



**HAL**  
open science

# Analyse intégrée de la réponse de la vigne à l'infection par *Plasmopara viticola* : par l'étude d'un cas de contournement de résistance

Lise Negrel

► **To cite this version:**

Lise Negrel. Analyse intégrée de la réponse de la vigne à l'infection par *Plasmopara viticola* : par l'étude d'un cas de contournement de résistance. Virologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ021 . tel-01531832

**HAL Id: tel-01531832**

**<https://theses.hal.science/tel-01531832>**

Submitted on 2 Jun 2017

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE des sciences de la vie et de la santé**

**ED414**

**THÈSE** présentée par :

**Lise NEGREL**

soutenue le : **27 mai 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**ANALYSE INTEGREE DE LA REPONSE DE LA VIGNE  
A L'INFECTION PAR *PLASMOPARA VITICOLA***

**Par l'étude d'un cas de contournement de résistance**

**THÈSE dirigée par :**

**M. MERDINOGLU Didier** Directeur de recherche, université de Strasbourg – INRA (Colmar)

**M. HUGUENEY Philippe** Directeur de recherche, université de Strasbourg – INRA (Colmar)

**RAPPORTEURS :**

**Mme. GODIARD Laurence** Directeur de recherche – INRA (Castanet Tolosan)

**Mme. MANZANARES-DAULEUX Maria** Professeure, université de Rennes – INRA (Rennes)

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. HEHN Alain** Professeur, université de Nancy – INRA (Nancy-Colmar)

**M. SCHALLER Hubert** Directeur de recherche, université de Strasbourg – CNRS (Strasbourg)

---

**MEMBRE INVITE :**

**Mme. MAILLOT Pascale** Maître de Conférences – UHA (Mulhouse-Colmar)



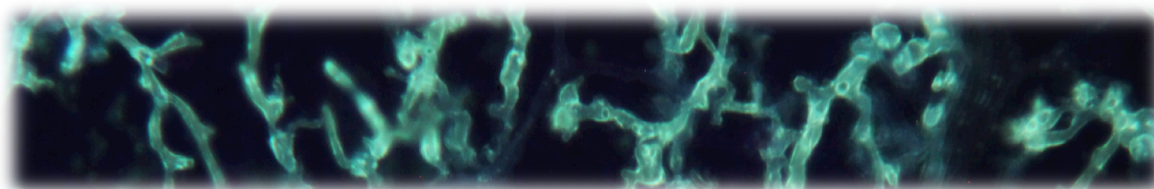




**Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg**  
Ecole doctorale des Sciences de la vie et de la Santé  
Spécialité: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Présentée par Lise NEGREL**

Pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université de Strasbourg



**ANALYSE INTEGREE DE LA REPONSE DE LA VIGNE A  
L'INFECTION PAR *PLASMOPARA VITICOLA***

*Par l'étude d'un cas de contournement de résistance*

Thèse soutenue publiquement le 27 mai 2016 devant le Jury:

Laurence Godiard  
Maria Manzanares-Dauleux  
Alain Hehn  
Hubert Schaller  
Pascale Maillot  
Philippe Huguency  
Didier Merdinoglu

Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examineur externe  
Examineur interne  
Membre invité  
Co-Directeur de thèse  
Directeur de thèse





*“Ce n’est qu’en essayant continuellement  
que l’on finit par réussir.  
Autrement dit: plus ça rate, plus on a de  
chances que ça marche”*

**Pr. Shadoko**



## ***Remerciements***

Resonger à ces dernières années si intenses, aux joies, aux fous rires, aux déceptions, et à toutes ces personnes croisées, laisse place à une certaine nostalgie.

Je tiens tout d'abord à remercier Laurence Godiard, Maria Manzanares-Dauleux, Alain Hehn, Hubert Schaller et Pascale Maillot, qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également Fabienne Bailleul, Véronique Brault, et Yves Gibon pour leur participation à mon comité de thèse, vos conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Cette thèse n'aurait pas été réalisable sans le soutien de la Région Alsace et celui des interprofessions viticoles d'Alsace (CIVA), de Bourgogne (BIVB), et de Champagne (CIVC), qui ont financé ce projet. Je voudrais donc les remercier pour m'avoir offert cette opportunité.

Merci à Philippe Hugueney et Didier Merdinoglu, mes deux directeurs de thèse, pour vos précieux conseils, vos encouragements et votre implication dans ce projet.

Ce projet de thèse a été réalisé grâce à plusieurs collaborations scientifiques. Encore merci à Yves Gibon, à Catherine Deborde et à Annick Moing pour m'avoir accueillie à l'INRA de Villenave-d'Ornon, et pour s'être investis dans ce projet.

Je remercie vivement mes collègues de l'équipe de Génétique et Amélioration de la Vigne, et de l'équipe Métabolisme Secondaire de la Vigne. Merci à Pere Mestre, et Emilce Prado pour vos conseils, à Sabine Wiedmann-Merdinoglu pour m'avoir guidé lors de mes premières inoculations et observations microscopiques et à Morgane Bavière pour son aide en qPCR. Un grand merci à Raymonde Baltenweck pour tout ce que qu'elle m'a appris avec patience, pour ses analyses et pour son professionnalisme. Merci à David Halter pour sa formation sur R, ainsi que pour ses représentations graphiques, bien que nos goûts diffèrent visiblement en matière de couleurs. Merci à Sophie Blanc pour son soutien et ses encouragements. Je remercie l'ensemble de mes collègues pour m'avoir si bien accueillie.

Je tiens à témoigner toute ma sympathie envers les thésardes, thésards et post-doc de l'INRA de Colmar que j'ai eu la chance de côtoyer. Je vous souhaite du courage et beaucoup de ténacité !

Je tiens à remercier de nouveau particulièrement Raymonde Baltenweck et David Halter avec qui travailler a été un véritable plaisir. Merci Raymonde pour ta gentillesse, ta patience et ta disponibilité. J'espère ne pas en avoir trop abusé. Merci David pour ton soutien et pour ton excellent café sans lequel je n'aurais pas tenu la dernière ligne droite. Merci à vous deux, ainsi qu'à Philippe Huguéney de vous être autant investi ces dernières semaines.

Enfin, je remercie évidemment ma famille, pour avoir supporté mon obsession de ces dernières années, même de loin. Merci Ninon de m'avoir soutenue même tard le soir. Merci à toi Jean de m'avoir conseillé durant ces années. Merci à mes parents de leur soutien, durant la thèse mais également durant toutes les années précédentes.

Je conclus ici en remerciant une nouvelle fois l'ensemble du personnel de l'INRA de Colmar, en vous souhaitant une très bonne continuation pour les années à venir.

# Table des matières

---

<b>Revue bibliographique: Early events in plant-oomycete interactions .....</b>	<b>1</b>
<b>1. From the release of zoospores to germinating cysts .....</b>	<b>4</b>
1.1 Electrotaxis in root-zoospore interactions .....	5
1.2 Chemotaxis influences zoospore swimming direction .....	6
1.2.1 Chemotaxis of zoospores for root exudates .....	6
1.2.2 Chemotaxis in leaf-zoospore interactions .....	7
<b>2. The encystment process .....</b>	<b>8</b>
2.1 Protein interactions involved in adhesion .....	9
2.2 Molecular stimuli of encystment .....	10
2.3 Ca <sup>2+</sup> is an important second messenger in early phases of infection .....	12
2.3.1 Role of Ca <sup>2+</sup> in zoospore release and swimming .....	12
2.3.2 Role of Ca <sup>2+</sup> in the encystment process .....	13
2.3.3 Mechanisms of Ca <sup>2+</sup> action .....	13
2.4 Sensing pathways in oomycetes .....	14
2.5 Conclusion .....	15
<b>3. The biotrophic phase .....</b>	<b>16</b>
3.1 The infection structures .....	16
3.1.1 Appressoria, adhesion and penetration structures .....	16
3.1.2 The haustorium, an intimate contact between host and pathogen .....	19
3.2 Molecular dialogue in plant-oomycete interactions .....	23
3.2.1 Specific and non-specific defenses in plant immunity .....	23
3.2.2 Oomycete elicitors and plants receptors .....	24
3.3 Defense signaling pathways .....	25
3.3.1 Lipid elicitors .....	25
3.3.2 $\beta$ -glucans elicitors .....	26
3.3.3 Protein elicitors .....	26
3.4 Early events at the plant-oomycete interface .....	27
3.4.1 Rearrangements of the cytoskeleton .....	27
3.4.2 Callose formation .....	27
3.5 Impact of oomycete infection on host primary metabolism .....	28
3.5.1 Carbohydrate metabolism .....	28
3.5.1.1 Starch metabolism .....	28
3.5.1.2 Sucrose .....	29
3.5.1.3 Invertase activity and increase in hexose concentrations .....	30
3.5.1.4 Disruption of photosynthesis .....	30



