenir des polyphénols antioxydants constitutifs (PP), dont la synthèse serait maintenue par la voie JA, qui participeraient au contrôle du choc oxydant. Les transporteurs de sucrose pourraient hypothétiquement appauvrir les espaces intercellulaires par translocation de carbohydrates dans les vaisseaux. Toutefois l'occlusion des vaisseaux peut se produire, probablement en partie par une accumulation de produits phénoliques.

| Désignation ¹ | Caractéristiques ² | Abréviation | Sources et références |
|--------------------------|---|---------------|------------------------|
| CFBP1430 | Souche sauvage isolée à partir de <i>Crataegus</i> , Path ⁺ , HR ⁺ | <i>wt</i> | Paulin et Samson, 1973 |
| Ea1/79 | Souche sauvage isolée de <i>Malus sp.</i> , en Allemagne. possédant le plasmide pfdC1Z'- GFP , Path ⁺ , HR ⁺ | <i>Ea GFP</i> | Bogs et al., 1998 |
| PMV6023 | <i>hrcV</i> :: MudIIPR13, Cm ^R , Path ⁻ , HR ⁻ | <i>t3ss</i> | Barny, 1995 |

Tableau I.3. Liste des souches d'*E. amylovora* utilisées dans l'étude. ¹CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA-Angers; PMV, Pathologie Moléculaire et Végétale, INRA-INA-PG ; ²*hrc* : hypersensitive response and conserved (mutant du T3SS) ; Path⁻ : (non) pathogène ; HR : hypersensitive response ; Cm^R : chloramphénicol résistant.

| | | amorces 5' | | amorces 3' | |
|--------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|
| | | GSP1 | nGSP1 | GSP2 | nGSP2 |
| <i>LTP2</i> | GAGGAATCCCTTGTGGCCGGATG | GGCCGGATGGCAGAAGCACATTTTA | TGCCGGCAGCATCAGTGGTGTTA | ATGCAGCAGGGCTTCCTGGAAAGTG | |
| <i>LTP3</i> | TGTGACATGCGGTCAGGTGGTGA | GCTGCAACGGGGTGAAGACCCTCTA | GTTGACACCACACCTGGCAGGAAGG | ACACCTGGCAGGAAGGCCAGCAG | |
| <i>LTP15</i> | TCCTATGGATTACGCTTACCGCAGAGC | NA | CCGCAGAGCAATTTGTAGAGGGGTA | NA | |
| <i>LTP16</i> | GACATGCAGTCCGGTGGAGTTGAC | TGCCTGGGGCCAATAAGGTCAGG | ACGCCGCAGGCAGAAGCAAGTTT | CCGCAGGCAGAAGCAAGTTTTCTGG | |
| qPCR | | | | | |
| | | direct | reverse | | |
| <i>LTP2</i> | GAAAGTGTGGAGTCAACG | TATTCTCACTAAACATTATCTGC | | | |
| <i>LTP3</i> | ACGGAATGTTGACACCAC | GGAATACCTTACACCAATACC | | | |
| <i>LTP15</i> | AGTGTCTTATTTGTGATAGC | CAACTACAAGCAATTCTCC | | | |
| <i>LTP16</i> | TGGCGTTGGGGCTAGTGACG | GGCCTTGCCTCTGCGGGTACA | | | |

Tableau I.4. Liste des amorces utilisées pour le clonage des extrémités 5' et 3' des LTP par RACE PCR, et amorces dessinées sur les séquences obtenues par cette méthode pour en suivre l'expression par qPCR, NA = non réalisé.

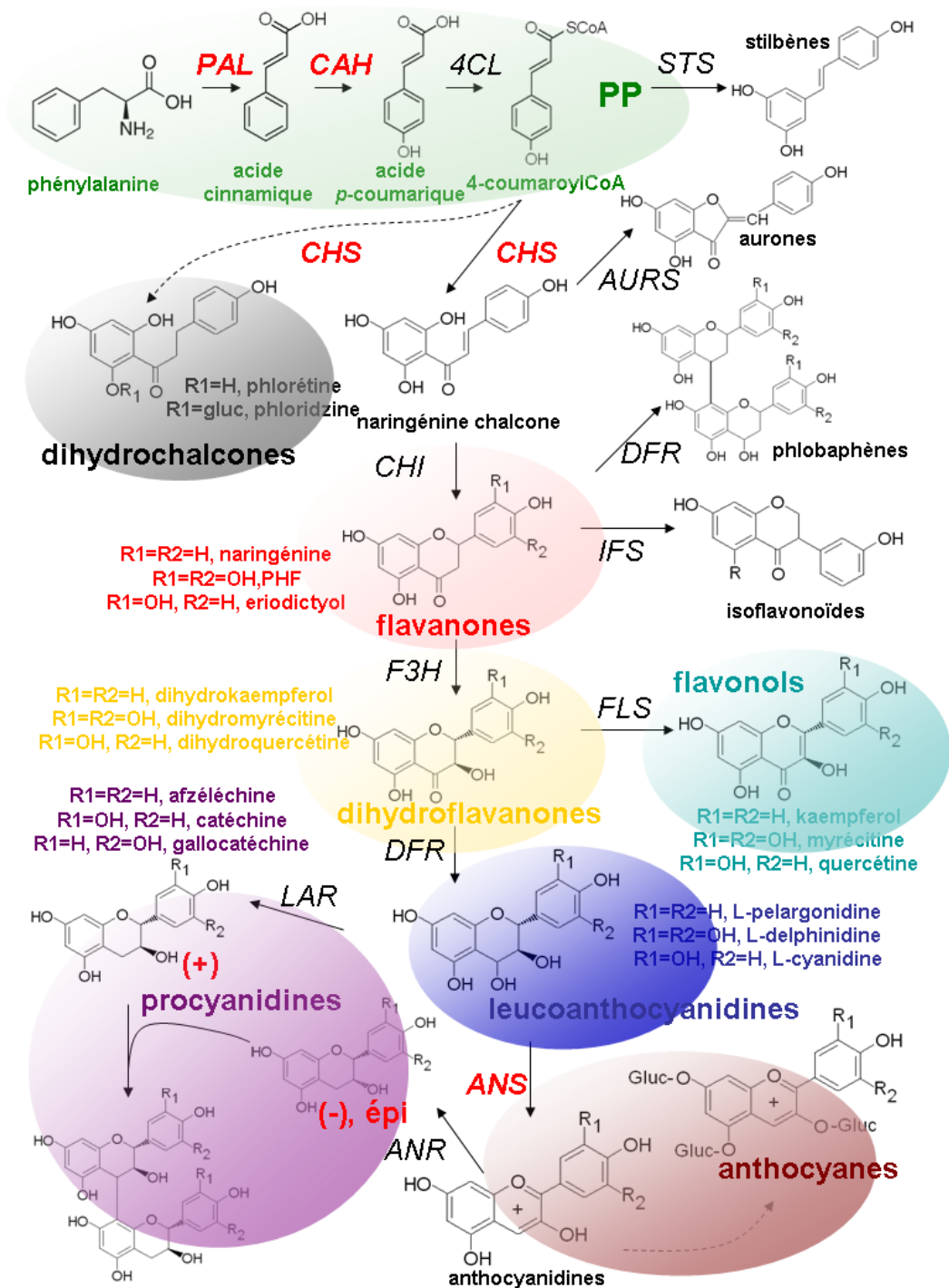


Fig.II.1. Voie de biosynthèse des produits phénoliques, chacune des enzymes est indiquée en italique. Les flèches en pointillés signalent plusieurs étapes. Les étapes de synthèse du squelette principal des flavonoïdes sont colorées, ainsi que les produits finaux potentiellement détectés chez le Pommier (dihydrochalcones, procyanidines, flavonols et anthocyanes, cf Tableau II.1.). En vert, voie des phénylpropanoïdes (PP), PAL = phénylalanine ammonia lyase, CAH = acide cinnamique 4-hydroxylase, 4CL = 4-coumaroyl CoA ligase. En noir, voie des dihydrochalcones, qui nécessite une étape de déshydrogénation du coumaroyl CoA, CHS = chalcone synthase. En rouge, les flavanones, CHI = chalcone isomérase, PHF = pentahydroxyflavanone. En jaune, les dihydroflavanones, F3H = flavanone 3-hydroxylase. En turquoise, les flavonols, FLS = flavonol synthase. En bleu, les leucoanthocyanidines ou flavan-3,4-diols, DFR = dihydroflavonol 4-réductase. En violet, les flavanols et procyanidines, LAR = leucoanthocyanidine réductase à l'origine de la synthèse des formes (+), ANR = anthocyanidine réductase à l'origine de la synthèse des formes (-) épi (comme l'épicatéchine, R1=OH, R2=H). En marron, les anthocyanidines (aglycones) et les anthocyanes, ANS = anthocyanidine synthase. Les autres étapes enzymatiques : AURS = aurone synthase, STS = stilbène synthase. Les enzymes dont les gènes ont été étudiés dans le chapitre I sont indiquées en rouge. D'après Yu et Jez, 2008; Ferrer et al., 2008; Lepiniec et al., 2006.

| | | Fruit | | | | Feuilles | | | |
|------------------------|------|-----------|------------|------------------------|------------|-----------|-------------|--|--|
| | | chair | | peau | | | | | |
| | MW | mg/MS | mg/100g MF | mg/MS | mg/100g MF | mg/MS | | | |
| HCA | | | | | | | HCA | acides hydroxycinnamiques | |
| CGA | 354 | 0,18-1,73 | 3-43 | 0,03-0,89 | 0,1-44 | 0,07-1,13 | CGA | acide chlorogénique | |
| nCGAa | 354 | | | | | | nCGA | acide néochlorogénique (3'CGA) | |
| cCGA | 354 | tr.-0,4 | | | | | cCGA | acide cryptochlorogénique (4'CGA) | |
| AC | 180 | | 0,8 | | 0,8-3,8 | | AC | acide caféique | |
| pCQA | 338 | | 0,3-3,5 | | 0,54-3,9 | 0,1-14,1 | pCQA | p-coumaroyl acide quinique | |
| 4'pCQA | 338 | 0,02-0,37 | | | tr. | | | | |
| 5'pCQA | 338 | 0,02-0,09 | | | tr. | | | | |
| pCG | 326 | | tr.-0,5 | | tr.-0,5 | 0,02-143 | pCG | p-coumaroylglucoside | |
| pCA | 164 | | 0,01 | | | 0,09-2,13 | pCA | acide p-coumarique | |
| FoG | 356 | | 0,03-0,5 | | 0,5-1,3 | 0,2-1,9 | FoG | feruloylglucose | |
| FA | 194 | | 0,21 | | | tr.-3,27 | FA | acide férulique | |
| DHC | | | | | | | DHC | dihydrochalcones | |
| PLZ | 436 | 0,07-0,39 | 0,3-16 | 1,08-2,69 | 0,6-65,4 | 84-125 | PLZ | phloridzine (phlorétine-2-O-glucoside) | |
| PLT-2-XYLG | 566 | 0,05-0,12 | 1-123 | 0,11-0,56 | 7-27 | | PLT-2-XYL | phlorétine-2-O-xyloglucoside | |
| 3OHPLZ ^a | 452 | | | | | | 3OHPLZ | 3-hydroxyphloridzine | |
| PLT | 274 | | | | | 3,8-8,8 | PLT | phlorétine | |
| Flavonols | | | | | | | | | |
| HYP | 464 | 0,04-0,28 | 1-92 | 0,56-3,47 | 7-95 | 5,68-9,1 | HYP | hypérine (quercetin-3-O-galactoside) | |
| IQCTI | 464 | 0,01-0,04 | tr.-2 | 0,13-1,00 | tr.-20 | 2,43-3,22 | IQCTI | isoquercitrine (quercetin-3-O-glucoside) | |
| REY | 448 | | 1-25 | 0,27-1,34 | 3-25 | 3,51-5,15 | REY | reynoutrine (quercetin-3-O-xyloside) | |
| AVI | 434 | 0,04-0,19 | 1-80 | 1,04-3,92 | 2,51 | 0,1-1,4 | AVI | avicularine (quercetin-3-O-arabinoside) | |
| QCTI | 448 | 0,05-0,14 | 1-66 | 0,44-2,25 | 6-66 | 0,6-9,7 | QCTI | quercitrine (quercetin-3-O-rhamnoside) | |
| RUT | 610 | 0,01-0,04 | 1-19 | 0,27-1,34 | 0,5-19 | 0,2-8,7 | RUT | rutine (quercetin-3-O-rhamnoglucoside) | |
| Procyanidines | | | | | | | | | |
| CAT | 290 | 0,01-0,28 | 0,5-18,2 | 0,04-0,12 | 4-49 | 0,005 | CAT | (+)-catéchine | |
| EPI | 290 | 0,21-0,83 | 1,4 | 1,2-5,75 | 8-48 | 0,3-1,6 | EPI | épicatéchine ((-)-catéchine) | |
| E-4b-8-C | 578 | 0,04-0,15 | 1-8,4 | 0,11-0,4 | | | E-4b-8-C | procyanidine B1 | |
| E-4b-8-E | 578 | 0,16-1,14 | 1,5-23 | 3,46-6,36 | 10-100 | 0,07-0,97 | E-4b-8-E | procyanidine B2 | |
| C-4a-8-C | 578 | | 2-10 | | | | C-4a-8-C | procyanidine B3 | |
| E-4b-6-E | 578 | 0,01-0,05 | | 0,44-0,97 | | 0,7 | E-4b-6-E | procyanidine B5 | |
| E-4b-8-E-4b-8-E | 867 | 0,39-0,91 | | 3,65-7,23 | | 0,06 | E-4b-8-E-4 | procyanidine C1 | |
| E-4b-6-E-4b-6-E | 867 | 0,01-0,03 | | 0,16-0,33 | | 0,2 | E-4b-6-E-4 | procyanidine E-B5 | |
| E-4b-8-E-4b-8-E-4b-8-E | 1156 | 0,21-0,51 | | 1,02-4,14 | | | E-4b-8-E-4 | procyanidine E4 | |
| Anthocyanes | | | | | | | | | |
| C-3-O-gal | 449 | | | 49-547 | 58-104 | | C-3-O-gal | cyandin-3-O-galactoside | |
| C-3-O-glu | 449 | | | 0,5-9,1 ^b | | | C-3-O-glu | cyandin-3-O-glucoside | |
| C-3-O-ara | 433 | | | 2,7-72,5 ^b | | | C-3-O-ara | cyandin-3-O-arabinoside | |
| C-3-O-xyl | 419 | | | 1,4-13,7 ^b | | | C-3-O-xyl | cyandin-3-O-xyloside | |
| C-3-O-rut | 595 | | | 0,08-2,69 ^b | | | C-3-O-rut | cyandin-3-O-rutinoside | |
| C-3,5-diglu | 611 | | | 0,09-0,63 ^b | | | C-3,5-diglu | cyandin-3-O-diglucoside | |
| C-3-aglu | 491 | | | 0,14-0,33 ^b | | | C-3-aglu | cyandin-3-O-acetylglucoside | |

^a détecté uniquement dans des produits de transformation (purées)

^b en µg/g de MS

Tableau II.1. Principaux phénylpropanoïdes et flavonoïdes détectés jusqu'à présent dans les fruits et les feuilles de Pommier (d'après Treutter et al., 2001; Pontais et al., 2008). Pour chaque composé, quand la donnée est disponible, les valeurs minimum et maximum sont indiquées, tr, = traces. La masse moléculaire de chaque composé (MW) est donné à titre informatif.