3.5.2	Amino acid metabolism .....	31
3.6	Secondary responses to oomycete infection .....	32
3.6.1	Oxidative burst .....	32
3.6.2	Induction of defense-related secondary metabolism by oomycetes .....	33
<b>4.</b>	<b>Sporulation.....</b>	<b>35</b>
<b>Objectifs de la thèse .....</b>		<b>46</b>
<b>1.</b>	<b>Contexte .....</b>	<b>48</b>
1.1	La viticulture en France.....	48
1.2	Plasmopara viticola, agent pathogène de la vigne .....	48
1.3	Les facteurs de résistance au mildiou .....	50
1.4	Contrôle du développement du mildiou .....	53
<b>2.</b>	<b>Objectifs de la thèse de la thèse .....</b>	<b>54</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>		<b>58</b>
<b>1.</b>	<b>Matériel .....</b>	<b>60</b>
1.1	Vitis vinifera .....	60
1.2	Isolats de Plasmopara viticola .....	60
1.3	Préparation de l'inoculum de mildiou.....	60
1.4	Inoculation des feuilles de vignes par P. viticola .....	60
<b>2.</b>	<b>Méthodes.....</b>	<b>61</b>
2.1	Observations microscopiques.....	61
2.1.1	Matériel.....	61
2.1.2	Colorations histologiques.....	62
2.1.2.1	Coloration au DAPI de l'ADN d'une suspension de sporanges.....	62
2.1.2.2	Coloration au Blankophor des parois de zoospores enkystés .....	62
2.1.2.3	Coloration au bleu d'aniline .....	62
2.2	Quantification de la biomasse du mildiou .....	63
2.2.1	Matériel.....	63
2.2.2	Estimation de la concentration des suspensions de sporanges.....	63
2.2.3	Quantification du mildiou par analyse qPCR .....	64
2.2.3.1	Extraction de l'ADN de feuilles de vignes et de suspension de sporanges .....	64
2.2.3.2	Dessin des amorces qPCR spécifiques à P. viticola et V. vinifera .....	64
2.2.3.3	Amplification PCR.....	65
2.2.3.4	PCR quantitative.....	65
2.3	Analyses métabolomiques.....	67
2.3.1	Analyse LC-MS.....	67
2.3.1.1	Système d'analyse des métabolites.....	67
2.3.1.2	Extraction des disques foliaires de vignes.....	68

2.3.1.3	Analyse des données LC-MS.....	69
2.3.1.4	Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire.....	71
2.3.1.4.1	Préparation des échantillons .....	71
2.3.1.4.2	Appareillage et traitement des données .....	72
2.3.1.4.3	Principe de la RMN .....	72

**Chapitre I : Identification de marqueurs lipidiques de l'infection de la vigne par *Plasmopara viticola* ..... 74**

**1. Introduction..... 76**

**Identification of lipid markers of *Plasmopara viticola* infection in grapevine using a non-targeted metabolomic approach ..... 77**

**Chapitre II : Analyse qualitative et quantitative de l'infection de la vigne par *Plasmopara viticola* ..... 106**

**1. Caractérisation histologique de l'interaction entre *V. vinifera* cv. Bianca et des souches compatibles ou incompatibles de *P. viticola*..... 108**

1.1 Contexte..... 108

1.2 Efficacité d'infection de l'isolat Lednice ..... 109

1.2.1 Evaluation de la quantité de zoospores par sporange ..... 109

1.2.2 Nombre de zoospores enkystées par stomates..... 110

1.2.3 Nombre de stomates infectés 12 hpi ..... 111

1.2.4 Propagation du mycélium et symptômes de résistance..... 112

1.2.5 Conclusion ..... 115

**2. Analyse quantitative de l'infection par *P. viticola*..... 116**

2.1 Contexte..... 116

2.1.1 Notation visuelle..... 116

2.1.2 Quantification de la sporulation ..... 117

2.1.3 L'observation microscopique..... 117

2.2 Identification de lipides spécifiques au mildiou et quantification de biomasse du pathogène par une approche lipidomique ..... 118

2.2.1 Présentation de l'outil d'analyse ..... 118

2.2.2 Caractérisation de nouveaux lipides chez *P. viticola*..... 119

2.2.3 Utilisation des lipides caractérisés pour la quantification du développement de *P. viticola*..... 121

2.2.4 Evolution de la composition lipidique de *P. viticola* au cours de l'infection ..... 123

2.2.5 Conclusions et perspectives ..... 125

2.3 Développement d'une méthode de quantification de la biomasse de mildiou par PCR quantitative ..... 125

2.3.1 Sélection des amorces pour analyse en PCR en temps réel (qPCR) ..... 125

2.3.2	Quantification du développement de <i>P. viticola</i> par qPCR.....	127
2.3.3	Analyse visuelle de l'infection en microscopie.....	129
2.3.4	Quantification de la sporulation 7 jpi.....	131
2.3.5	Analyse comparative des méthodes de quantification de la biomasse de <i>P. viticola</i> .....	132
2.3.5.1	Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété Syrah (voir Planche 1, à la fin du chapitre).....	132
2.3.5.2	Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété Bianca (voir Planche 2, à la fin du chapitre).....	132
2.3.5.3	Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété <i>V. riparia</i> (voir Planche 3, à la fin du chapitre).....	133
2.3.5.4	Corrélations entre les analyses LC-MS et qPCR.....	133
2.3.6	Conclusions et perspectives .....	134

**Chapitre III : Analyse métabolomique de l'interaction entre la vigne et *Plasmopara viticola* en conditions compatible et incompatible..... 138**

<b>1.</b>	<b>Contexte et stratégie .....</b>	<b>140</b>
<b>2.</b>	<b>Analyses métabolomiques en LC-MS .....</b>	<b>141</b>
2.1	Analyse ciblée .....	142
2.2	Analyse non-ciblée.....	145
2.3	Conclusions et perspectives .....	149
<b>3.</b>	<b>Analyse du métabolisme primaire .....</b>	<b>150</b>
3.1	Stratégie .....	150
3.2	Evaluation du niveau d'infection.....	150
3.3	Analyse des données obtenues par RMN du proton .....	152
3.3.1	Analyse des effets « inoculation » et « temps de cinétique » sur les variations métaboliques globales .....	152
3.3.2	Variations du métabolome selon le temps de cinétique .....	153
3.3.3	Variations du métabolome selon l'isolat de <i>P. viticola</i> inoculé .....	154
3.4	Analyse par enzymologie à haut débit .....	155
3.5	Conclusion et perspectives.....	156

**Conclusion générale..... 158**

<b>1.</b>	<b>Identification de lipides spécifiques au mildiou .....</b>	<b>160</b>
<b>2.</b>	<b>Analyse de l'interaction de la vigne avec <i>P. viticola</i>, en situation compatible et incompatible .....</b>	<b>163</b>
2.1	Analyse qualitative de l'interaction.....	163
2.2	Quantification de la biomasse du mildiou au cours de l'infection .....	164