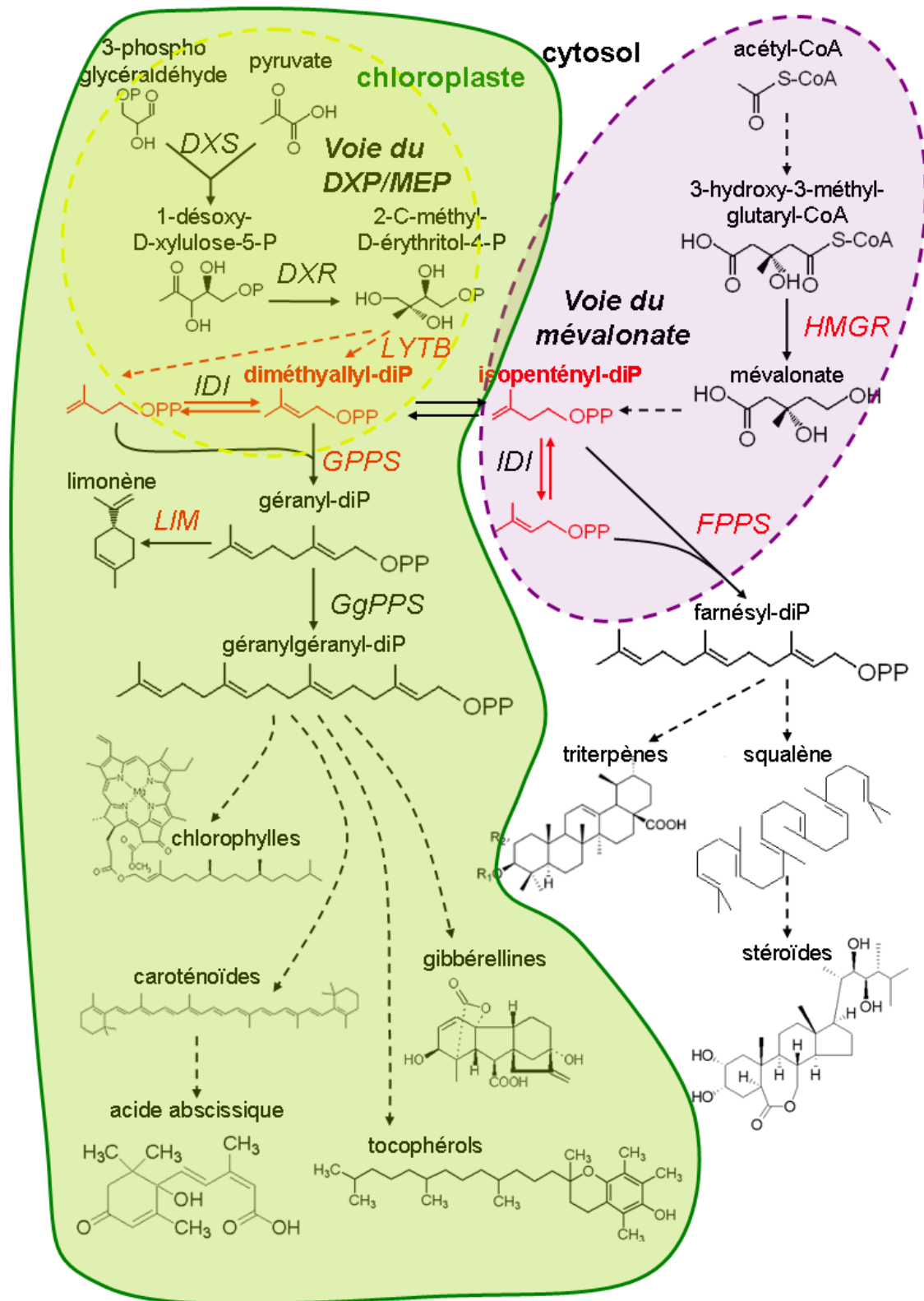


Fig.II.2. Biosynthèse des isoprénoïdes: les deux principaux précurseurs (en rouge) des isoprénoïdes sont l'IPP (isopentényl-diphosphate) et le DMAPP (diméthylallyl-diphosphate), tous deux des isomères, dont le passage de l'un à l'autre est assuré par l'IDI (IPP-DMAPP isomérase). Ces précurseurs sont synthétisés dans le chloroplaste (en vert) par la voie du DXP/MEP (entourée en jaune) ou bien dans le cytosol par la voie du mévalonate (entourée en violet), DXS = 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXR = 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductase, LYTb = 4-hydroxy-3-méthylbut-2-enyl diphosphate réductase, GPPS = géranyl-pyrophosphate synthase, LIM = limonène synthase, GgPPS = géranyl-géranyl-pyrophosphate synthase, HMGR = 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl CoA, FPPS = farnésyl-pyrophosphate synthase. Les flèches en pointillés indiquent qu'il existe plusieurs étapes enzymatiques. Les gènes dont l'expression a été suivie par qPCR au cours de l'interaction entre Everest/MM106 et *Erwinia amylovora* sont indiqués en rouge.

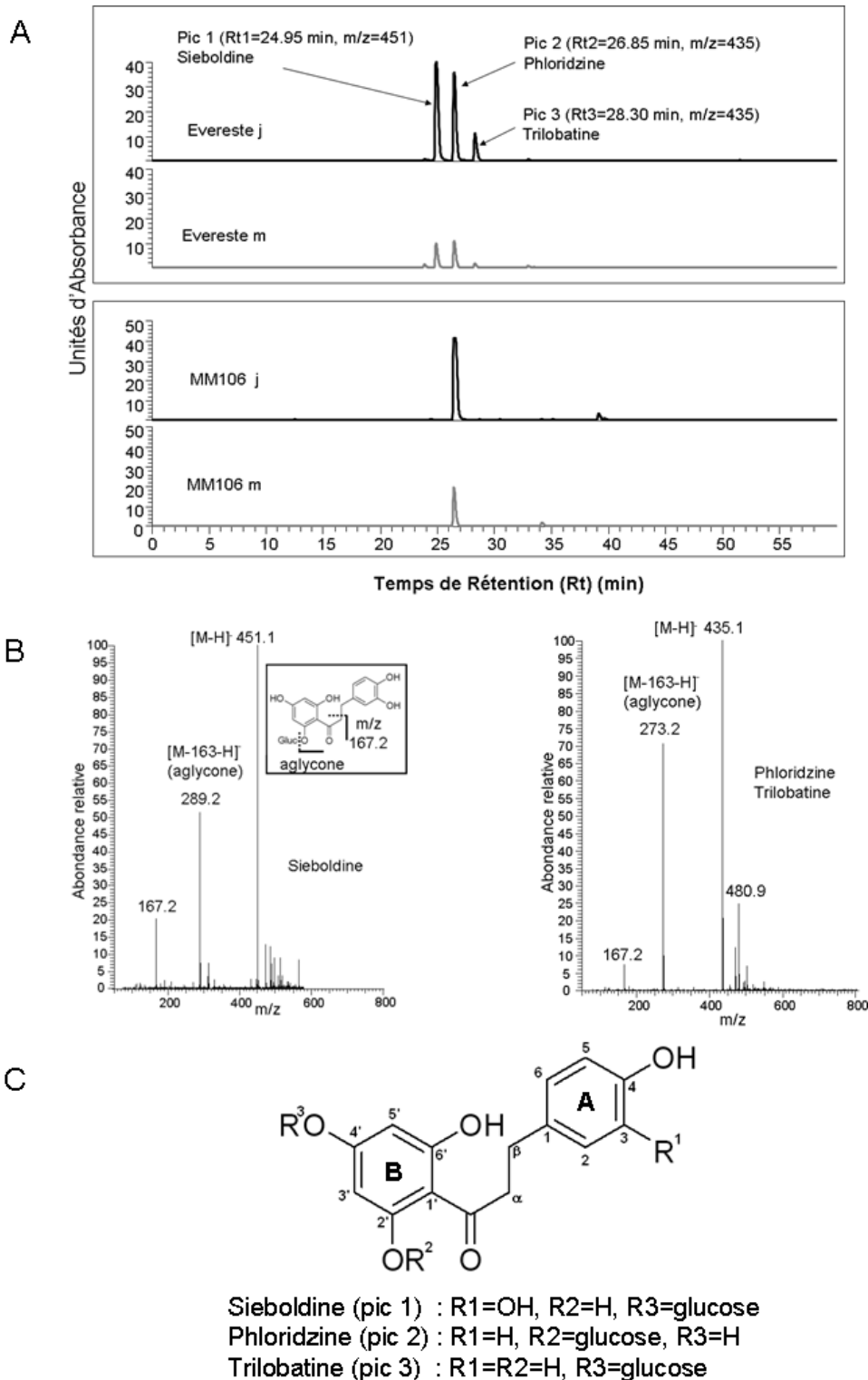


Fig.II.3. (A) Chromatogrammes d'extraits de feuilles jeunes (j, en noir) et matures (m, en gris) d'Evereste (au-dessus) et de MM106 (en-dessous) séparés par RP-HPLC et enregistrés à 280 nm. Les temps de rétentions et les rapports m/z [M-H]⁻ sont indiqués pour chaque composé. (B) Spectres de masse de la sieboldine, de la phloridzine et de la trilobatine, avec la fragmentation typique des DHC en mode négatif dans l'encart. (C) Structures chimiques des composés **1**, **2** et **3** déduites des spectres RMN ¹H et ¹³C.

| | Attribution | Composé 1 | Composé 3 |
|---------|-------------|------------|------------|
| noyau 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 |
| | α | 47,5 | 47,3 |
| | β | 31,4 | 31,2 |
| | CO | 207,0 | 207,2 |
| noyau 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 |

Tableau II.2. Assignements RMN-¹³C(125 MHz) pour les composés 1 et 3, enregistrés dans du méthanol deutéré.

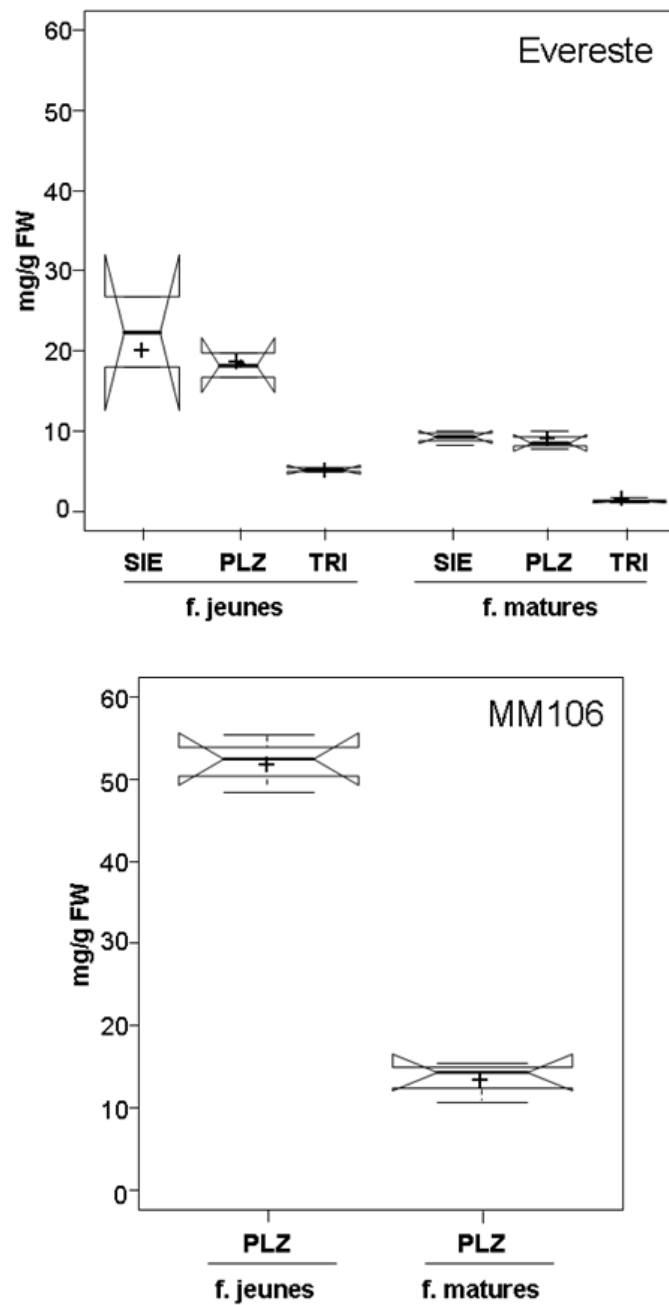


Fig.II.4. Quantification des DHC majeures (SIE = sieboldine, PLZ = phloridzine, TRI = trilobatine) dans les feuilles jeunes et matures d'Evereste (en haut) et de MM106 (en bas).

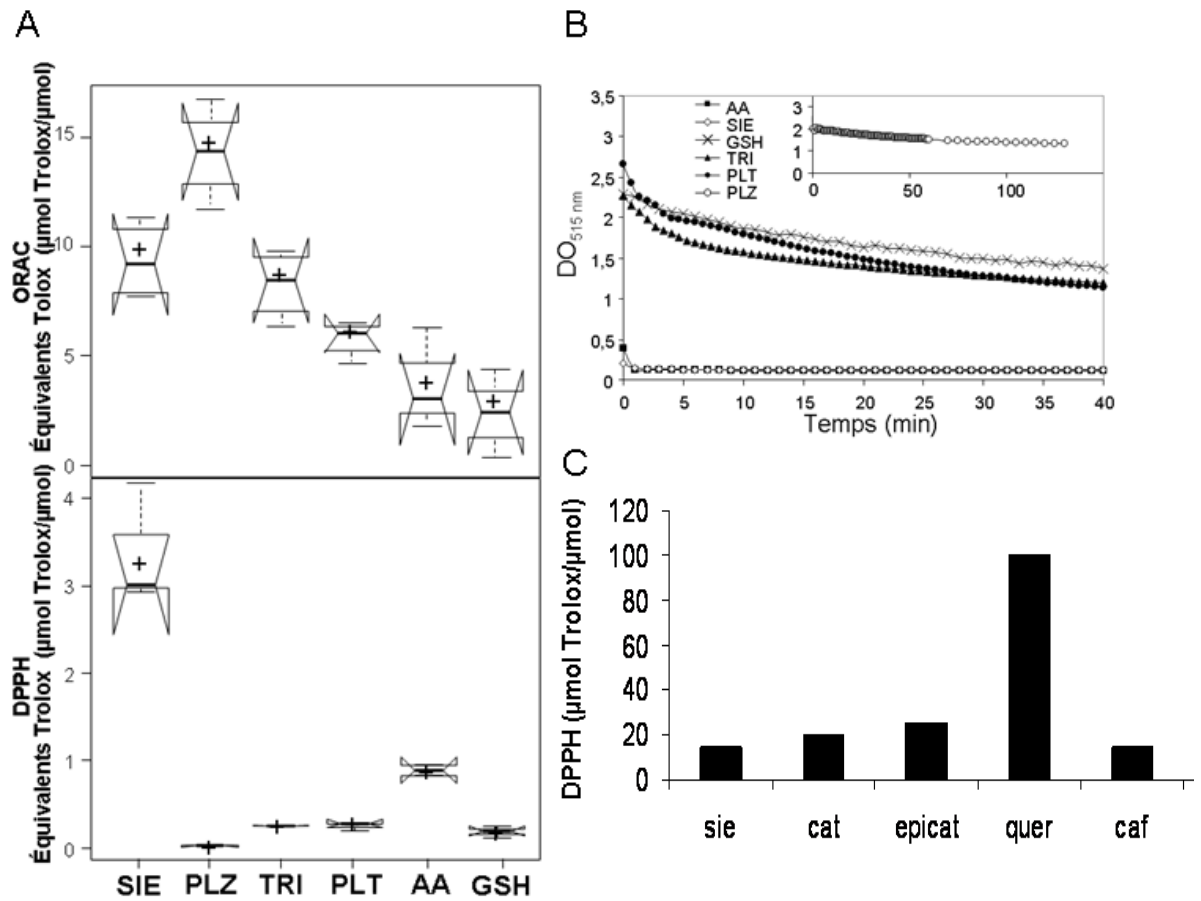
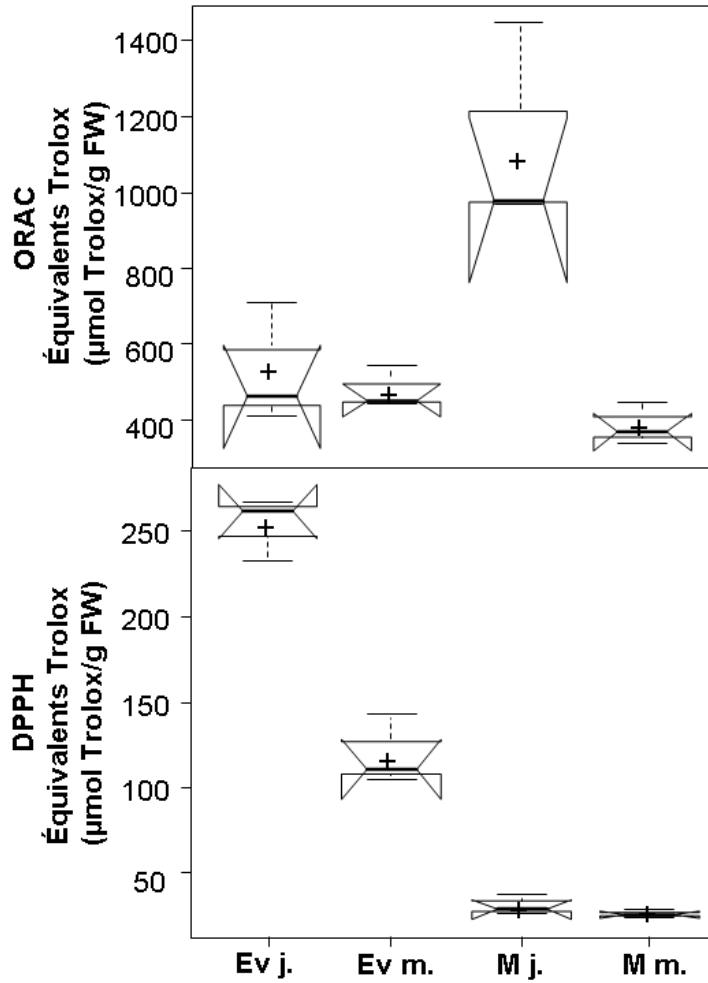


Fig.II.5. (A) Activités ORAC et piégeage du DPPH de la sieboldine (SIE), la phloridzine (PLZ), la trilobatine (TRI), la phlorétine (PLT) et des composés de référence, l'acide ascorbique (AA) et le glutathion (GSH). Le test ORAC (en haut) a été réalisé avec des concentrations croissantes de chacun des composés, allant de 62,5 μM à 1 mM, et le test DPPH avec des concentrations allant de 6,25 μM à 3 mM ($n=3$). Pour ce dernier, l'activité est exprimée en équivalents Trolox ($\mu\text{mol de Trolox}/\mu\text{mol de composé}$) (A) et en cinétique de réduction (B). (C) Comparaison des activités de réduction du DPPH entre la sieboldine (SIE) et d'autres produits phénoliques : cat = catéchine, epicat = épicatechine, quer = quercétine et caf = acide caféique.

A



B

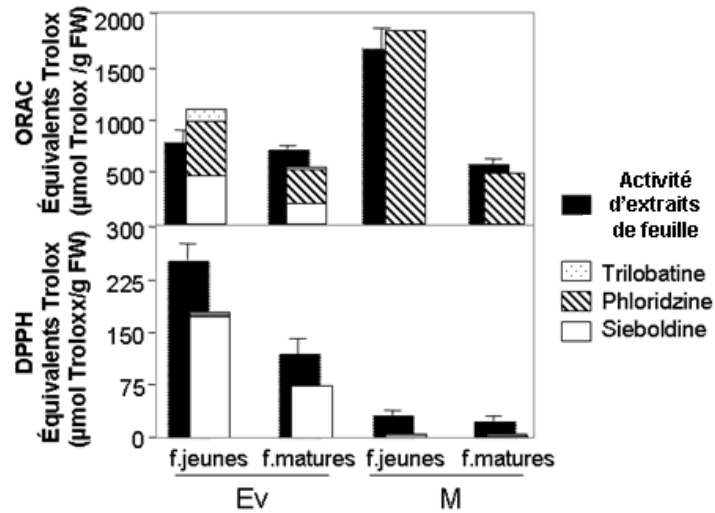


Fig.II.6. (A) Représentation en boîtes-à-moustaches des activités antioxydantes des extraits méthanoliques de feuilles jeunes (j) et matures (m) d'Evereste (Ev) et de MM106 (M), utilisés à une concentration initiale de 150 mg de MF/mL. Les résultats, exprimés en équivalents Trolox (µmol de Trolox/g de MF), pour le test ORAC sont présentés en haut et pour le test du DPPH en bas, et ont été obtenus à partir de trois répétitions biologiques indépendantes. (B) Contribution théorique des DHC majeures à l'activité totale des extraits de feuilles (en µmol de Trolox/g de MF), calculée comme le produit de la concentration de chaque composé dans la feuille (Fig.II.4.) par son activité antioxydante et sa masse moléculaire. Les activités totales mesurées expérimentalement (A) sont également représentées dans les histogrammes (en noir) dans un but comparatif.

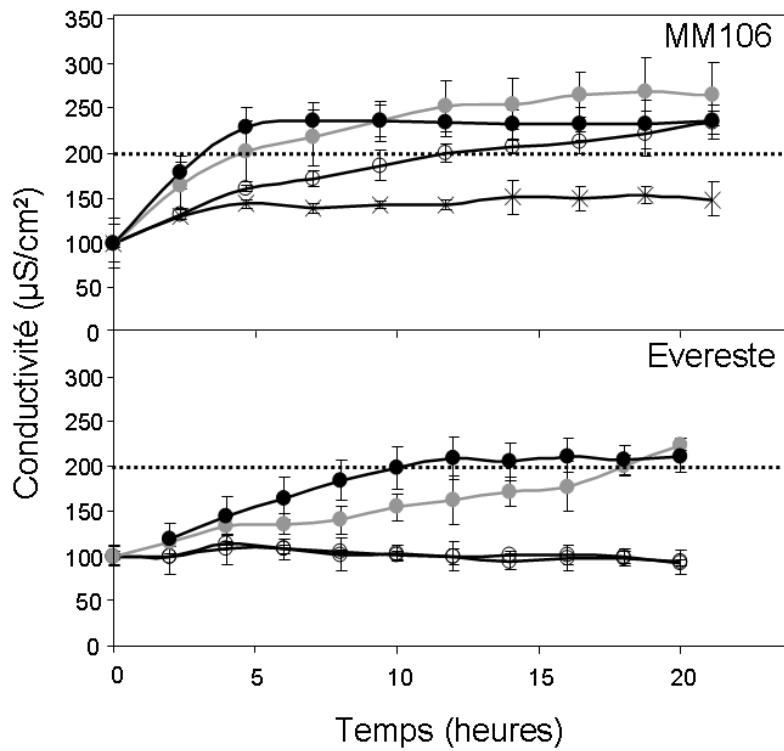


Fig.II.7. Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$) du milieu d'incubation des disques foliaires de MM106 (en haut) et d'Evereste (en bas), pré-infiltrés avec du paraquat à 1 (ronds ouverts), 10 (ronds gris) et 100 (ronds noirs) μM ou bien pré-infiltrés avec du milieu d'incubation (croix noires). L'incubation se fait sous une forte illumination constante $170 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (moyennes de triplicats d'une répétition typique).

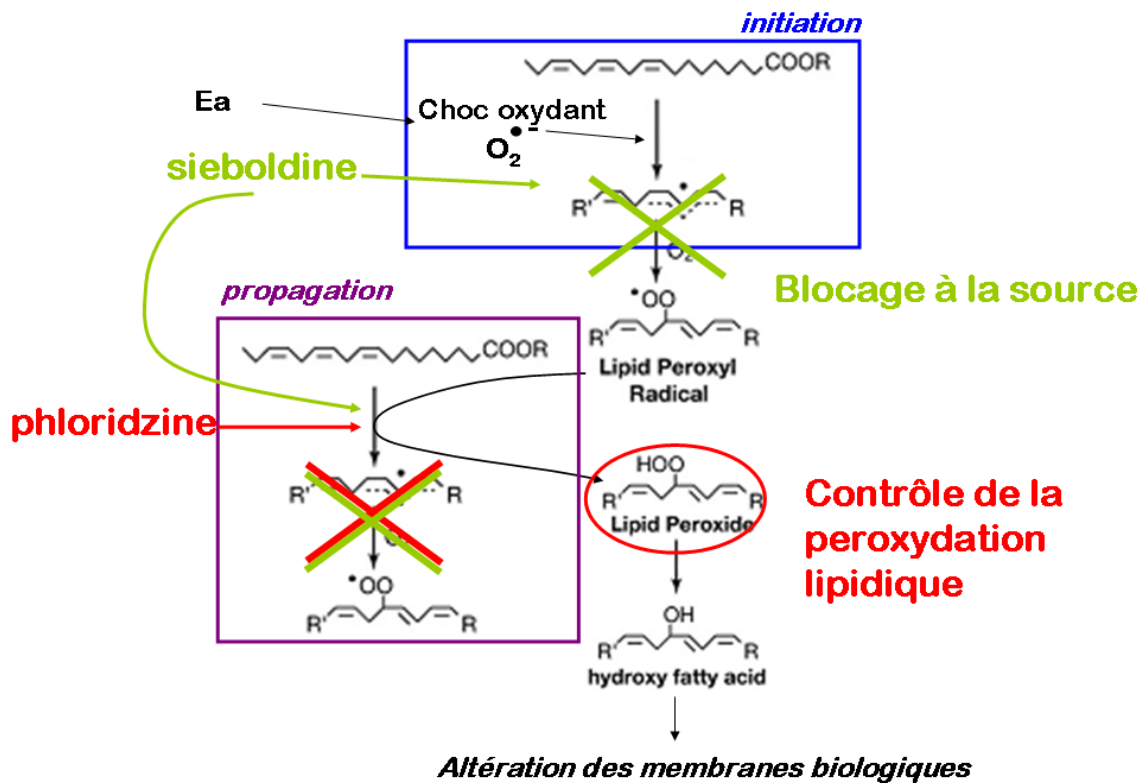


Fig.II.8. Mode d'action proposé des activités antioxydantes sur la peroxydation des lipides. Ce processus se fait en deux étapes, une phase d'initiation par les FAO, tels que l'anion superoxyde produit au cours du choc oxydant par E_a , suivi d'une phase de propagation des formes radicalaires, de lipides en lipides. La sieboldine (en vert) serait efficace contre les deux étapes (corrélation avec la forte activité antiradicalaire contre le DPPH et l'activité ORAC) assurant un blocage de la peroxydation des lipides, tandis que la phloridzine (en rouge) ne serait active qu'au niveau de la phase de propagation (forte activité ORAC), ne permettant que de contrôler ce processus.

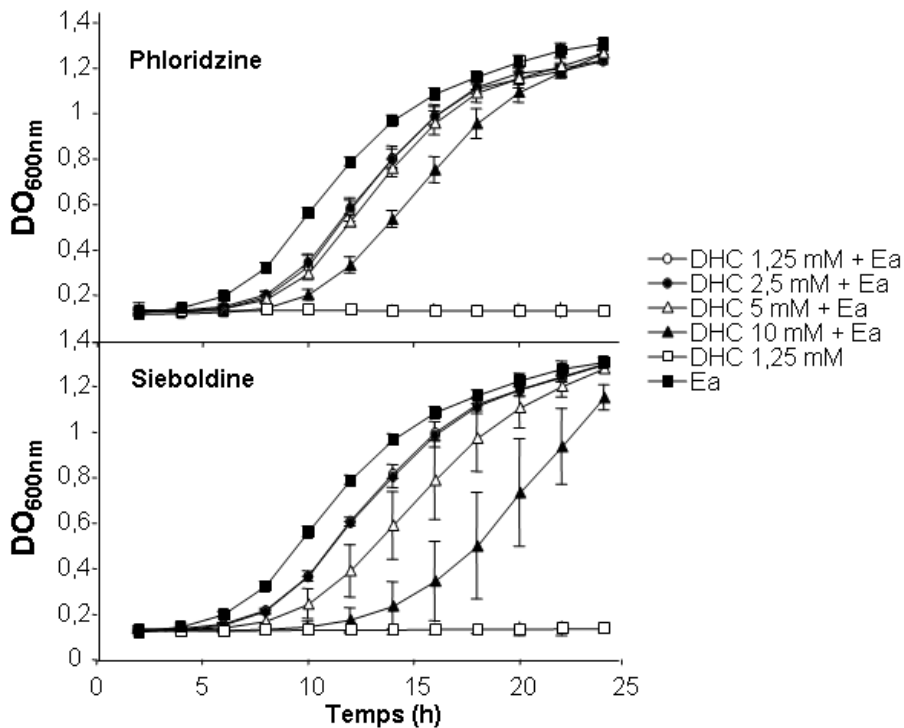


Fig.II.9. Croissance d'*Ea* en milieu LB (mesure de la DO à 600 nm) après 2 h de contact avec la phloridzine (en haut) ou la sieboldine (en bas) aux concentrations indiquées, Moyennes et intervalles de confiance à 95% calculés sur deux répétitions biologiques avec duplicats techniques (n=2).

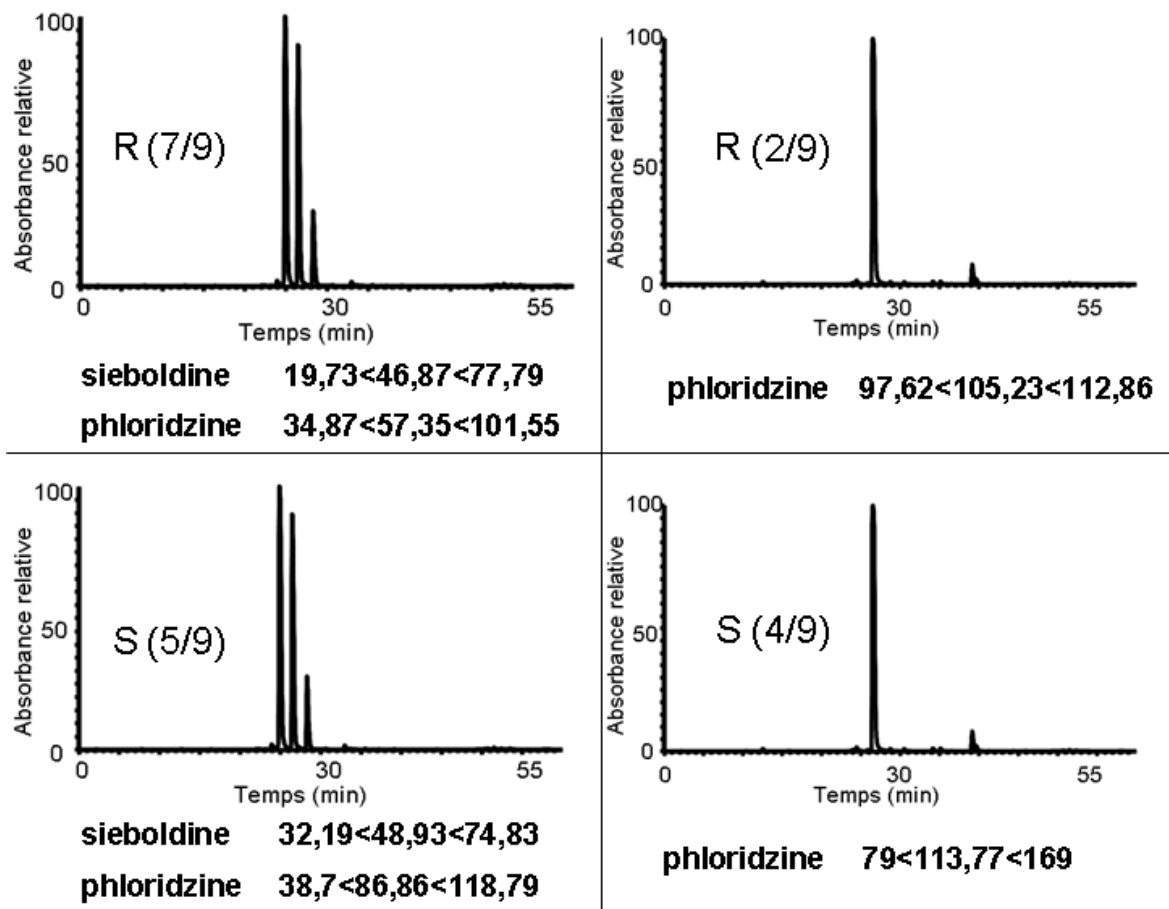
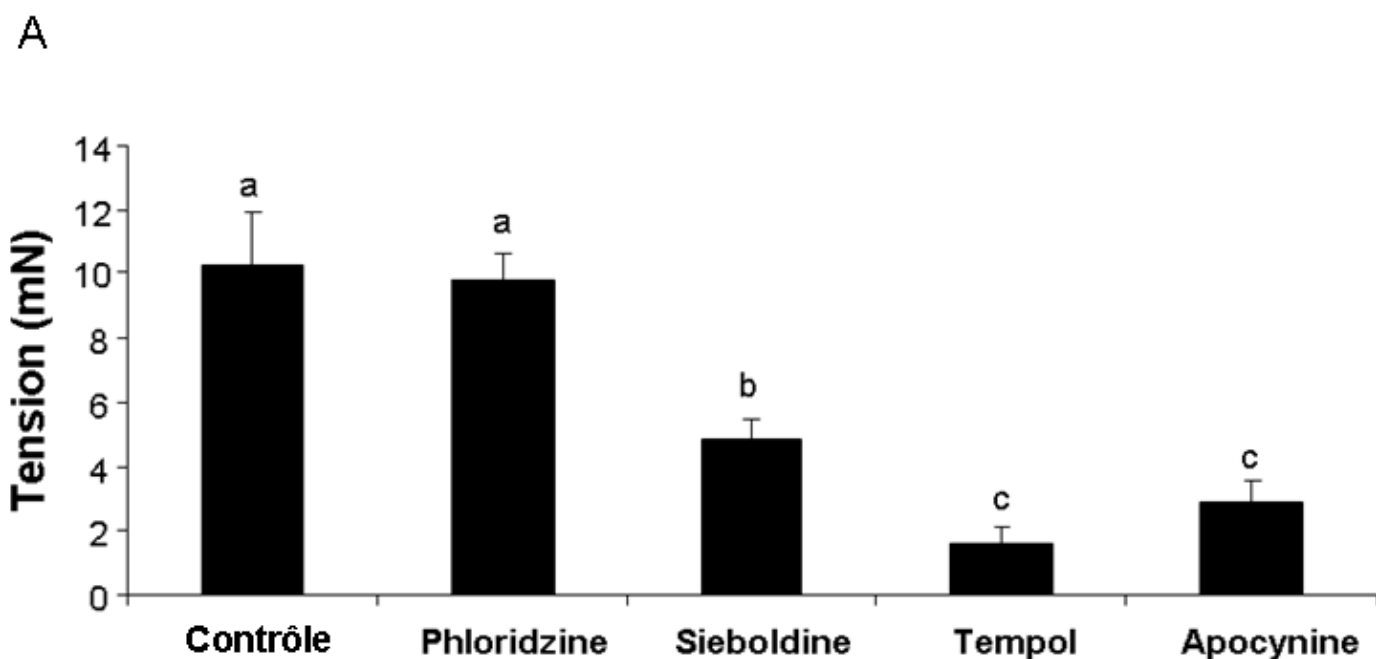


Fig.II.10. Chromatogrammes enregistrés à 280 nm de 9 descendants résistants à *Ea* (R) et 9 descendants sensibles à *Ea* (S). Les individus sont classés selon la présence ou l'absence de sieboldine et pour chaque profil. Le nombre de représentants dans chaque profil est indiqué entre parenthèse, ainsi que les concentrations (en mg/g de MS) en sieboldine et/ou phloridzine (valeur la plus basse parmi les représentants, moyenne et valeur la plus haute).