2.3 Analyse métabolomique de l'interaction de la vigne avec <i>P. viticola</i> , en situation compatible et incompatible.....	165
2.3.1 Perturbation du métabolisme primaire .....	165
2.3.2 Induction du métabolisme de défense .....	166
<b>Bibliographie.....</b>	<b>168</b>



# Contexte

---

La viticulture nécessite l'utilisation de quantités importantes de pesticides : elle consomme en effet à elle seule 20 % des pesticides répandus en France, alors que la viticulture n'occupe que 3 % de la surface agricole utile. Les pesticides utilisés sont des insecticides, des nématicides et surtout des fongicides qui représentent 80 % du total, pour neuf à dix-sept traitements annuels (Agreste Primeur, numéro 289, octobre 2012). La généralisation de la lutte chimique pour le contrôle des maladies fongiques de la vigne a des conséquences négatives sur le coût de production des vins, sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine. La réduction de l'usage des fongicides représente donc une priorité en viticulture et un enjeu socioéconomique majeur. Dans ce contexte, la création de cépages résistants aux principales maladies fongiques de la vigne constitue une alternative économiquement viable et respectueuse de l'environnement. L'UMR 1131 « Santé de la Vigne et Qualité du Vin » (SVQV) conduit un programme de création de nouveaux cépages produisant des vins de qualité et dotés de résistances durables au mildiou (*Plasmopara viticola*) et à l'oïdium (*Erysiphe necator*), grâce à l'exploitation de sources de résistance issues d'espèces de *Vitis* d'origines américaine et asiatique (Bellin *et al.*, 2009).

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein des équipes "Génétique et Amélioration de la Vigne" et "Métabolisme Secondaire de la Vigne". Avant de détailler le travail de recherche, nous avons choisi de présenter une synthèse bibliographique intitulée "Early events in plant-oomycete interactions ". Cette synthèse a été rédigée directement en anglais, car elle servira de base pour la rédaction d'un article de revue qui sera soumis prochainement pour publication.



*Revue bibliographique:*  
*Early events in plant-oomycete*  
*interactions*

---





# Revue bibliographique: Early events in plant-oomycete interactions

---

## Introduction

Oomycetes are a class of fungus-like eukaryotic microorganisms, with saprophytic or pathogenic lifestyles. Oomycetes include some devastating plant pathogens causing major damages to crops, ornamental plants and forestry. For examples, the genus *Phytophthora* includes *Phytophthora infestans*, the agent of late blight in solanaceous host plants, well know for causing the Irish famine in 1845 (Fry, 2008). *P. cinnamomi* is responsible for the decline of the Jarrah forests (Hardham, 2005) and *P. ramorum* has recently emerged as the cause of the sudden oak death epidemic (Grünwald *et al.*, 2012), which currently raises major concerns in both the USA and Europe. Oomycetes are phylogenetically related to brown algae and diatoms, although they resemble true fungi, with whom they have long been confused. Both of them show a vegetative filamentous form, and generally produce appressoria and haustoria as infection structures (Emmett and Parbery, 1975). However, oomycetes distinguish themselves from fungi by a number of biochemical and cytological characteristics, including composition of their cell wall (cellulose as a major polymer in oomycetes versus chitin for fungi), diploid hypha, mitochondria with tubular cristae and absence of sterol biosynthesis (Judelson and Blanco, 2005). As a consequence, oomycetes have long been studied in the shadow of fungal research. Control methods against oomycetes disease are therefore often not well adapted. For example, triazole fungicides, which interferes with sterol metabolism in true fungi, are inefficient against *Plasmopara viticola*, causing the downy mildew on grapevine (Martínez-Prada and Kortekamp, 2015).

Depending on their lifestyle, oomycetes species are differentiated by their feeding behavior. *Pythium* species are necrotrophic pathogens, which kill host tissues and feed on dead cells (Glazebrook, 2005). Conversely, downy mildews (including *Peronospora*, *Pseudoperonospora*, *Hyaloperonospora* and *Plasmopara* species) and white rusts (including *Albugo* species) are obligate biotrophic parasites. During their infection cycle, they must maintain a delicate balance between feeding on host cells and keeping the plant alive (Dodds *et al.*, 2009). *Phytophthora* species are hemibiotrophic pathogens. In early phases of their cycle,

they produce haustoria and adopt a biotrophic behavior. Then, they turn to a necrotrophic behavior and kill the host cells. The switch from biotrophic to necrotrophic behavior is still poorly understood (Lee and Rose, 2010). Plant pathogenic oomycetes also differ in their preferred host tissues. Downy mildews rather infect photoassimilate-producing tissues (or source tissue) such as young leaves, while some *Phytophthora* preferentially infects sink tissue like roots, flowers and mature leaves. However many *Phytophthora* species are able to infect both sink and source tissues (Kamoun *et al.*, 2014). Due to their biotrophic lifestyle, downy mildews exhibit narrow host specificities. Conversely, some *Phytophthora* can interact with hundreds of different host species. As a result, downy mildews show a drastic reduction in the size of their genome and seem to possess less pathogenicity-related genes than *Phytophthora* (Adhikari *et al.*, 2013).

Despite the differences in their lifestyles, hemibiotrophic and biotrophic oomycetes show some similarities in their cycle. During secondary infections, zoospores released from sporangia detect and adhere to host tissue, before turning into cysts and develop germ tubes. Depending on species, pathogenic oomycetes may enter host tissue by using natural means (intercellular space, stomata), by taking advantage of injuries or by forcing their way with appressoria. Within host tissues, oomycetes develop haustoria that will bring the nutrients necessary for mycelium growth. Finally, hyphae emerge from the plant tissue and give rise to sporophores. On the outside of the plant, mature sporophores bear sporangia, which will allow further spread of the disease. The asexual life cycle of oomycetes can therefore be split into three or four stages: pre-biotrophic phase (from zoospores attraction toward the host to cyst germination), the biotrophic phase (followed by the necrotrophic phase for hemibiotrophs) and the fruiting phase (sporophores formation).

The aim of this review is to provide an overview of biochemical interactions and exchanges between oomycete plant pathogens and their hosts, with an emphasis on the molecular cross talks in early phases of their cycle. As we will focus on molecular cross talks taking place during the biotrophic phase of the plant-oomycete interaction, this review mainly focuses on *Peronosporaceae* and *Phytophthora* species.

## 1. From the release of zoospores to germinating cysts

The asexual cycle of oomycetes begins when sporangia are detached from sporangiophores. Sporangia are then transported by wind or splashing water on a new host, allowing the spread of disease during secondary infections. Zoosporogenesis is the mechanism of sporangia maturation, finally resulting in the break of the apical papilla of sporangia and in zoospore release. Sporangia maturation and zoospore liberation are mainly influenced by environmental conditions, and cool, humid weather has been shown to promote both phenomena (Judelson and Blanco, 2005). However, the presence of molecules derived from the host plant may significantly accelerate the release of zoospores. Kiefer *et al.* (2002) studied the release of *Plasmopara viticola* zoospores in the presence of grapevine leaves. They have shown that the release started 40 minutes post leaf inoculation, almost all the sporangia being empty less than one hour later. The following stages of development, cyst and germ tube formation, occurred rapidly, while the amount of free zoospores decreased. Conversely, in distilled water (ie an host free system) zoospore release started slower and needed more than 4 hours (Riemann *et al.*, 2002). Few zoospores then evolve to the cyst stage. By comparing their results with those obtained by Riemann *et al.* (2002), Kiefer *et al.* (2002) concluded that the presence of grapevine leaves speeded up the release of *P. viticola* zoospores by one to two hours compared host-free medium, probably through host-derived promoting factors, which still need to be characterized.