B

| Compound | IC ₅₀ (mM) |
|------------------|-----------------------|
| Aminoguanidine | 8,5 |
| Phloridzine | 2,5 |
| Sieboldine | 0,2 |
| Acide ascorbique | NA |
| Glutathion | NA |
| Trolox | 1,7 |

Fig.II.11. (A) Contraction de segments d'artères mésentériques en réponse à 5×10^{-5} M de phényléphrine après 30 min de pré-incubation de phloridzine, de sieboldine ou des vasorelaxants de référence. Le tempol et l'apocynine à 10^{-5} M chaque ($n = 3$, moyennes et intervalles de confiances à 95% calculés sur trois segments d'artères provenant d'animaux différents). La valeur du contrôle correspond à la contraction d'une artère avant pré-incubation. Les lettres indiquent les classes statistiques ($p < 0,01$). (B) Concentrations inhibitrices de 50% de la formation des AGEs. L'aminoguanidine a été utilisée en tant que composé de référence, NA = pas d'activité détectable.

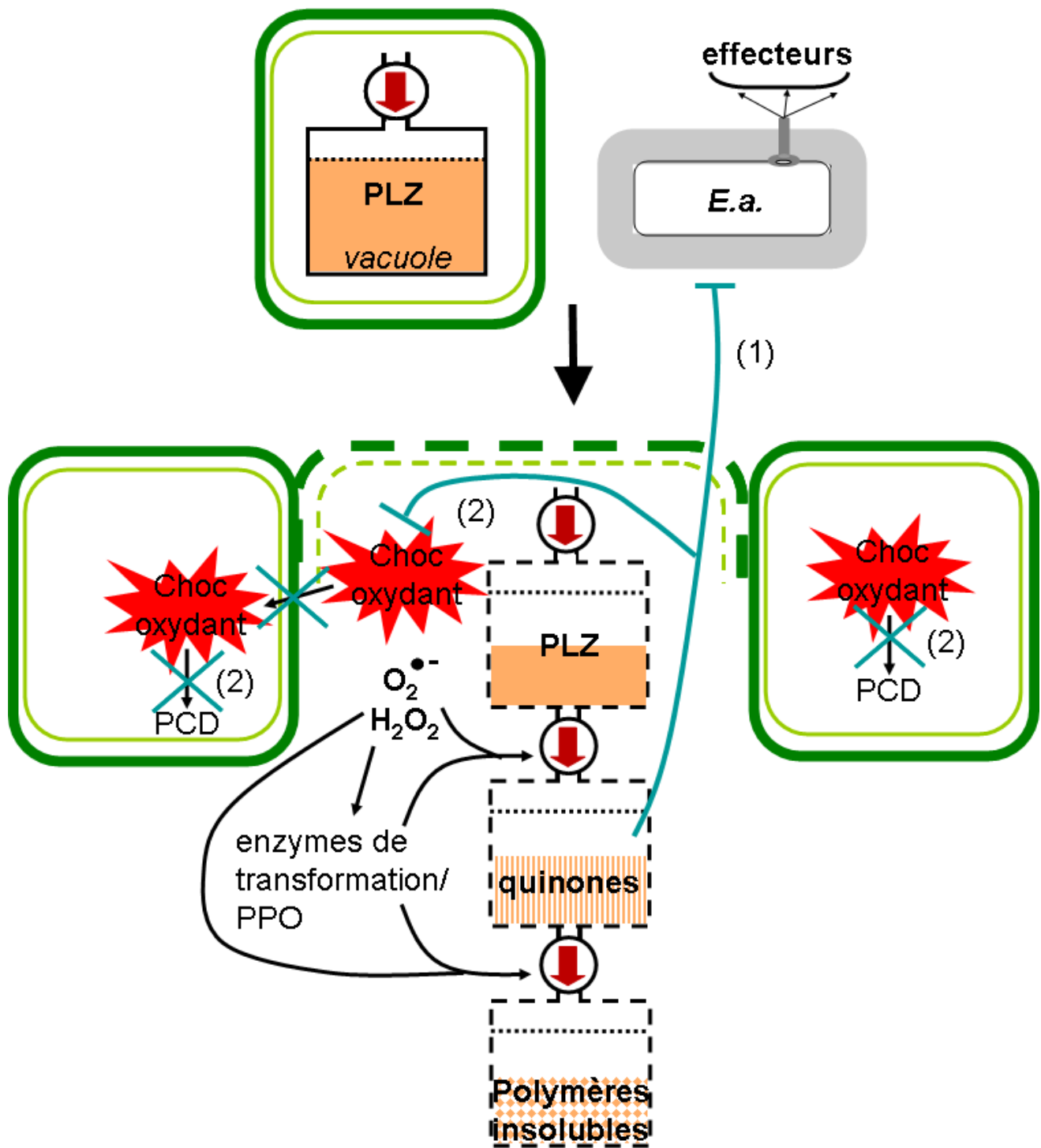


Fig.II.12. Hypothèses concernant le rôle des produits de transformation de la phloridzine dans la résistance à *Ea* (1) par une action antimicrobienne directe et (2) par blocage des FAO et de la propagation de la mort cellulaire. Dans le cadre de cette hypothèse, la sieboldine pourrait également participer à la restriction du choc oxydant.

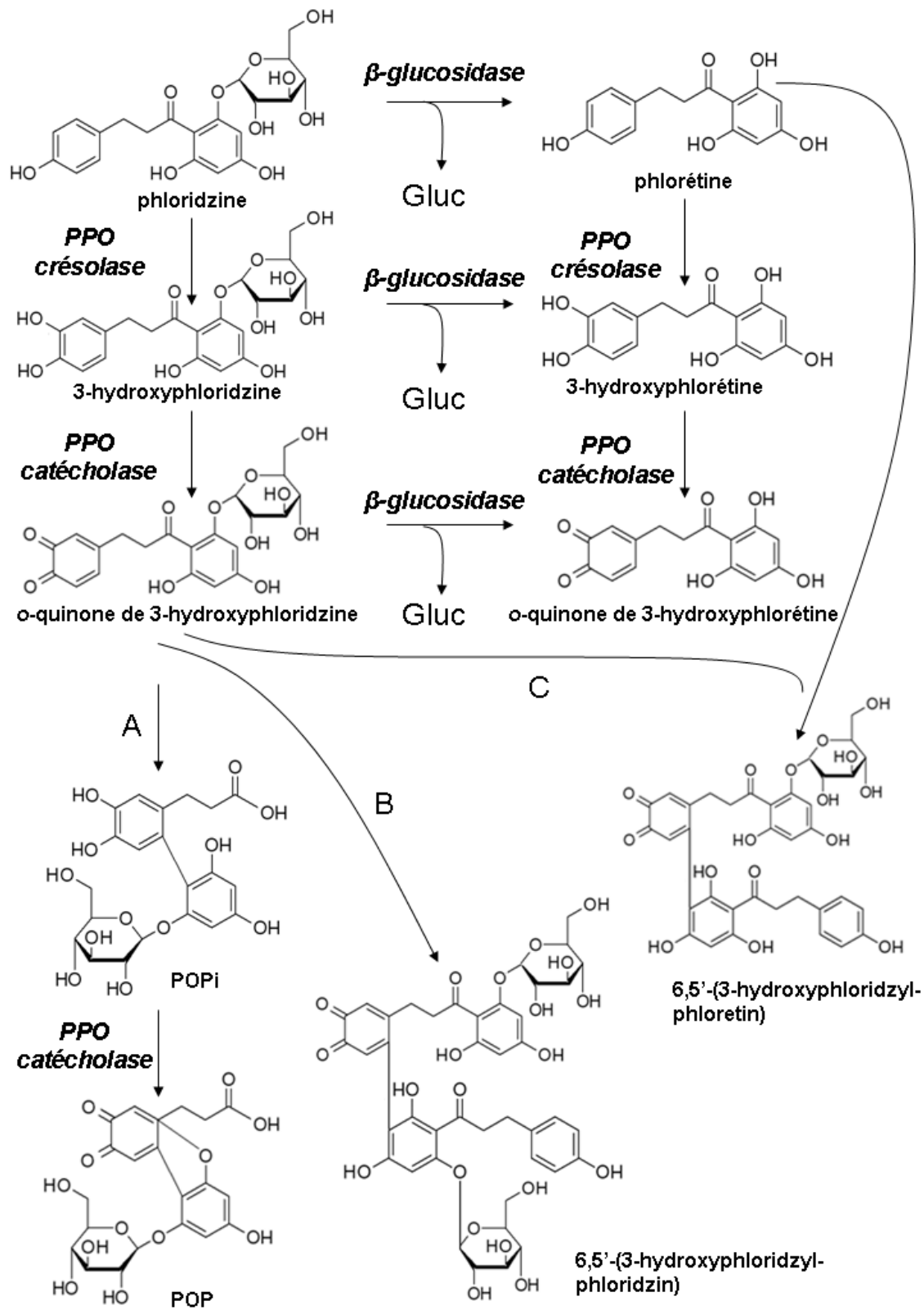


Fig.II.13. Voies de transformation connues pour la phloridzine. (A) Oxydation intramolécule de l'o-quinone de 3-hydroxyphloridzine (Guyot et al., 2007). (B) Couplage oxydatif d'une molécule de phloridzine avec l'o-quinone de 3-hydroxyphloridzine (Sarapuu, 1971). (C) Couplage oxydatif entre la phlorétine et l'o-quinone de 3-hydroxyphloridzine (Raa et Overeem, 1968).

Polyphénol oxydases

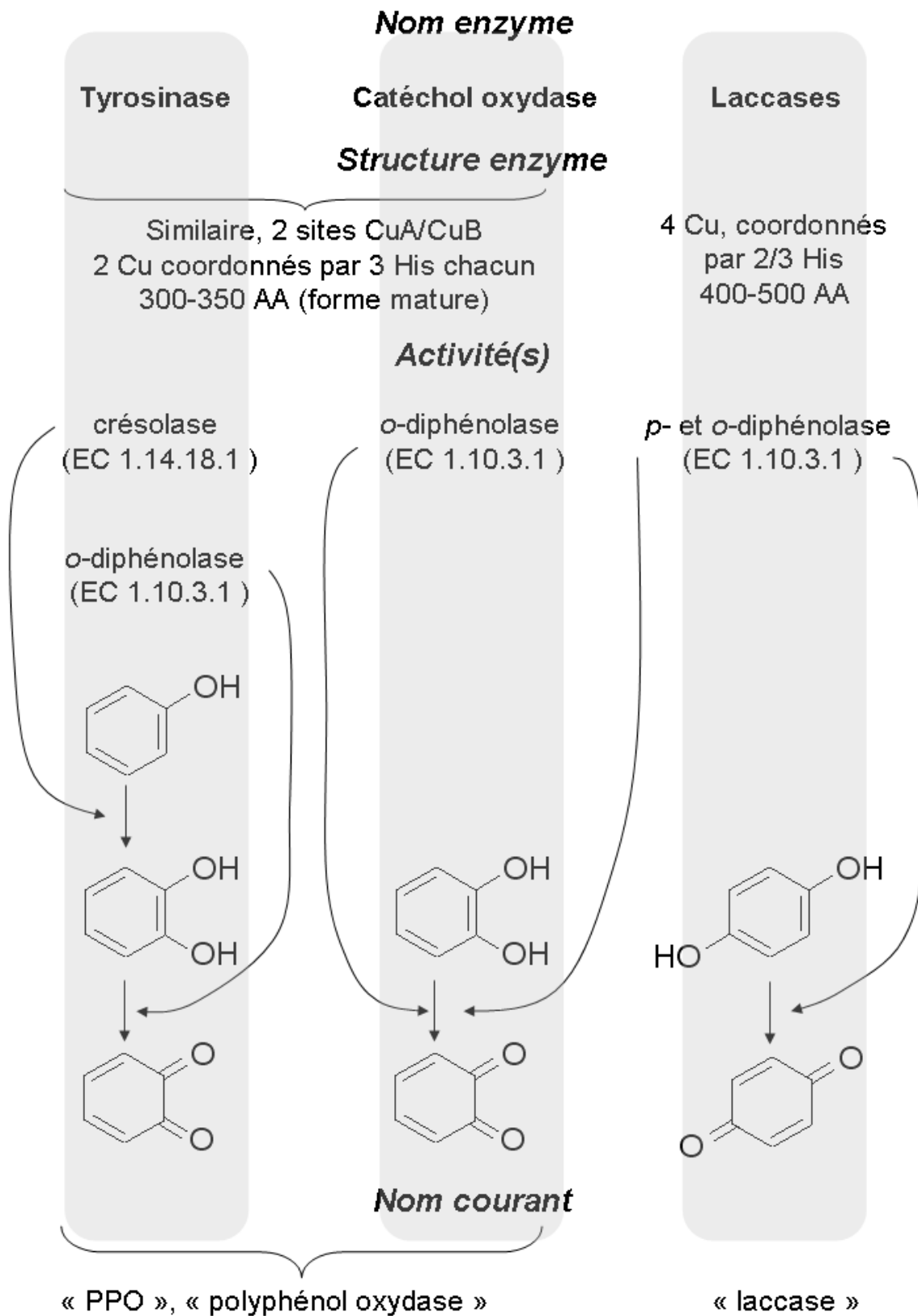


Fig.II.14. Nomenclature des polyphénol oxydases.

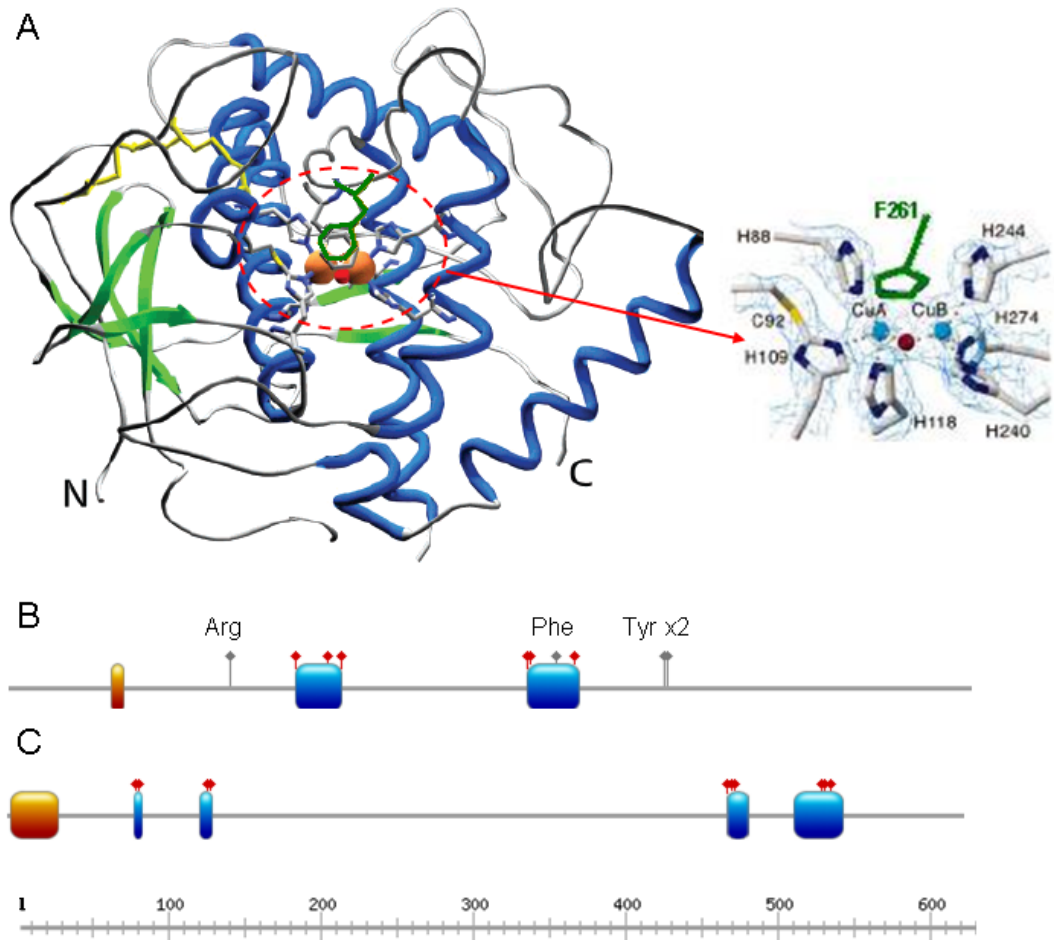


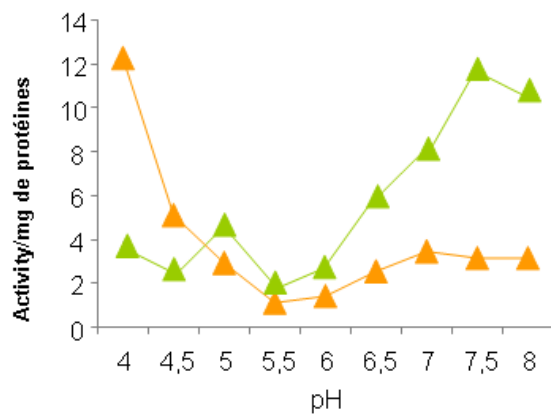
Fig.II.15. (A) Structure en *met*, non mature (peptide signal N-terminal et extrémité C-terminale présents), de la CO isolée de pomme de terre douce (*Ipomoea batatas*) et détail du site catalytique renfermant les deux atomes de cuivre coordonnés chacun par trois histidines (en rouge une molécule d'ion hydroxyde piégé par le centre cuivre). En jaune sont représentés les ponts disulfures, en bleu, les hélices alpha et en vert, les feuillets beta. Les extrémités N- et C-terminales sont également indiquées. D'après Gerdemann et al., 2002. (B) et (C) motifs conservés sur les séquences de PPO et de laccase respectivement. Les centres Cu sont représentés en bleu et les histidines responsables de la coordination des atomes de cuivre par des étiquettes rouges. Les étiquettes grises symbolisent l'emplacement de résidus conservés. Les boîtes cuivrées montrent l'emplacement du peptide signal.