The released zoospores are biflagellate motile cells, enabling them to target the host. Zoospores are much more fragile than the sporangia, because they lack a cell walls. They are only surrounded by a plasma membrane covered by a glycocalix, which is an extracellular carbohydrate layer rich in glucosyl and mannosyl residues (Hardham, 1985). As they do not have a cell wall, zoospores are very sensitive to the surrounding osmotic pressure. Nevertheless, they have a water expulsion vacuole surrounded by a reticulate spongiome (endoplasmic reticulum and vesicles), which actively pumps out water that diffuses into the cell, thereby maintaining cell integrity (Mitchell and Hardham, 1999). These motile cells move in a helical fashion and can swim for hours, thanks to endogenous lipids reserve (Carlile, 1983). During the swimming motion, the posterior flagellum acts like a rudder, while the anterior flagellum gives momentum to the movement (Morris and Gow, 1993) (Judelson and Blanco, 2005).

Due to their fragility and limited lifetime, it is crucial for zoospores to reach rapidly appropriate sites of invasion. Zoospores exhibit two main tactic responses that enable them to

reach infection site on roots or leaves. These behaviors are based either on sensory response to signal molecules from host tissues (chemotaxis), or to electric field (electrotaxis) (Tyler, 2002). This last type of taxis seems to be specific to root pathogens (Morris and Gow, 1993; van West *et al.*, 2002).

### ***1.1 Electrotaxis in root-zoospore interactions***

Plant roots produce electrical currents and a weak associated electrical field, as a result of ion conducting channels present in cell membranes (Behrens *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1991). The intensity and shape of the electrical field depends on soil properties, including acidity, salinity, as well as on the presence of plant roots (Miller and Gow, 1989; Gow, 1993). These currents impact the rhizosphere by creating voltage, ionic and pH gradients, which gradients have a crucial role in the growth of root (Rathore and Goldsworthy, 1985; Toko *et al.*, 1989). However, they are also perceived by oomycetes and may aid root infection by guiding them toward living tissues (Gow, 1993; Morris and Gow, 1993; van West *et al.*, 2002). Indeed, the relative charges of proteins and glycoproteins in the anterior and posterior flagella create an electrical dipole, which is responsible for the sensitivity of zoospores to electrical fields (electrotaxis). The electrostatic environment will therefore influence the swimming direction of zoospores, albeit in different ways. Indeed, zoospores of *Pythium aphanidermatum* are driven toward the cathode, while those of *Phytophthora palmivora* swim in direction of the anode (Morris and Gow, 1993). Therefore, these two pathogens accumulate preferentially in two distinct areas of rye grass roots. The zoospores of *P. aphanidermatum* are attracted towards the base of root hairs, and those of *P. palmivora* toward the apical root zones (Morris and Gow, 1993). However, this specificity is neither common to a particular genus nor in relation to the targeted host parts. Like *P. palmivora*, zoospores of *Phytophthora parasitica* v. *nicotianae* are attracted by negative pole (Troutman and Wills, 1964), conversely, zoospores of *Phytophthora capsici* swim to the cathode (Katsura *et al.*, 1966). Electrotaxis has been proposed to be the result of two processes: orientation of zoospores in the fields according to their electrical dipole (electro-topotaxis) and voltage-dependent stimulation of the re-orientation movement frequency (electro-klinokinesis) (Morris and Gow, 1993).

In addition to the effect of electric fields induced by plant roots, zoospore mobility is also directly influenced by cations present in medium. For example,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$  and  $Ca^{2+}$  act as repellents for zoospores of *P. cinnamomi* and *P. palmivora* (Bimpong and Clerk, 1970; Allen and Harvey, 1974; Appiah *et al.*, 2005). In addition, *P. cinnamomi* shows a chemo-

repulsion to  $\text{NH}_4^+$ . Gisi (1983) suggested that this charge-repulsion phenomenon could facilitate the dispersal of zoospores, therefore preventing their aggregation. In addition, the pH of the medium affects both the mobility and the viability zoospores (Weste, 1983). Optimal pH for the motility of *P. palmivora* zoospores is between pH5 and pH9. Below pH5, zoospores are immobilized and they can no longer evolve into cysts after being exposed to pH4, even if they return in a more alkaline medium (Halsall and Forrester, 1977). Optimum pH conditions for zoospores are highly variable among *Phytophthora* species. Depending on *Phytophthora* species, three optimal pH values were determined for zoospore survival: pH7 suits *P. citrophthora*, *P. insolita*, *P. irrigata*, *P. megasperma* and *P. nicotiana*.; pH5 is adequate for *P. tropicalis* and pH9 is preferred by *P. citricola* (Kong *et al.*, 2009). These results may be considered to assess the dissemination risk of individual *Phytophthora* species through irrigation water and may lead to novel water treatment technologies lowering waterborne microbial contamination.

## **1.2 Chemotaxis influences zoospore swimming direction**

### **1.2.1 Chemotaxis of zoospores for root exudates**

Plant root exudates contain simple carbon compounds, including primary metabolites, such as sugars, amino acids, and organic acids, in addition to a wide array of secondary metabolites that are released into the rhizosphere and the surrounding soil. Root exudates are known to impact soil fungal communities (Broeckling *et al.*, 2008) and some of their components may be exploited as signal molecules by soil borne pathogens (Cameron and Carlile, 1978) (Cahill and Hardham, 1994a; Cahill and Hardham, 1994b). Free alcohols and amino-acids together in the medium are good indicators of the presence of the roots in waterlogged condition and indeed, such organic compounds can impact the swimming behavior of the zoospores (Cameron and Carlile, 1978; Carlile, 1983). The study of chemotaxis for amino acids of zoospores of *Phytophthora* species concluded that amino acids with a short C-chain ending with an amide group, like arginine, glutamate, aspartate, are the best zoospore attractors (Khew and Zentmyer, 1973). Methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol and acetaldehyde were identified as chemoattractants of zoospores of *P. cinnamomi* (Allen and Newhook, 1973), whereas only acetaldehyde and ethanol seem to attract zoospores of *P. palmivora* (Cameron and Carlile, 1978).

Chemotactism for secondary metabolites has been extensively studied using the soybean / *Phytophthora sojae* pathosystem. The zoospores of *P. sojae* have been shown to be highly

attracted to the isoflavones genistein and daidzein, which are exuded by the roots of that plant (Morris and Ward, 1992). *P. sojae* has been divided into four race types (genotypes I to 4), which present a genetic variability among themselves not exceeding 8% (Förster *et al.*, 1994). Tyler *et al.* (1996) examined the response of *P. sojae* zoospores to a wide range of compounds having structural similarity to genistein and daidzein, including isoflavones, flavones, chalcones, stilbenes, benzoic acid derivatives and coumarins. Three *P. sojae* isolates: P6497 (genotype I), P7076 (genotype III), P7063 (genotype IV) were selected for this study. Unexpectedly, the behaviors of *P. sojae* genotypes were very dissimilar. P7063 was generally more sensitive than P6497, showing significant attraction to 10-fold-lower concentrations of most compounds. For example, daidzein was attractive from 10 nM for P6497, and only 2 mM for P7063 and P7076. Some compounds exhibited contrasted properties, attracting the zoospores of one *P. sojae* genotype, while repelling those of another genotype. From these data, the authors concluded that strong attractants were generally isoflavone molecules with phenolic group in position 4' and 7'. In contrast, O-methylation of 4' position reduced attraction by a factor 15 to 40, while methylation on both 4' and 7' reduced attraction by a factor 4000 (Tyler *et al.*, 1996).

Some secondary metabolites have been shown to specifically attract zoospores of pathogenic oomycetes. For example, the attractant properties of daidzein have been described as specific for the interaction of *P. sojae* with soybean (Morris and Ward, 1992). Another interesting example is cochliophilin A (5-hydroxy-6,7-methylenedioxyflavone), which specifically attracts the zoospores of the necrotrophic pathogen *Aphanomyces cochlioides* to its host *Spinacia oleracea* (Horio *et al.*, 1992; Takayama *et al.*, 1998). On the other hand, many ubiquitous molecules possess attractant properties *in vitro*, without specificity for a particular host-pathogen interaction. (Cameron and Carlile, 1978) reported the action of valeraldehyde, isovaleraldehyde, and isovaleric acid in attracting zoospores of *P. palmivora*. Zoospores of *P. cinnamomi* are strongly attracted by isovaleraldehyde as well. To a lesser extent, a wide range of molecules exhibits attractant effects on *P. cinnamomi*, including phenolic compounds (caffeic acid, ferrulic acid, gentisic acid, syringic acid) and organic acids (isovaleric acid, L-ascorbic acid) (Cahill and Hardham, 1994a).