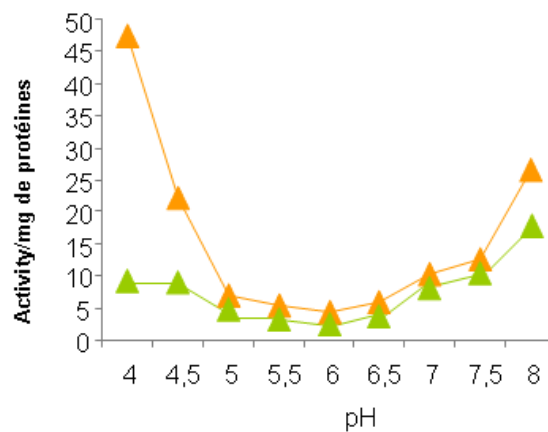
| | | | | | | |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| PLZ | + | + | + | + | + | + |
| PPO | - | + | - | + | - | - |
| POX | - | - | + | + | + | - |
| H ₂ O ₂ | - | - | + | + | - | + |

Fig.II.16. Oxydation *in vitro* de la phloridzine (PLZ, 25 mM) après 3 h d'incubation avec de la tyrosinase commerciale (PPO, 100 U/mL), de la peroxydase commerciale (POX, 100 U/mL) en absence ou présence d'H₂O₂ 25 mM.

A 1 (crésolase)



2 (catécholase)



B

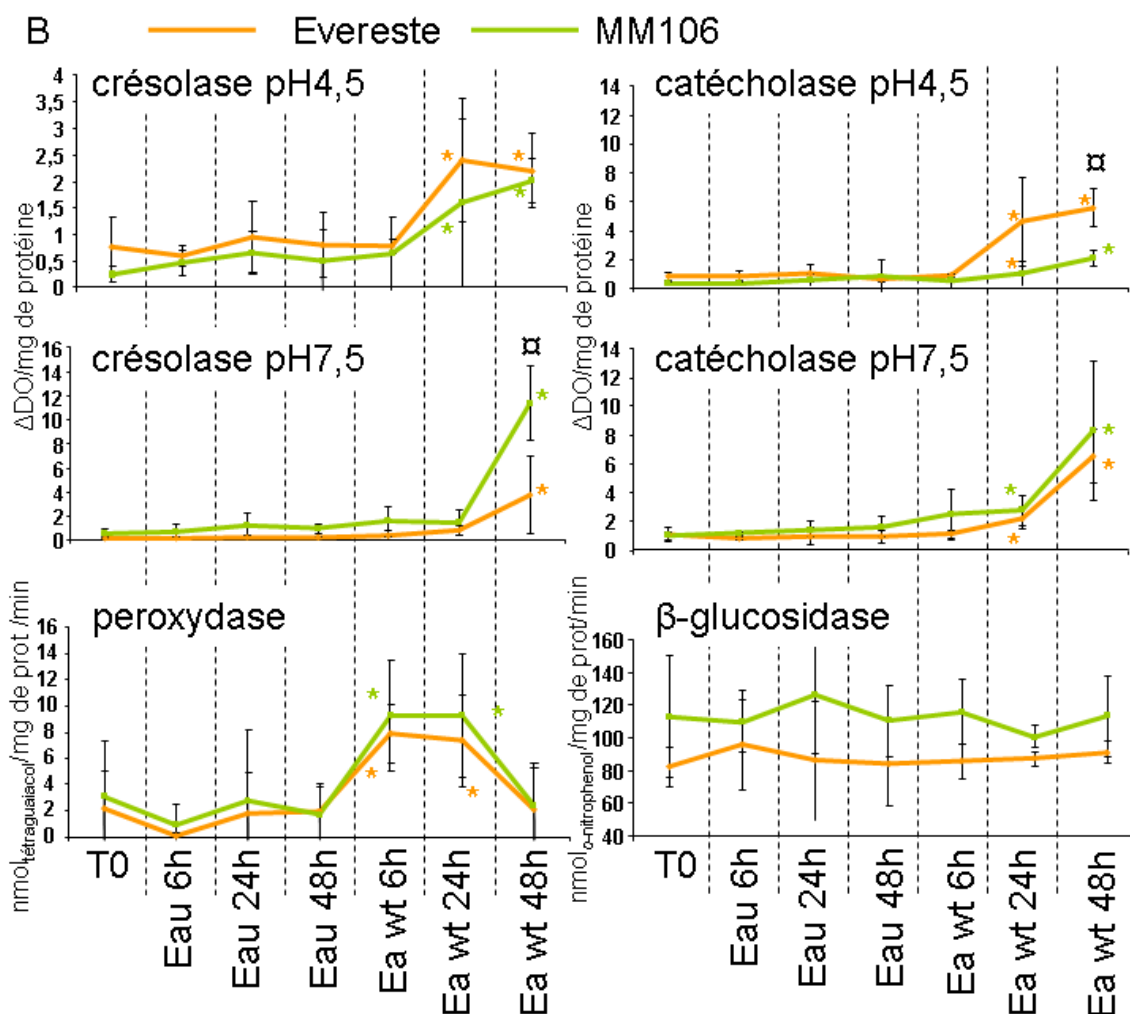


Fig.II.17. (A) détermination des pH optimaux pour les activités crésolase (1) et catécholase (2), à partir d'extraits enzymatiques constitutifs d'Evereste (orange) et MM106 (vert). (B) activités enzymatiques crésolase (oxydation de la phloridzine) et catécholase (oxydation du 4-méthylcatéchol), chacune mesurée à pH4,5 (noter le décalage d'échelle pour l'activité crésolase à ce pH) et pH7,5, ainsi que peroxydase et β-glucosidase, dans des feuilles d'Evereste (orange) et de MM106 (vert), constitutivement ou bien 6, 24 et 48 h après infiltration d'eau ou de la bactérie (Ea wt). Les symboles * indiquent une différence significative (comparaison des intervalles de confiance de la médiane, $p < 0,05$) de l'activité au temps indiqué, par rapport au t0 constitutif. Le symbole α montre une différence significative ($p < 0,05$) entre Everest et MM106. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions biologiques ($n=3$). Les barres aux intervalles de confiance à 95%.

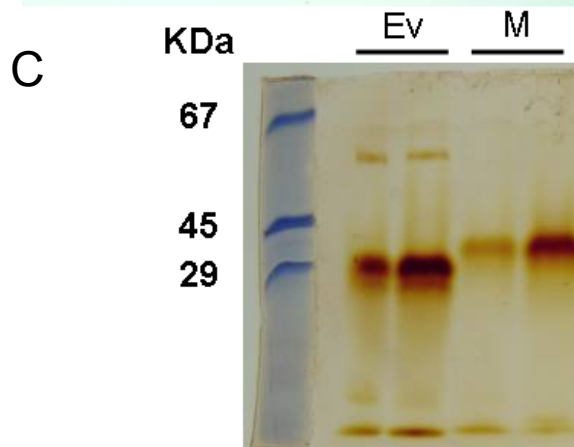
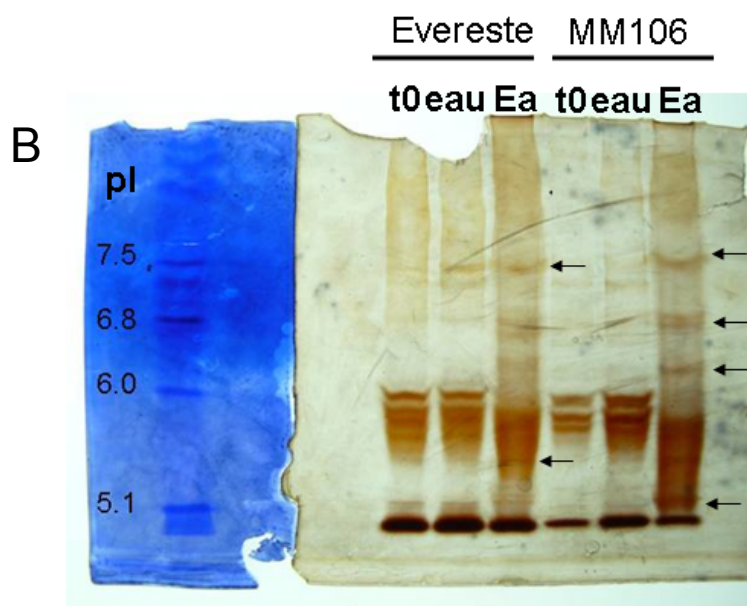
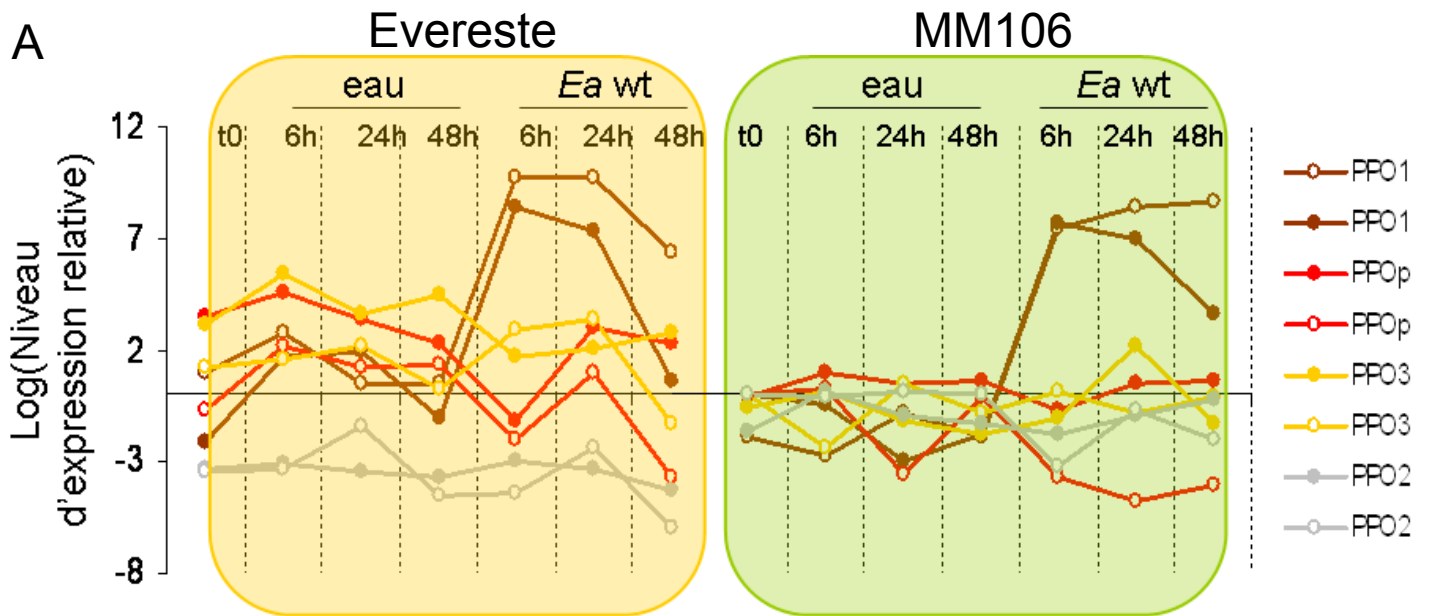


Fig.II.19. (A) Profils d'expression des gènes de PPO isolés chez Evereste (jaune) et MM106 (vert), constitutivement (t0) et après infiltration des feuilles par l'eau et la souche sauvage d'*Ea*. Les deux courbes pour chaque gène (ronds ouverts et pleins) correspondent à deux répétitions biologiques indépendantes. (B) Activité catécholase (100 mM de 4-méthylcatéchol) sur gel d'IEF d'extraits enzymatiques d'Evereste et de MM106, constitutifs ou 24h après infiltration par de l'eau ou la souche sauvage d'*Ea*. Les flèches indiquent les principales formes induites au cours de l'interaction avec *Ea*. (C) Activité crésolase (10 mM de phloridzine) sur gel de SDS-PAGE d'extraits enzymatiques constitutifs d'Evereste (Ev) et de MM106 (M). Les deux pistes pour chaque génotype correspondent à deux répétitions biologiques indépendantes.

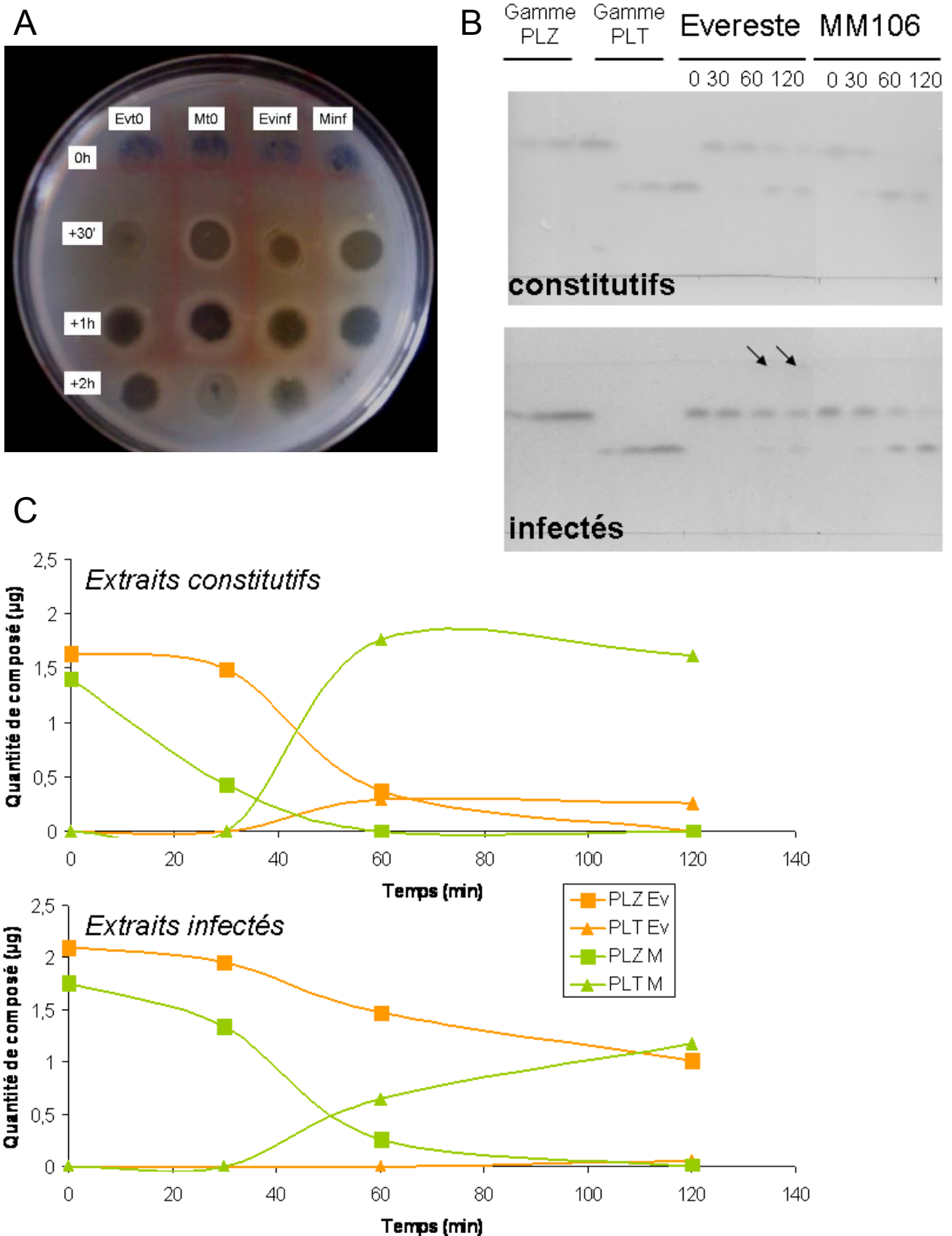


Fig.II.20. Transformation *in vitro* de la phloridzine (5 mM) en présence d'extraits enzymatiques d'Evereste (Ev) ou de MM106 (M), constitutifs (t0) ou infectés (inf). (A) Pouvoir antibactérien des produits de la réaction, déposés initialement (0h), 30 minutes, 1 et 2 heures après le lancement de l'incubation, sur boîte pré-ensemencée par une nappe d'*Ea* 10⁸ cfu/mL, (B) Chromatographie sur couche mince des produits de transformation de la phloridzine, obtenus après incubation avec les extraits enzymatiques constitutifs (en haut) ou de feuilles infectées (en-dessous), révélés par la coloration à la vanilline-HCl. Les flèches désignent des produits d'oxydation jaune apparaissant chez Evereste. (C) Evolution des quantités en phloridzine et phlorétine dans les extraits constitutifs et infectés au cours du temps, calculées à partir de l'intensité (densité/aire) des spots sur les CCM présentées en (B).

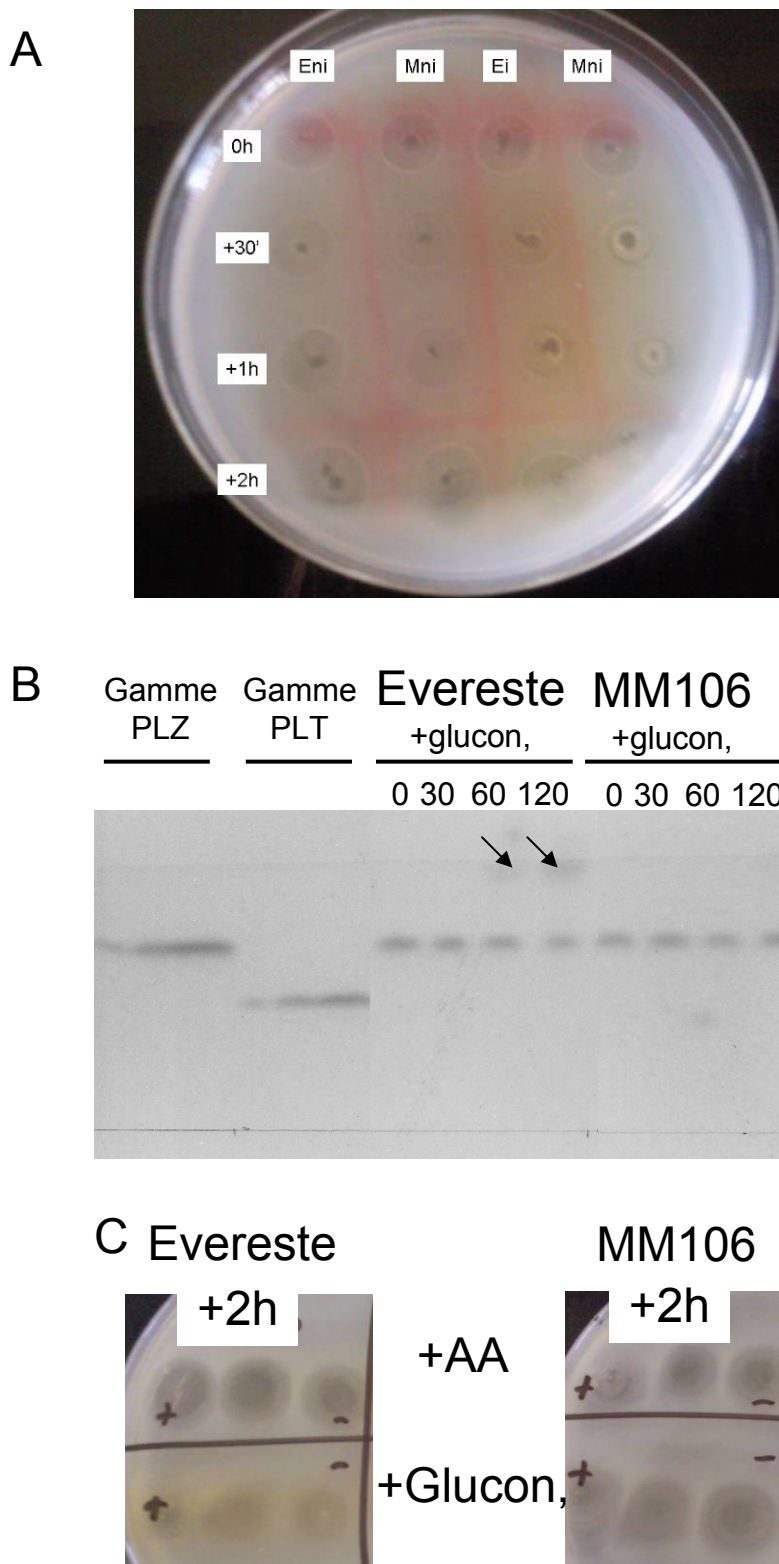


Fig.II.21. (A) et (B) Incubation de la phloridzine avec les extraits enzymatiques d'Evereste et de MM106 dans les mêmes conditions que celles décrites dans la légende de la Fig.II.20., excepté que 10 mM de gluconolactone (glucon.) ont été ajoutés à chacune des réactions. (C) Pouvoir bactéricide évalué sur boîte des produits d'incubation de 5 mM de phloridzine avec les extraits constitutifs d'Evereste et de MM106 en présence de différentes concentrations d'acide ascorbique ou de gluconolactone (de + à -, 10 mM, 5 mM et 2,5 mM).

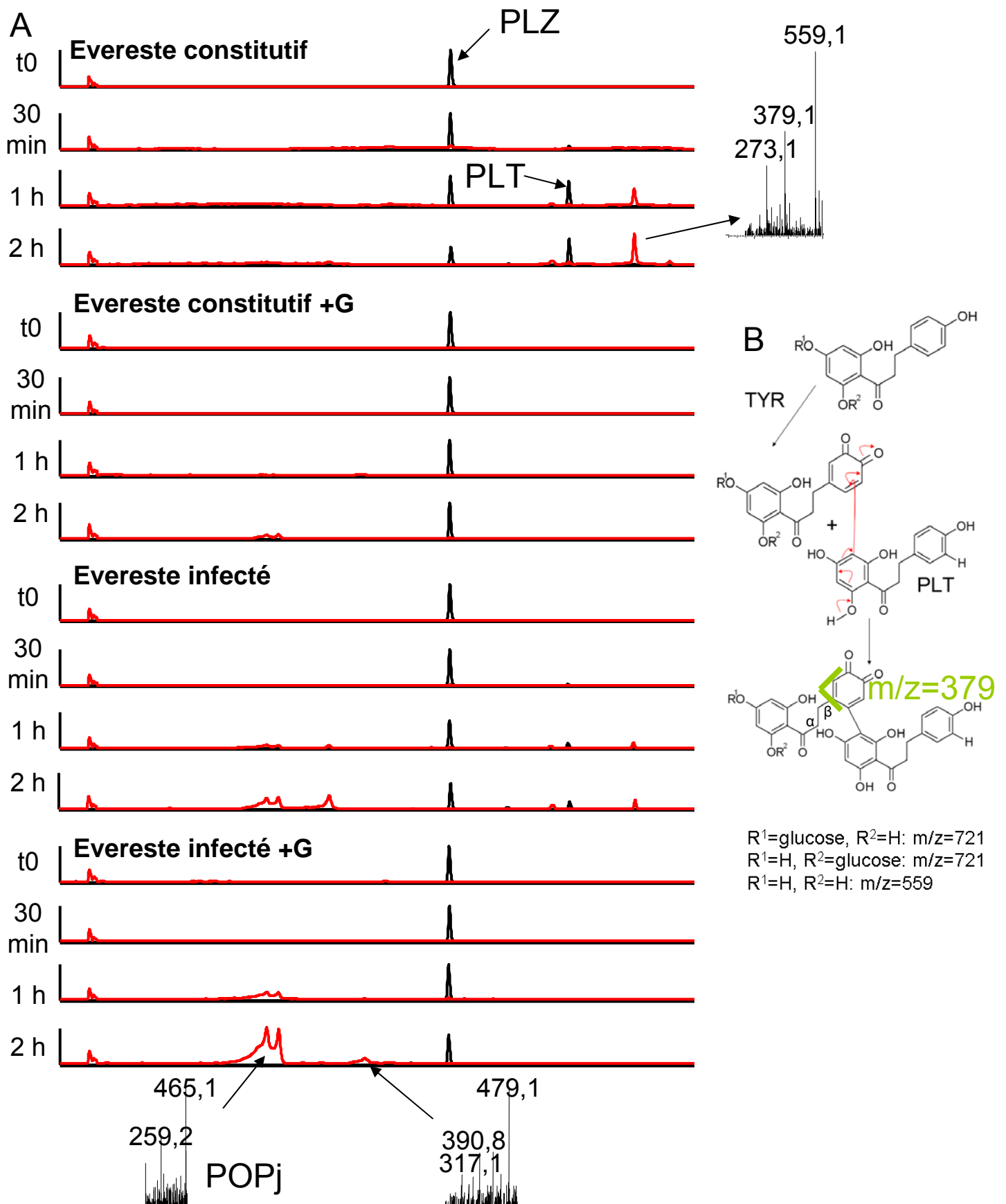


Fig.II.22. (A) chromatogrammes UV (280 nm, en noir) et Visible (400 nm, en rouge) des produits de transformation de la phloridzine après 30 min, 1 et 2 h d'incubation en présence d'extraits enzymatiques de feuille d'Evereste constitutive ou infectées), en présence ou non de gluconolactone (G) et spectres de masses de principaux pigments. Ces résultats indiquent que les voies de transformations sont en compétition car les produits sont formés dans des proportions différentes. POPj = produit d'oxydation de la phloridzine jaune (Guyot et al., 2007). (B) Formation et structures hypothétiques des composés ayant des rapports $m/z = 721$ et 559 , produits lorsque l'activité β -glucosidase est présente, avec l'endroit supposé de fragmentation en mode négatif (en vert).

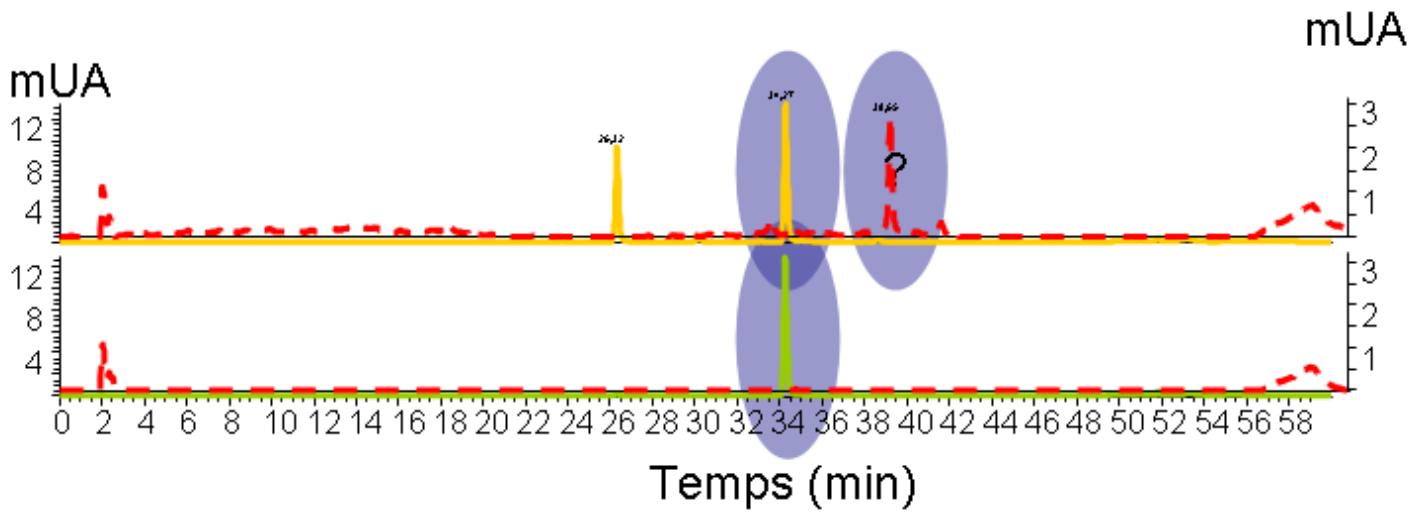


Fig.II.23. Chromatogramme UV (280 nm en traits pleins, échelle à gauche) et à 400 nm (pointillés, échelle à droite) des produits de réaction obtenus au bout de 2h de contact entre la phloridzine et les extraits enzymatiques de feuilles saines d'Evereste (orange, en haut) et de MM106 (en vert, en bas). Les ellipses bleues indiquent la phlorétine et la quinone du conjugué 3-hydroxyphlorétine-phlorétinE. qui pourrait être antibactérien (ellipse bleue avec ?).

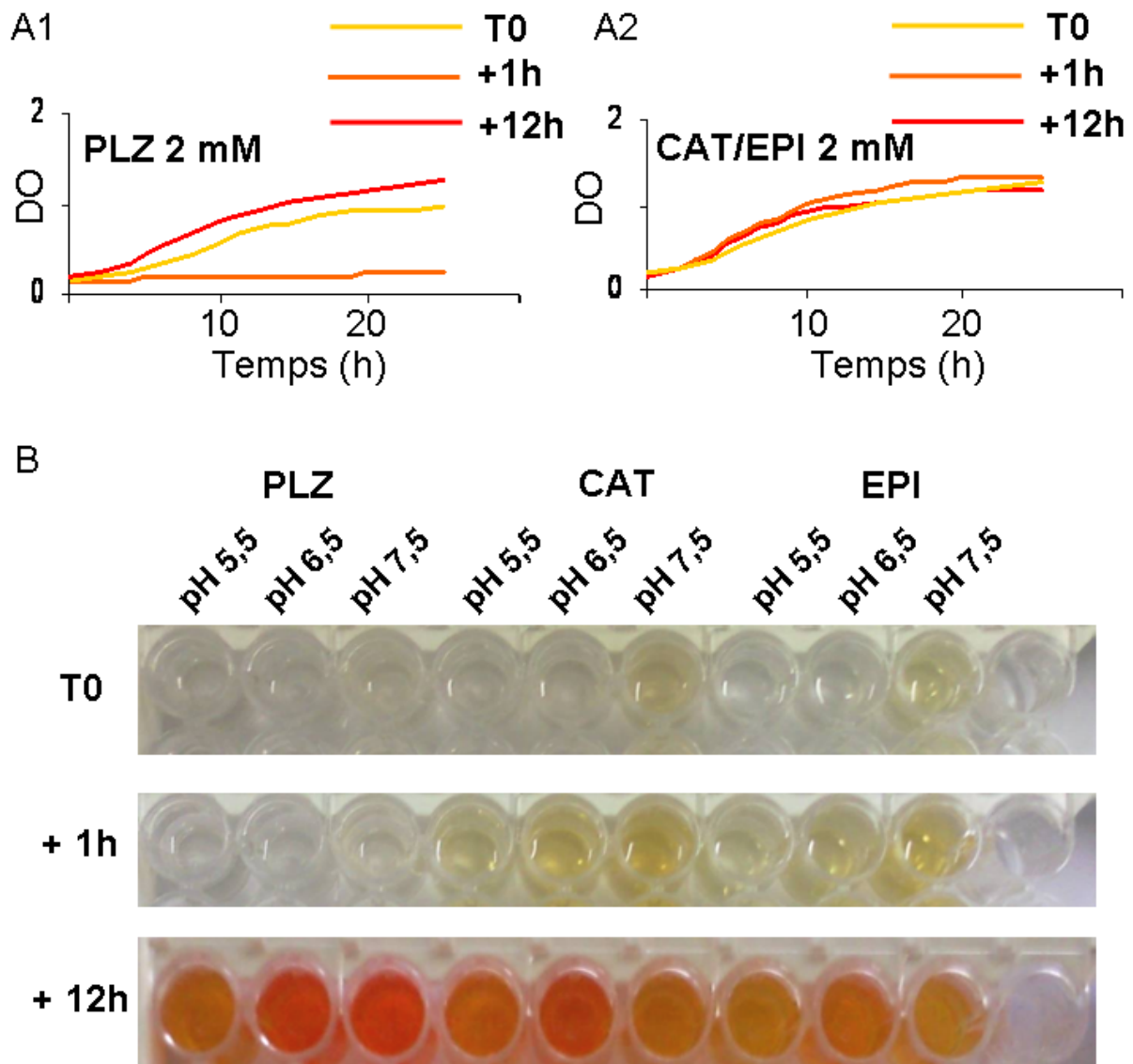


Fig.II.24. (A) Croissance d'*Erwinia amylovora* en milieu riche en présence de phloridzine (A1), de catéchine (CAT) ou d'épicatéchine (EPI) à 2 mM, ajoutée initialement ou après 1 ou 12 h d'incubation avec les extraits enzymatiques d'Evereste. (B) Produits de réaction de l'expérience décrite en (A), à différents pH : 5,5, 6,5, et 7,5.