### 1.2.2 Chemotaxis in leaf-zoospore interactions

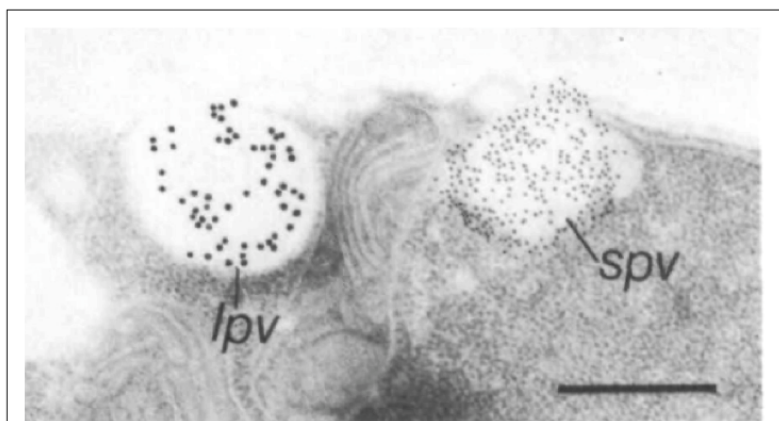
Many oomycetes responsible for leaf disease infect their host through stomata, although some of them can penetrate through appressoria or take advantage of wounds to infect leaf tissues (Galiana *et al.*, 2005; Declercq *et al.*, 2011). Several lines of evidence indicate that

zoospores may use chemical cues to localize stomata, although zoospore chemotaxis is less documented in the case of leaf pathogens than in the case of root pathogens. To demonstrate the influence of molecules secreted by stomata, Kiefer *et al.* (2002) studied the effect of abscisic acid (ABA) on the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. ABA treatment causes stomatal closure, thus preventing the potential secretion of molecules from this structure. The addition of 100 $\mu$ M ABA in a suspension of *P. viticola* zoospores causes a 40% reduction in their aggregation around stomata. This tends to indicate that chemicals secreted by stomata may play a significant role in zoospores attraction. Currently, plant factors, which may guide zoospores towards stomata are still unknown.

## 2. The encystment process

When zoospores reach their site of infection, they adhere to a surface, differentiate into walled cysts and subsequently germinate. These steps are connected and take place in a short time frame. Encystment is a complex process leading to major modifications of the pathogen cells: zoospores successively lose their flagella, swell, secrete adhesion molecules and build a cell wall (Hardham, 2007). Encystment relies on a massive exocytosis process involving different kinds of vesicles. These vesicles are likely to be responsible for the secretion of materials specific for different phases of the encystment process.

Gubler and Hardham (1988) used an immunolocalization strategy to visualize the exocytosis process during encystment of *P. cinnamomi* zoospores. Immunogold labeling was performed on the one hand, with antibodies directed to the adhesive material of zoospores, and, on the other hand, with antibodies directed to molecules contained in wide peripheral



**Fig. 1:** Immunogold characterization of specific vesicles in zoospores of *Phytophthora cinnamomi*. Small (spv) and large peripheral vesicles (lpv) show heavy labeling with 10 and 18nm gold particles, respectively. Bar: 0.5  $\mu$ m. Adapted from Gubler and Hardham (1988).

vesicles (Fig. 1). They showed that the adhesive material was stored in a population of small



peripheral vesicles, which underwent rapid exocytosis in the first minutes of encystment. Conversely, wide peripheral vesicles predominantly present at the dorsal surface of the encysted zoospores migrated towards the center of the cell. Wide peripheral vesicles were proposed to contain encystment material. After adhesion, this material forms a protective coat resembling mucilage, which covers the cyst and adjacent areas of the host (Hardham, 2005; Hardham, 2007).

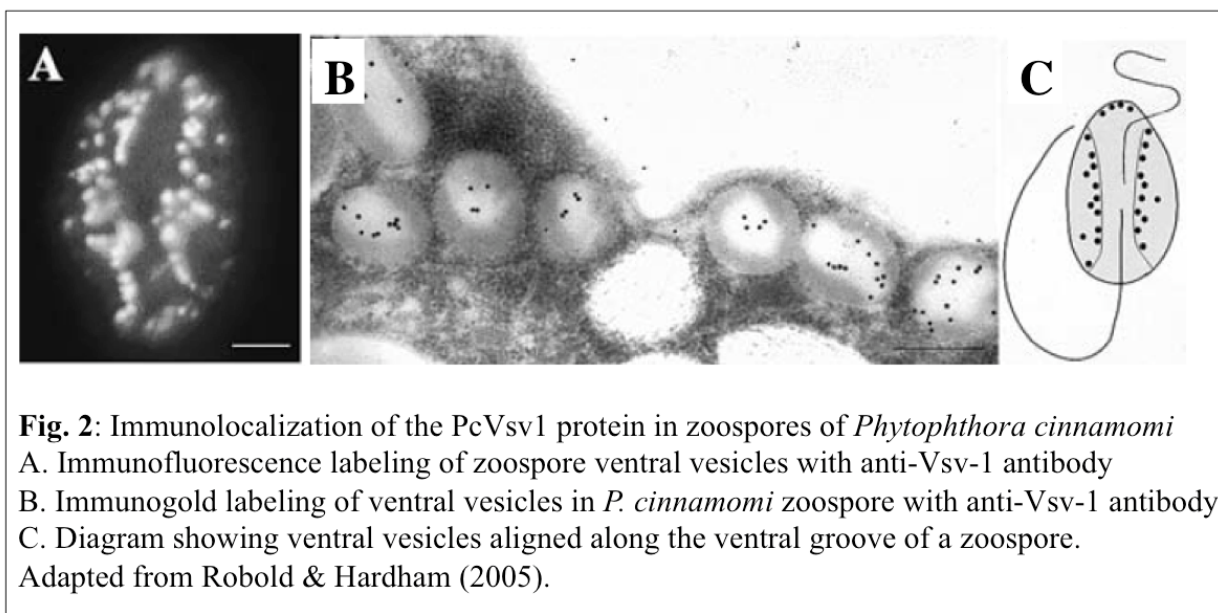
## ***2.1 Protein interactions involved in adhesion***

Successful infection requires efficient binding of zoospores to host tissues. This fast event takes place during the very early stage of encystment, before the formation of the cyst cell wall. Mature cysts lose their ability to bind surfaces within 5 minutes after the induction of the encystment process (Sing and Bartnicki-Garcia, 1975a; Sing and Bartnicki-Garcia, 1975b). Despite the major role of adhesion in disease establishment, the underlying molecular mechanisms are still not fully understood.

Early studies of adhesion mechanisms have led to controversial results. Some of them showed that zoospores may adhere to a variety of surfaces, both biological and non-biological, supporting the view that adhesiveness is not specific (Sing and Bartnicki-Garcia, 1975a). Conversely, other results indicated specific adhesion mechanisms, involving lectins of the pathogen and fucosyl terminal residues of the host surface (Longman and Callow, 1987; Gubler and Hardham, 1988). Indeed, oxidation with periodic acid or the addition of fucose or  $\alpha$ -L-fucosidase decreased the number of cysts attached to the host surface, reinforcing the idea of a specific binding. In addition, Gubler and Hardham (1988) showed that zoospore anchoring required the presence of calcium, although its action on the adhesion process remained obscure. The presence of EGTA in the suspension medium inhibited cell attachment, whereas the addition of calcium increased the number of adhesive cysts. Even if the specificity of the adhesion between zoospores and host tissues is still controversial, the strength of this interaction is very high. The adhesion resists physical (strong water currents, boiling water) and chemical treatments (organic solvents, detergents) and only very harsh conditions such as the addition of 1M KOH may cause cyst fall (Gubler and Hardham, 1988).

High molecular weight glycoproteins stored in zoospores vesicles are secreted in the early cyst stage and therefore appear to be promising adhesion effectors (Gubler and Hardham, 1988; Gubler *et al.*, 1989). The work of Sing and Bartnicki-Garcia (1975b) about *P. palmivora* encysted zoospores highlighted some characteristics of adhesive molecules of oomycetes. They

showed that *P. palmivora* bound concanavalin A, a glycoprotein of the lectin family, which specifically binds to D-mannose and D-glucose. After staining with uranyl acetate and lead citrate, adhesive molecules of *P. palmivora* appeared as heavy irregular deposit of dense material by electron microscopy. These structures disappeared on the cell surface after treatment with trypsin protease, suggesting that adhesion molecules may be glycoproteins. More recently, the PcVsv1 protein was characterized from *Phytophthora cinnamomi*, as potentially involved in adhesion (Robold and Hardham, 2005). Homologues of PcVsv1 occur in *P. sojae*, *P. infestans* and *P. ramorum*. Immunolocalization experiments showed that this protein was localized in small peripheral vesicles associated with the secretion of adhesive material in zoospores (Fig. 2).



PcVsv1 harbors multiple thrombospondin type 1 repeats (TSR1) domains, which are found in a large number of adhesive extracellular matrix proteins in animals. TSR1 domains were shown to be involved in attachment, aggregation and cell guidance in animal cells and malarial parasites (Tucker, 2004; Doud *et al.*, 2012).

## 2.2 Molecular stimuli of encystment

*In vitro*, encystment of zoospores can be induced by a number of physical and chemical stimuli including agitation, heat shock, and addition of polyuronate, calcium or phosphatidic acid in the inoculum (Grant *et al.*, 1985; Grant *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 1991). The impact of calcium on zoospores has been extensively studied and will be described in the next paragraph.

Other cations activate the transformation of zoospores to cyst.  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Na^+$  and  $Li^+$  are good activators for *P. cinnamomi* encystment. It is interesting to observe that these cations have already been identified as a chemo-attractant of *P. cinnamomi* zoospores, however higher concentrations of these molecules are required to promote encystment.

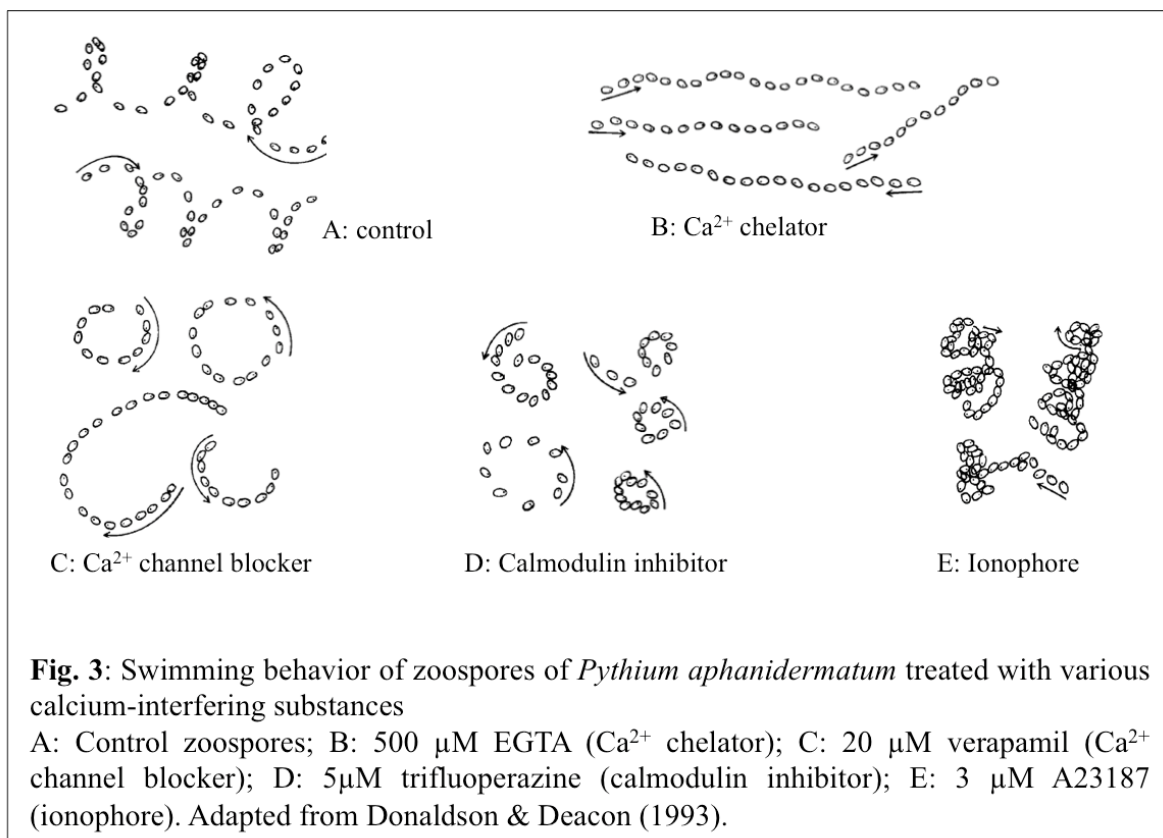
The effectiveness of some molecules as chemo-attractants of zoospores in plants-oomycetes interactions prompted plant pathologists to investigate whether the same compounds may stimulate encystment, albeit at higher concentrations. This assumption was confirmed in the case of soybean isoflavones genistein and daidzein, which induce encystment and germination of the zoospores of *P. sojae*, in addition to their attractant properties (Connolly *et al.*, 1999). About thirty molecules were identified as chemoattractant of *P. cinnamomi* during the development of a dipstick immunoassay designed to specifically detect this pathogen (Cahill and Hardham, 1994b). A dozen of these molecules, including aspartic acid, glutamic acid, caffeic acid, gentisic acid, and certain phytohormones (for example abscisic acid and indolbutyric acid) promote the encystment of zoospores (Tyler, 2002). By contrast, volatile alcohols and aldehydes identified as attractants of *P. palmivora*, did not induce encystment, even at high concentrations (Byrt *et al.*, 1982).

Encystment of zoospores generally appears to be a non-specific process, since a simple agitation of zoospores can cause cyst formation. In addition, no promoting molecule of the host could be identified. In the case of *Pithium* and *Phytophthora* species, the success of the encystment and infection process has been proposed to depend mainly on the intrinsic properties of each species (Raftoyannis and Dick, 2006). Each plant would have some disposition to induce encystment, and the exploitation of this capacity would depend on the encystment or infection potential of each pathogen species. For different *Phytophthora* species (*P. deliense*, *P. aphanidermatum* and *P. nicotianae*) the highest encystment levels occurred on lucerne, tomato and sugar beet. Encystment was also found to be more effective on dicotyledonous plants than on monocotyledonous. However, there was no relationship between the degree of encystment and degrees of pathogenicity (Raftoyannis and Dick, 2006).

## 2.3 $Ca^{2+}$ is an important second messenger in early phases of infection

### 2.3.1 Role of $Ca^{2+}$ in zoospore release and swimming

$Ca^{2+}$  plays major roles in the early phases of oomycete infection, as this cation has been shown to impact the release, swimming, encystment and germination processes of zoospores. For example, increasing cytoplasmic calcium concentration can induce sporangia cleavage and release of free zoospores (Jackson and Hardham, 1996).