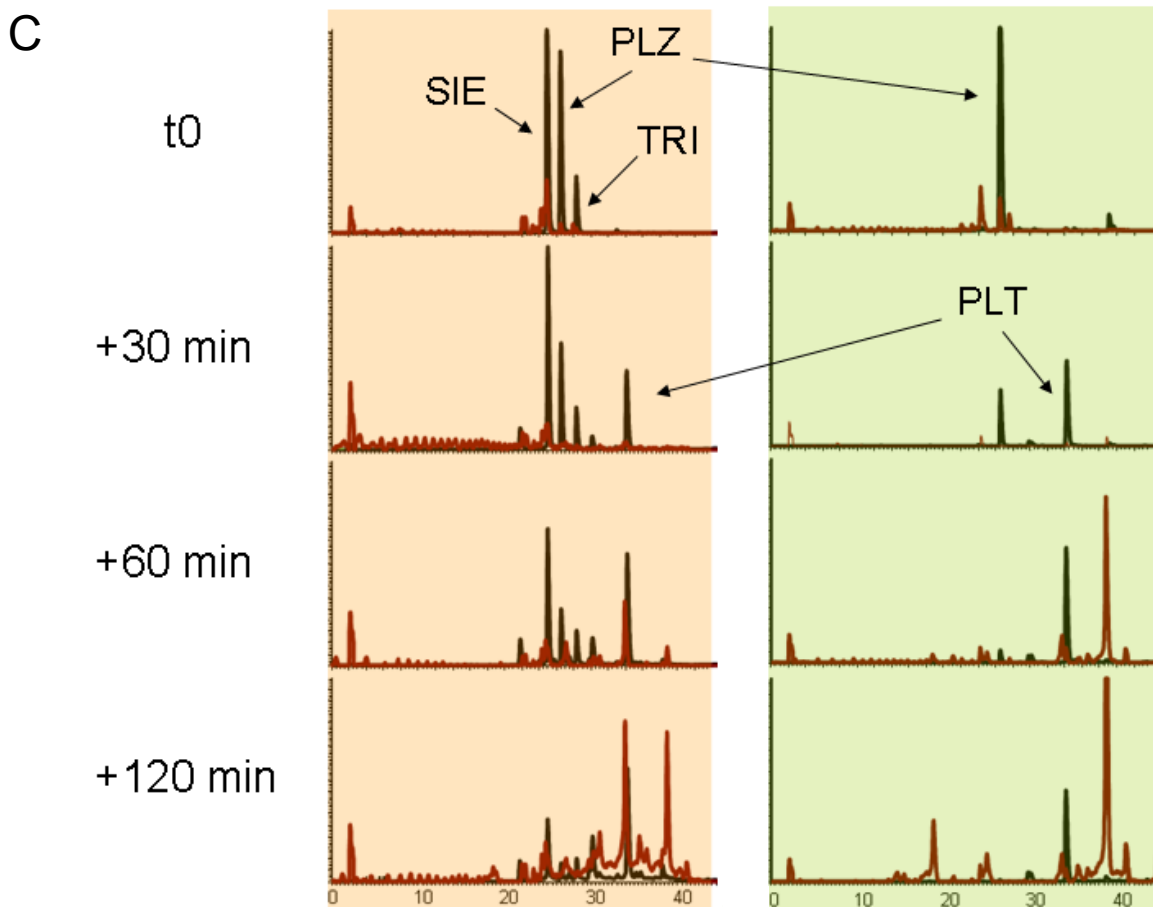
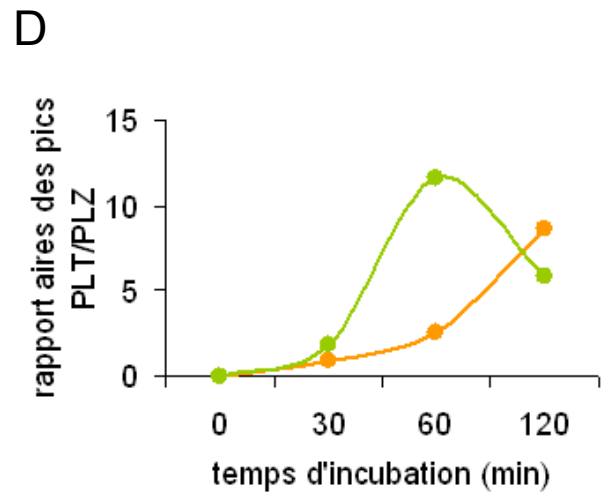
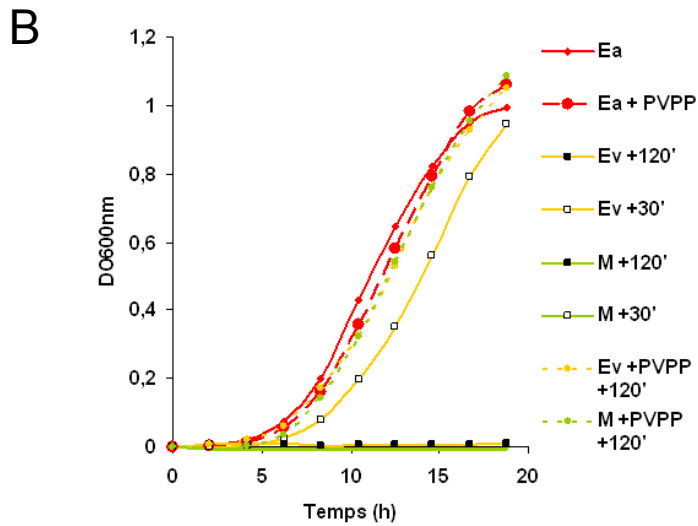
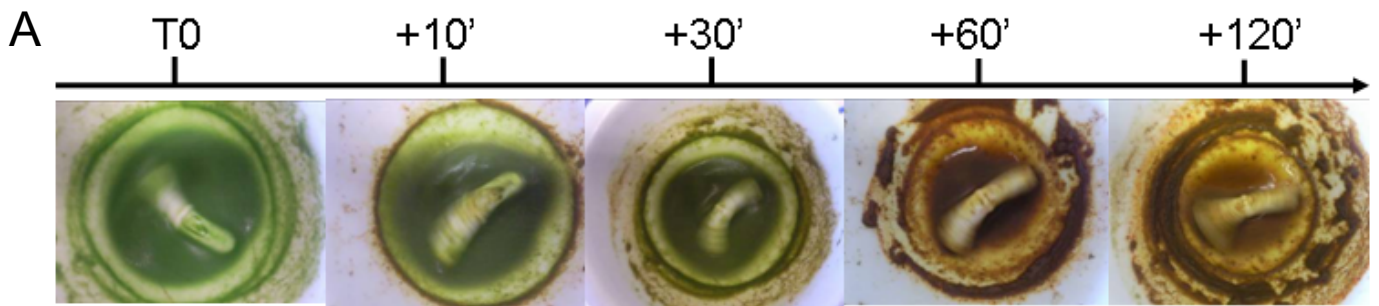


Fig.II.25. (A) Exemple de cinétique d'incubation d'un broyat de feuilles d'Evereste, avec l'importante oxydation qui se produit au cours du temps. (B) Survie d'*Ea* après 30 (carrés blancs) et 120 min (carrés noirs) de contact dans les broyats d'Evereste (en orange) et de MM106 (en vert). (C) Chromatogrammes UV-Visible (280 nm en noir et 420 nm en rouge) d'extraits méthanoliques de broyats de feuilles d'Evereste (fond orange) et de MM106 (fond vert), prélevés 30', 60' et 120' après incubation. (D) Evolution du rapport phlorétine/phloridzine (PLT/PLZ), calculé à partir des aires de pics, chez Everest (en orange) et MM106 (en vert).

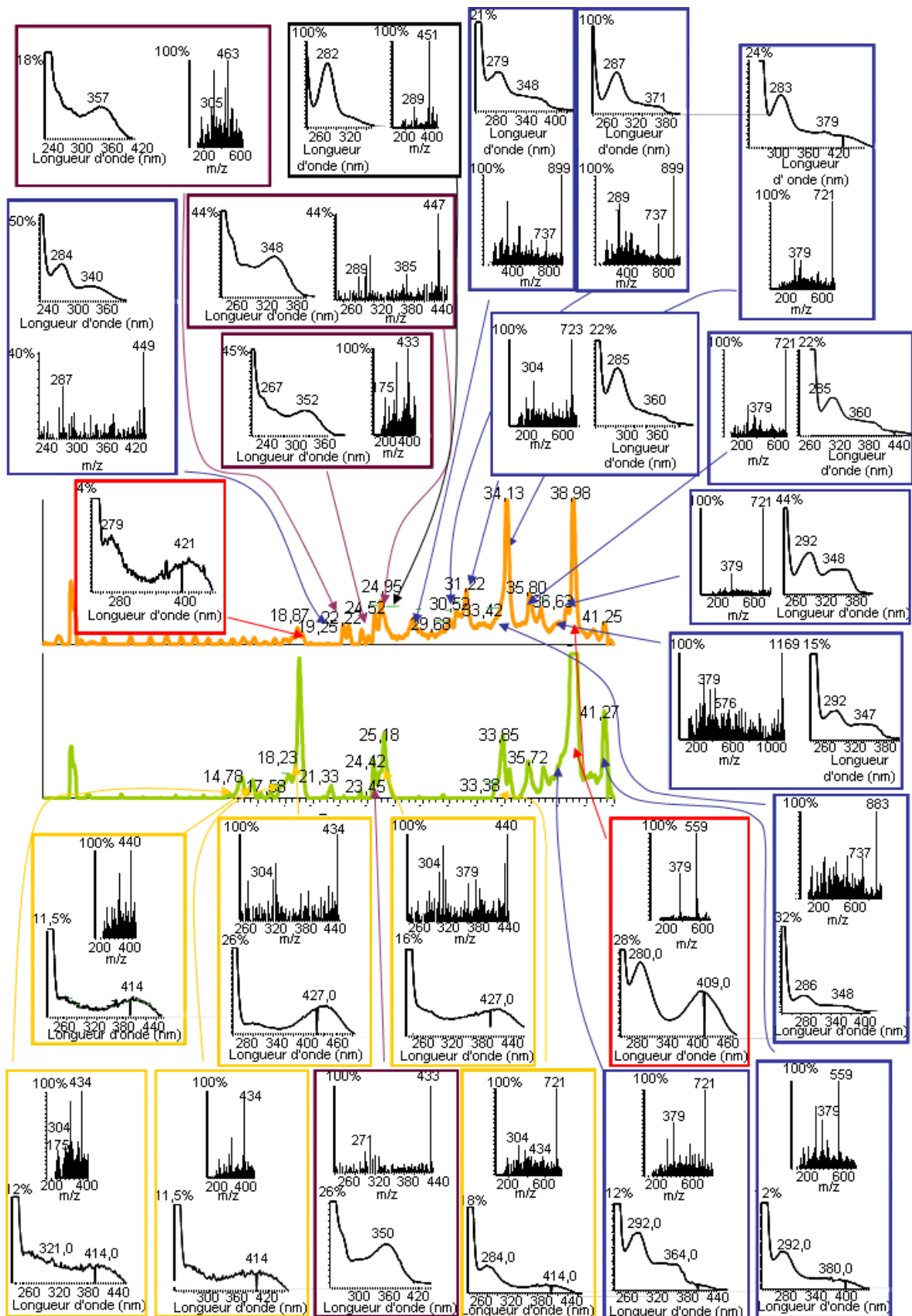


Fig.II.26. Détail des principaux pics détectés à 400 nm dans les extraits de broyats de feuilles d'Evereste (orange) et MM106 (vert), prélevés après 2 h d'incubation à température ambiante. Pour chacun de ces pics sont donnés le spectre UV-Vis et le spectre de masse (quand cela a été possible), ainsi que les maxima d'absorption et les masses des ions remarquables. Les composés peuvent être répartis en 5 classes, en fonction de leur spectre d'absorption UV-Vis: en bleu, les composés ayant un maximum d'absorption à 280 nm et un plateau vers 350 nm, en violet, ceux ayant leur maximum vers 350 nm, en jaune, maximum d'absorption vers 420 nm, en rouge, les composés ayant deux maximum d'absorption, à 280 nm et vers 400 nm, et en noir, ceux ayant un maximum d'absorption à 280 nm.

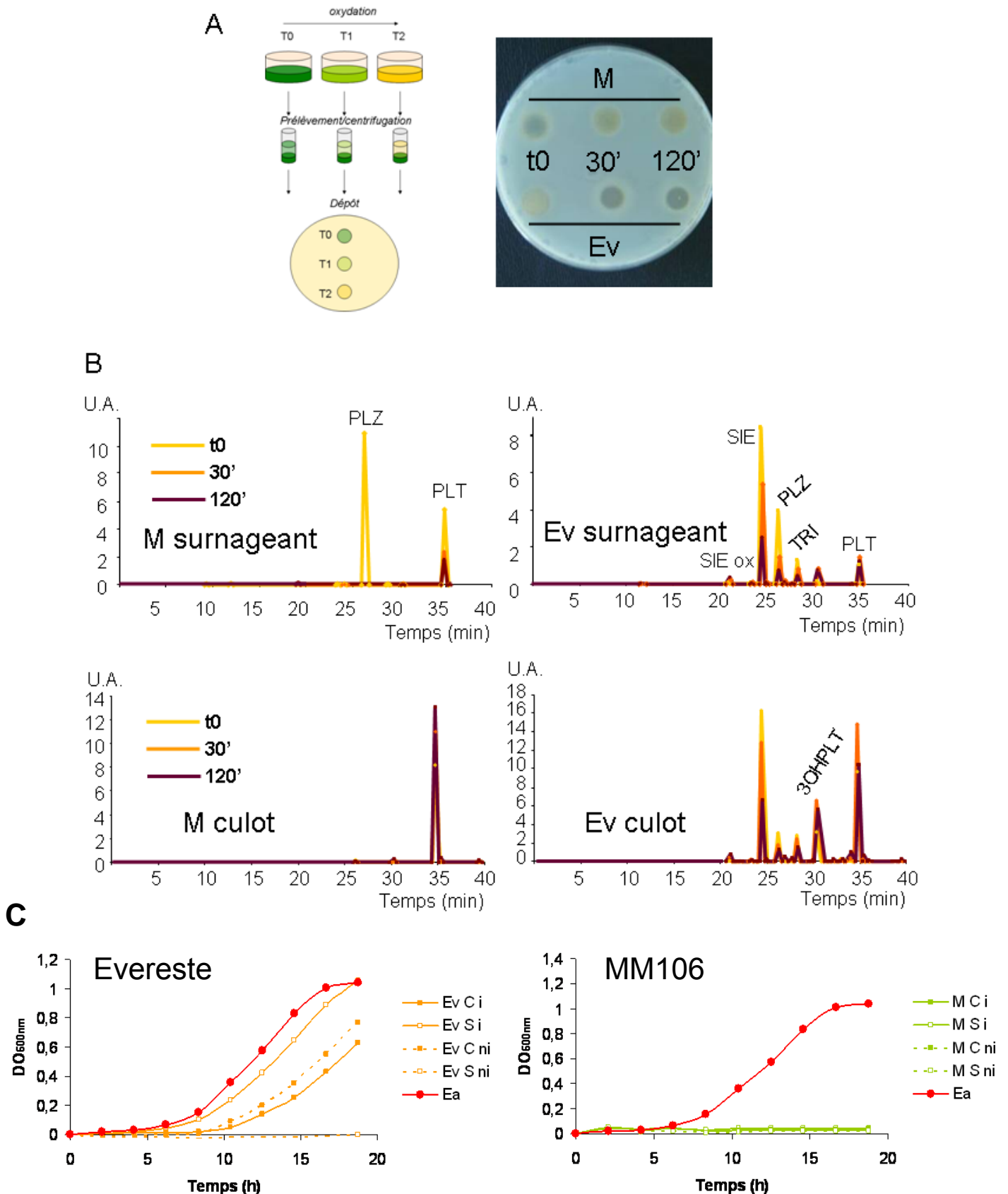


Fig.II.27. (A) Analyse de surnageants de broyat de feuilles saines d'Evereste (Ev) et de MM106 (M) obtenus après centrifugation du prélèvement aux temps indiqués : pouvoir antibactérien sur boîte pré-ensemencée avec une suspension d'*Ea*. (B) Chromatogrammes UV (280 nm) des surnageants et culots analysés par HPLC. La courbe en jaune correspond à l'échantillon prélevé dès le début du broyage et les courbes orange et violette aux échantillons prélevés après 30 min et 120 min respectivement. SIE=sieboldine, PLZ=phloridzine, TRI=trilobatine, PLT=phlorétine. (C) Croissance d'*Ea* après 120 min de contact avec le culot (C) ou le surnageant (S) de broyats de feuilles saines (ni) et de feuilles infectées depuis 24h (i).

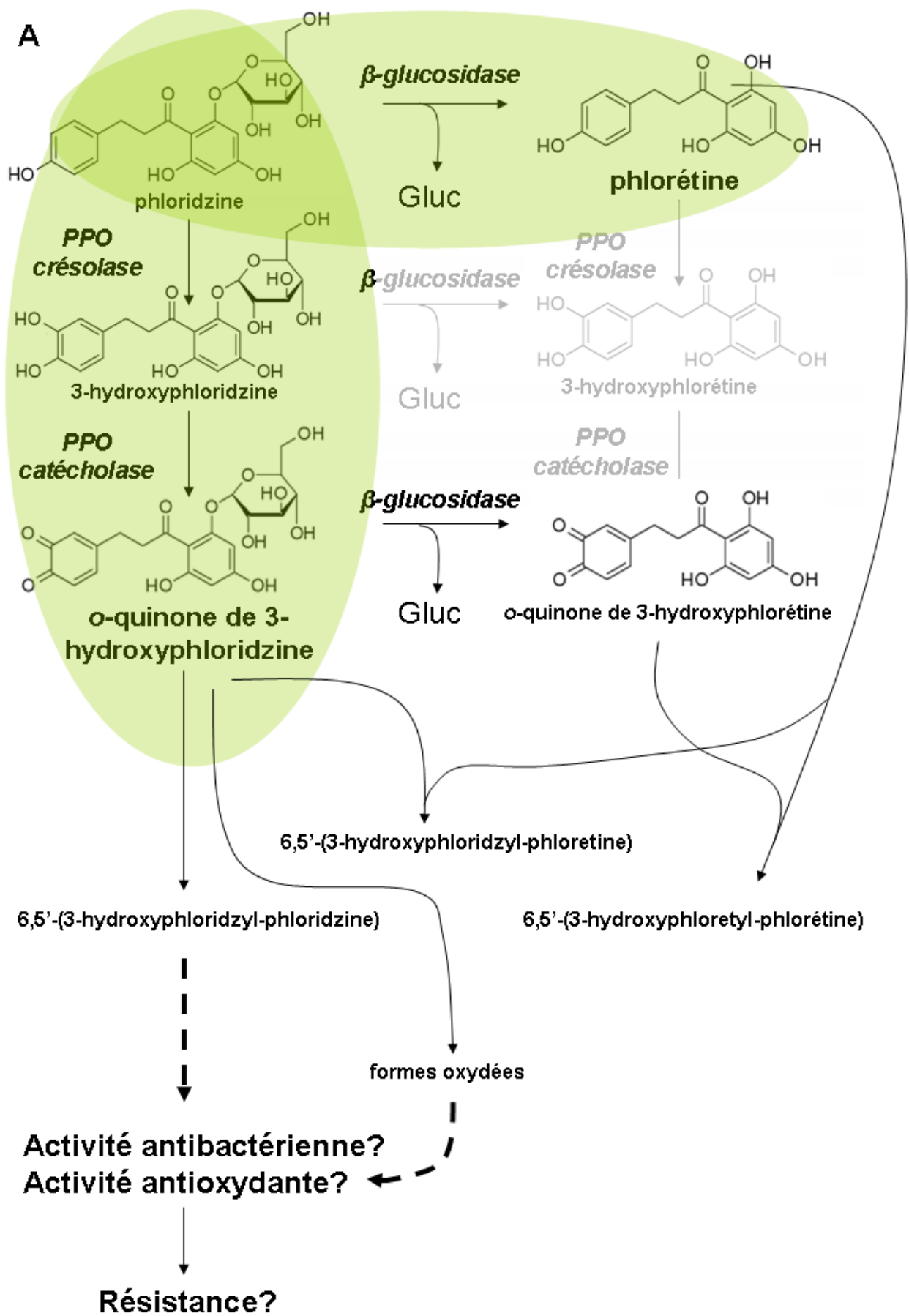


Fig.II.28. (A) Voies préférentielles de la transformation de la phloridzine par les enzymes d'Evereste. Les deux voies conduisant (i) à la déglucosylation de la phloridzine en phloretine et (ii) à la formation d'*o*-quinones sont actives dans ce génotype. Les produits de ces deux voies se conjuguent par couplage oxydatif. Les flèches en pointillés indiquent des hypothèses.

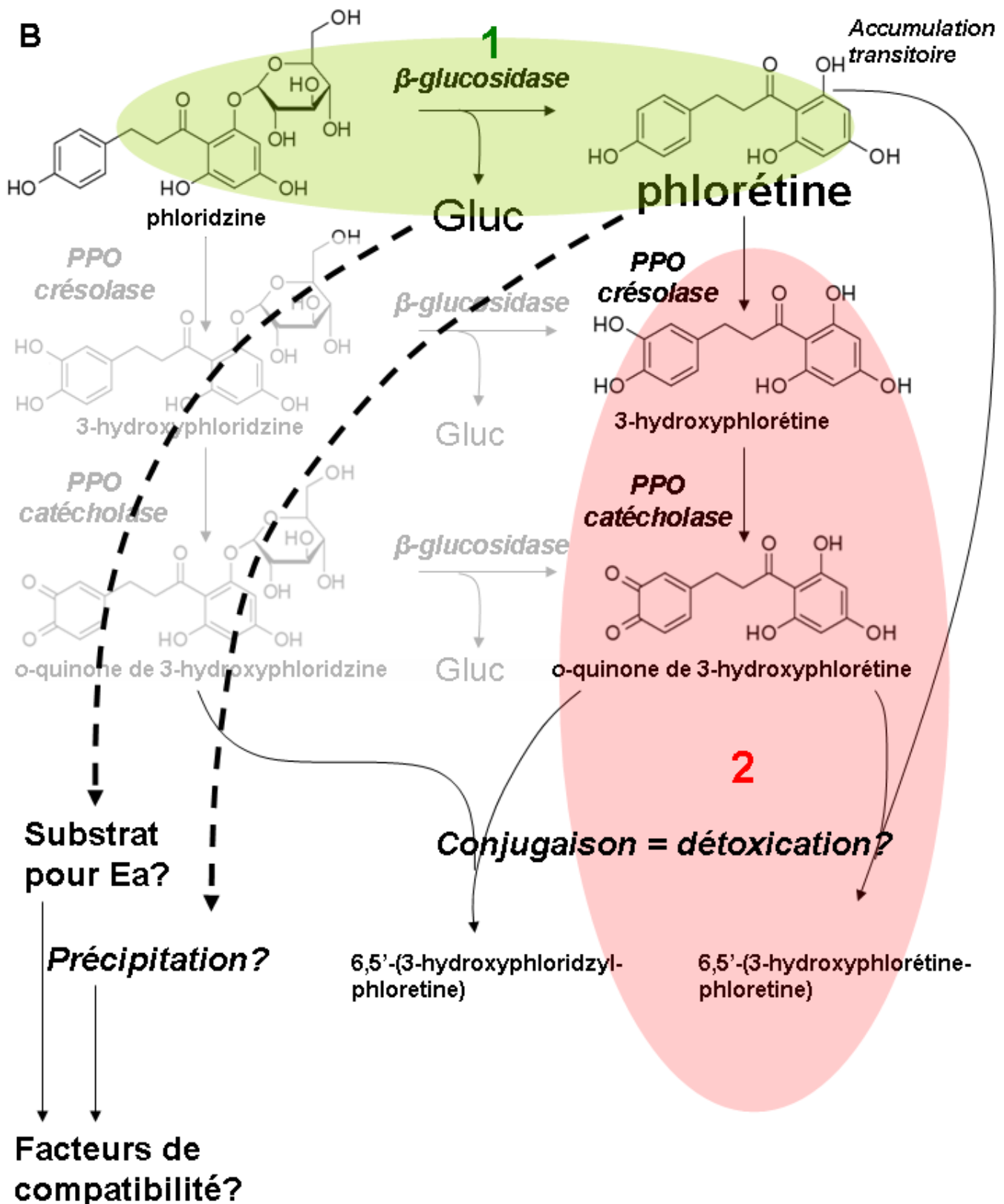


Fig.II.28. (B) Voies préférentielles de la transformation de la phloridzine par les enzymes de MM106. La réaction de déglucosylation de la phloridzine est prédominante (1), la phloretine ainsi libérée peut alors être oxydée puis être sujette à des couplages oxydatifs. Les flèches en pointillés indiquent des hypothèses.

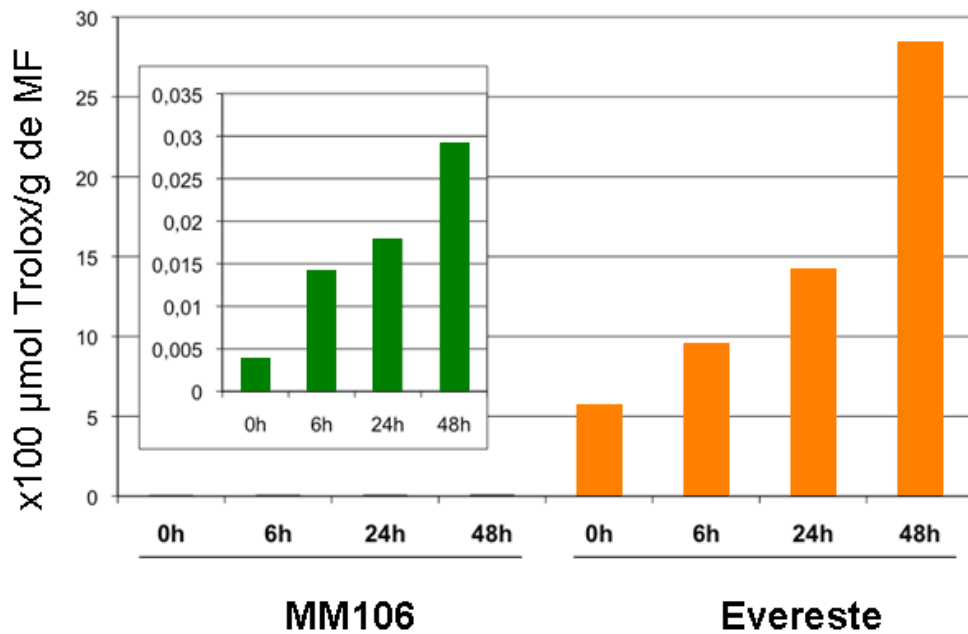


Fig.II.29. Activité de piégeage de radical DPPH exprimée en μmol de Trolox par g de MF, des extraits méthanoliques de feuilles de MM106 (vert) et d'Evereste (orange), au cours de l'infection par *Ea*, inoculée par infiltration à 10^7 cfu/mL.

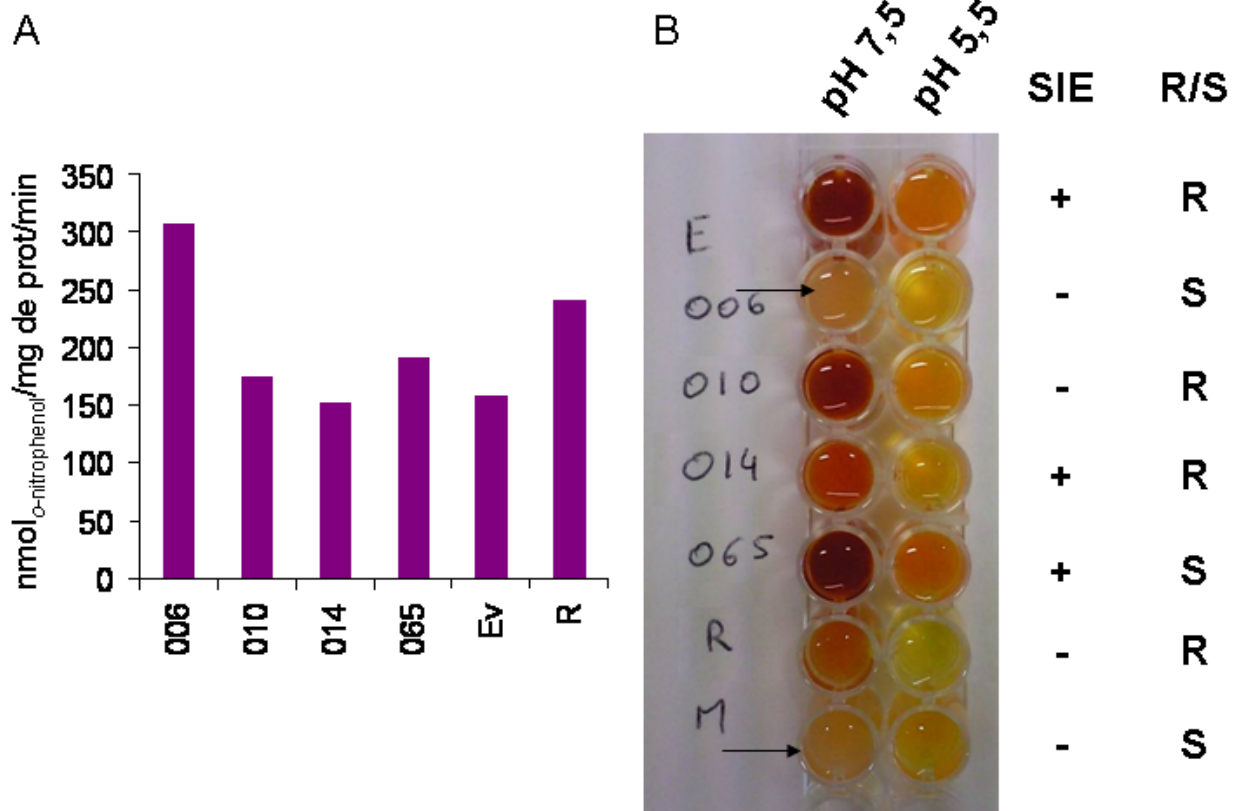


Fig.II.30. (A) Dosage de l'activité β -glucosidase constitutive dans des extraits enzymatiques des 4 descendants décrits en (B), d'Evereste (Ev) et de Robusta (Rob). (B) incubation de 5 mM de phloridzine à pH 7,5 et 5,5 avec les extraits enzymatiques de Robusta (R), MM106 (M) et Evereste (E), ainsi que de 4 descendants représentant les 4 profils (résistant/sensible et présence/absence de sieboldine), SIE = sieboldine. R = résistant, S = sensible. Photo prise 24 h après incubation à température ambiante. Noter l'opacification liée à la libération de phlorétine dans certains puits (flèches noires).

| | amorces 5' | | amorces 3' | |
|-------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | GSP1 | nGSP1 | GSP2 | nGSP2 |
| <i>PPOp</i> | GCTGTATTCTGTTCTGGTCG | AGAGGGATGACGACGTATCG | TGCCCCGCCGCCTTCCAC | CGTTCCATCGTTGGTACCTC |
| <i>PPO1</i> | AATGCACGGCTGCCTGTT | GGTAGGGCCTTCATGAGCTC | GTTCACTTCTGTTGGCTATTCTTCC | GACCAAGCCTACAGGGACAA |
| <i>PPO2</i> | ACCTTAATGCTGTCGTCCG | TCTTGATCTGACGGACGGTA | GACGAGCCTCCGCCTTGG | TAACGGACTTGCTGGAGGAC |
| <i>PPO3</i> | GTCCACGTTGCAATGGTG | GTAAACAGGGGATCCCGAC | GGCAGGAGACACAACAACAG | GGCACCATTGAGAACAGTCC |
| | LD-PCR | | qPCR | |
| | direct | reverse | direct | reverse |
| <i>PPOp</i> | GGGAATTGCAGAGTGCAAAA | TAGTGCTTTTATTCACGAGGAACA | CAGGGCTTAGCAAGACTC | TGTGATGGGTGGCAACAATCG |
| <i>PPO1</i> | GGGTACCCAACAAAACCAGA | CGAACAAAATGTGATTCCAA | cf tableau I.2 | cf tableau I.2 |
| <i>PPO2</i> | NA | NA | AATCATCTCAGCACACCC | TGACGAGCCTCCGCCTTGG |
| <i>PPO3</i> | GGGACACAAGCAAAAACATA | TTGATGAACCAAGTAAAATTACGG | CGGCGGACTAGAAGTTACCC | TGCAGGAGACACAACAACAGG |

Tableau II.3. Liste des amorces utilisées pour le clonage des extrémités 5' et 3' des PPO par RACE PCR, pour la PCR longue distance (LD-PCR) et des amorces dessinées sur les séquences obtenues par cette méthode pour en suivre l'expression par qPCR, NA = non réalisé.