The regulation of swimming pattern is strongly influenced by calcium, which regulates the behavior of flagella or cilia in other eukaryotic cells (Bloodgood, 1991). Griffith *et al.* (1988) showed that at least 0.2  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  is required to maintain the normal swimming pattern of zoospores. EGTA chelation of external  $Ca^{2+}$  results in perpetual straight swimming and sometimes induces cell lysis (Fig. 3B). In addition, inhibitors targeting calcium transport in cells or calcium-dependent proteins strongly affect the swimming pattern. Zoospores swim in circles when treated with substances that block calcium channels in cell membranes (Fig. 3C). Their swimming behavior is also affected by calmodulin inhibitors (Fig. 3D), as well as by

ionophore, which equilibrates the calcium concentrations across the cell membrane (Fig. 3E) (Donaldson and Deacon, 1993).

### 2.3.2 Role of $Ca^{2+}$ in the encystment process

Encystment is particularly sensitive to the concentration of  $Ca^{2+}$  in the suspension medium, and *P. palmivora* cyst formation requires at least 100 nM  $Ca^{2+}$  (Griffith *et al.*, 1988). According to (Byrt *et al.*, 1982),  $Ca^{2+}$  is the only cation that induces encystment and germination of *P. cinnamomi* zoospores. Addition of more than 1 mM  $Ca^{2+}$  promotes both the encystment of zoospores and the subsequent cyst germination (Broembsen and Deacon, 1997; Deacon and Saxena, 1998; Walker and van West, 2007). Further evidence of the importance of  $Ca^{2+}$  in the differentiation and infection fate is its impact in cyst evolution. In some oomycete species, cysts can evolve in germinated cyst, or produce a second motile zoospore. High  $Ca^{2+}$  concentrations promote zoospore germination and, conversely, low  $Ca^{2+}$  concentrations induce the production of a second zoospore (Broembsen and Deacon, 1996; Deacon and Saxena, 1998). Finally,  $Ca^{2+}$  may act in synergy with other compounds, the rate of *P. sojae* zoospore germination being higher in presence of soybean isoflavones plus 10 mM  $Ca^{2+}$  than with  $Ca^{2+}$  or isoflavones alone (Connolly *et al.*, 1999).

### 2.3.3 Mechanisms of $Ca^{2+}$ action

Protein kinases play important roles in the regulation of cell metabolism. They act in all cellular compartments, thereby targeting transcription factors, metabolic enzymes, cytoskeletal components or ion channels. Looking for an integrated protein kinase signaling pathways in zoospores led to the discovery of a gene expressed during zoosporogenesis of *P. infestans*. This gene encodes a protein termed PibKZ1, similar to  $Ca^{2+}$  and calmodulin-regulated protein kinases (CaMK) (Judelson and Roberts, 2002). Yeast two-hybrid assay showed that the kinase PibKZ1 interacted with a Bzip transcription factor termed Bibzp1 (Blanco and Judelson, 2005). Bibzp1 was shown to be essential to infectious fitness, since it played a major role in zoospore swimming and in the formation of haustoria after germination. Zoospores silenced for PibKZ1 protein swam in tight circles, instead of showing the usual movement of straight swim punctuated by turns. Then, while zoospore encystment was unaffected, cyst germination was more efficient, but germinated cysts did not develop haustoria. Therefore, Pibzp1-silenced strains lost their ability to penetrate tomato leaf tissues, resulting in a strongly reduced pathogenicity. However, Pibzp1-silenced strains could still infect wounded leaves, indicating

that silencing did not affect the ability of the strains to grow *in planta* once the host epidermis had been breached (Blanco and Judelson, 2005).

Labeling studies with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  have demonstrated that the encystment process was associated with an influx of  $\text{Ca}^{2+}$  in cells, followed by a sustained efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  prior to spore germination (Irving *et al.*, 1984; Warburton and Deacon, 1998). In addition, host plant factors such as soybean isoflavones have been shown to induce  $\text{Ca}^{2+}$  influx into encysted *P. sojae* zoospores (Connolly *et al.*, 1999). These authors proposed two hypotheses to explain the mechanisms involved in increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the presence of plant factors. First, plant factors could bind  $\text{Ca}^{2+}$ -gated channel proteins, causing a direct influx of  $\text{Ca}^{2+}$ . Alternatively, the binding of plant factors to chemoreceptors could activate G protein pathways resulting in the activation of phospholipase C and guanylate cyclase. The resulting increase in inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) may then act to open IP3-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  channels on the vacuolar reticulum or on the plasma membrane.

#### 2.4 Sensing pathways in oomycetes

Heterotrimeric G proteins are known to transduce extracellular signals to intracellular effectors. External signals are received by the seven-transmembrane (7-TM) receptors. Then, the cytoplasmic domain of the receptor recruits a heterotrimeric G protein made of the  $\text{G}\alpha$ ,  $\text{G}\beta$  and  $\text{G}\gamma$  subunits. The GDP links to the  $\text{G}\alpha$  subunit is then exchanged with a GTP, resulting in the dissociation and activation of the  $\text{G}\alpha$  and the  $\text{G}\beta\gamma$  subunits.  $\text{G}\alpha$ -GTP activates many effectors, such as ion channels, adenylyl cyclase and phospholipase C.  $\text{G}\beta\gamma$  effectors are implicated in MAPK pathways as well as in the stimulation of phosphoinositide 3-kinase, phospholipases C and A2 (Gilchrist, 1996). In fungal plant pathogens, G proteins are implicated in many developmental processes like asexual sporulation, spore germination, pigmentation and haustoria formation (Lengeler *et al.*, 2000). A putative G protein-coupled receptor named GPR11 has been identified in *P. sojae* (Wang *et al.*, 2010). In mutant strains silenced for GPR11, hypha growth and morphology, or sporangia production exhibited no differences with *P. sojae* wild type. However, in the mutant, 50% of the sporangia did not release their zoospores, encystment and germination being also impaired. According to Latijnhouwers *et al.* (2002), differentiation of *P. infestans* zoospores is triggered by both phosphatidic acid and G protein activator mastoparan, and increase in phosphatidic acid during this step is induced by activation of phospholipase D activity. The  $\text{G}\alpha$  subunit gene *Pigpa1* is highly expressed in sporangia and zoospores of *P. infestans* (María Laxalt *et al.*, 2002). In mutants lacking this  $\text{G}\alpha$

subunit, zoospores release is reduced by 35% compared to the wild type, the proportion of aberrant zoospores being higher. Pigba1-silenced zoospores show abnormal motility, changing direction six to eight times more frequently and swimming only short distances. Pigba1-silenced zoospores are insensitive to chemotaxis signals, however, it is not clear whether they are no longer able to feel signal molecules or if they are unable to master their swim direction. In Pigba1-silenced mutants, the number of haustoria is reduced and many of them are deformed (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

## 2.5 Conclusion

The crucial role of calcium in early stages of oomycete infection may be exploited for the development of original control strategies. Soil treatment with  $\text{CaCl}_2/\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  reduces the severity of disease linked *P. sojae* (Sugimoto *et al.*, 2008), however, this treatment is currently not widely used. Cinnamaldehyde (CA), a major constituent of cinnamon essential oils, has recently been developed as food antimicrobial agent due to its activity against bacteria, yeast, and filamentous molds. CA has been proposed to target ergosterol biosynthesis in fungi (Shreaz *et al.*, 2011). However, ergosterol biosynthesis is unlikely to be a target in oomycetes, as they do not synthesize this sterol (Gaulin *et al.*, 2010). Instead, CA may impact oomycete growth by disrupting  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Hu *et al.*, 2013). CA has been shown to cause rapid  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from the zoospores of *Phytophthora capsici*, thus resulting in cell death. CA may target a plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) involved in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in *P. capsici* (Hu *et al.*, 2013).

The early stages of plants infection by oomycetes are still not fully understood, and little evidence of specific interactions has been identified. It is possible that the majority of oomycetes perceive non-specific signals indicating the presence of plants, without distinguishing their identity. This idea is supported by the wide host range of most *Phytophthora* species. However, if these pathogens are able to initiate an infection on a large number of plants, some of them are not colonized (non-host interaction) (Kamoun *et al.*, 1999; Vleeshouwers *et al.*, 2000). The behavior of *P. sojae* is unusual among the *Phytophthora* pathogens since it presents a narrow host range. It is also one of the few oomycetes, for which specific chemo-attractant factors produced by the host have been identified (Morris and Ward, 1992). Histological study of the interaction of *P. viticola* with a range of host (*V. vinifera*, *V. riparia* and *Muscadinia rotundifolia*) and non-host plants (*Beta vulgaris*, *Lactuca sativa*, and *Capsicum annuum*) have shown that during pre-biotrophic phase of infection, pathogen growth



was similar on all plants. The first signs of disturbance in the normal evolution of the infection occurred after the formation of the first haustoria on non-host plant. These observations illustrate that the contact between the pathogen feeding organs and plant cell walls is not only a key stage for the establishment of biotrophy but also for the host specificity (Diez-Navajas *et al.*, 2008).

### **3. The biotrophic phase**

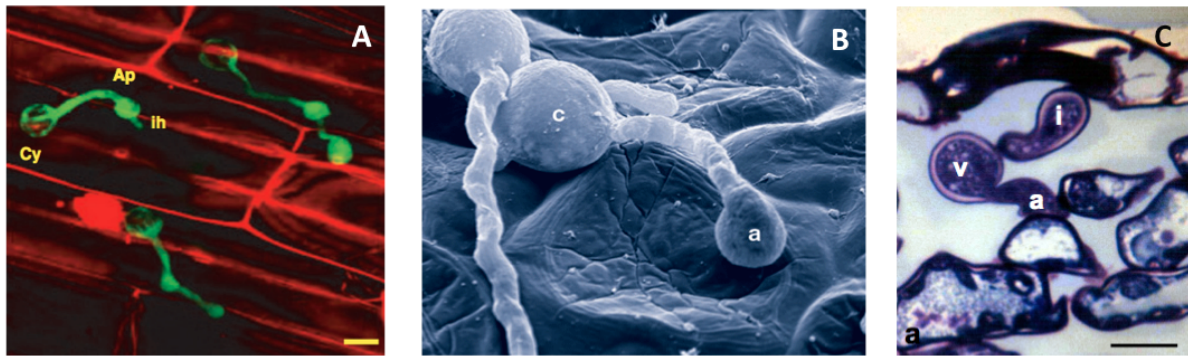
Few hours after zoospore adhesion, a germ tube emerges from each cyst and grows on the host surface. Depending on species, the germ tube may enter host tissue by using natural means, by taking advantage of injuries or by penetrating the host cell wall with an appressorium. For example, the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* often enters leaf or root tissues through appressoria, although it may use injuries frequently present around root hairs or, on rare occasions, stomata (Gascuel *et al.*, 2015). In appropriate conditions, the germ tube swells to form an appressorium before penetrating into plant tissue (Kebdani *et al.*, 2010). Appressoria are specific structures, separated from germ tubes by a septum. They have an essential role in the pathogen adhesion and infection, and are the structures where the first metabolic exchanges between the host plant and the pathogen take place. In compatible interactions, the germ tube spreads then in the plant tissues and progressively forms a dense mycelium. The first haustoria appear shortly after pathogen entry. These new points of contact between plant cells and the oomycete pathogen have the primary role of nutrient uptake, allowing further growth. Appressoria and haustoria are the main places for exchanges and communication between the pathogen and the host. They are directly involved in the secretion of pathogen virulence factors and, in some cases, in the activation of plant defense systems (Fawke *et al.*, 2015).

#### **3.1 The infection structures**

##### **3.1.1 Appressoria, adhesion and penetration structures**

Appressoria or appressorium-like structures have been widely described in *Phytophthora* and *Pytium* species (Kebdani *et al.*, 2010). Although *Peronosporaceae* species predominantly initiate infection through leaf stomata, appressoria have also been observed on some occasions (Fig. 4) (Kortekamp, 2005; Fawke *et al.*, 2015).





**Fig. 4:** Microscopic observations of appressoria structures during oomycete infections

**A:** Tomato root infected by *Phytophthora parasitica* observed with a confocal laser scanning microscope after propidium iodide staining. *P. parasitica* expresses Green fluorescent protein (GFP) and appears in green. Cy, cyst; Ap, appressorium; ih, infection hyph (Kebdani et al., 2009).

**B:** Mature appressorium of *Phytophthora infestans* developing from a germinated cyst (c) on the surface of tomato leaflet (Judelson et al., 2005).

**C:** Semi-thin sections of a grapevine leaf infected by *Plasmopara viticola*. The sample is stained with toluidine blue. The cytoplasm appear blue whereas cell walls or reddish. i = infection hypha, v = vesicle, a = appressorium-like structure (Kortekamp, 2005).

Unlike for the encystment and germination processes, adhesion of the zoospore in a solid surface is necessary to allow the induction of an appressorium (Bircher and Hohl, 1997). The germ tube of *P. palmivora* can grow for several hours and then form an appressorium as soon as conditions are favorable. Induction of appressorium formation is influenced by three signals: a topographic signal, substrate hydrophobicity and nutrient status of the surrounding medium (Bircher and Hohl, 1997). An irregular substrate is perceived as a favorable topographic signal and causes appressorium formation. *In vivo*, this type of surface may correspond to the edges of the guard cells of stomata, or groove over anticlinal walls, in other words, places facilitating penetration into the host. On a smooth substrate, appressorium induction is stimulated only if the structure is hydrophobic (e.g., the cuticle of a leaf) and if nutrient availability is low. Two independent signaling pathways were therefore hypothesized to be involved in appressorium formation. The first signaling pathway would be activated after attachment on a topographically favorable surface. Activation of the second one would depend on the perception of a hydrophobic surface and in low nutrient conditions (Bircher and Hohl, 1997).

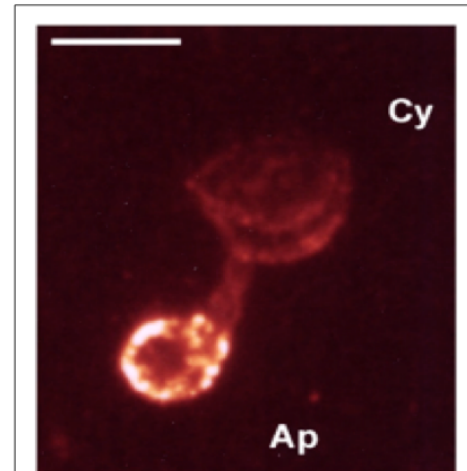
Appressoria have two important roles in oomycete infection cycle. First, they enhance the adhesion of the germinated cyst. Appressoria secrete adhesive components, which form an extracellular matrix (ECM) and provide a powerful contact between the host and the pathogen (Gubler et al., 1989; Carzaniga et al., 2001). Using different cytochemical probes allowed the

visualization of two distinct types of ECM materials on appressoria of *P. parasitica* (Carzaniga *et al.*, 2001). The first one, was localized at the interface between the appressorium and the adhesion surface and contains  $\beta$ -1,3-glucans, mannose, N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine. The second type of ECM, which extended beyond this area, was constituted by proteins, galactose and N-acetylglucosamine. Car proteins, which are mucins-like proteins also found in mammals, were identified in the ECM surrounding the appressoria of *Phytophthora infestans* (Fig. 5) (Görnhardt *et al.*, 2000). Car genes are only activated between the cyst germination phase and completion of appressoria formation. These proteins form a mucus coat, protecting the germinated cyst from desiccation, physical damage, and may also participate in adhesion to the host (Görnhardt *et al.*, 2000). Elicitin-like proteins and CBEL-like proteins (cellulose-binding, elicitor, and lectin activity) were identified in appressorium membrane (Meijer *et al.*, 2006; Grenville-Briggs *et al.*, 2010). They binds cellulosic substrates and are thought to be involved in adherence to host surfaces (Gaulin *et al.*, 2002; Gaulin *et al.*, 2006).

The second role of appressoria is to allow the penetration of oomycete pathogens into host tissues, and they are essential for host invasion by root pathogens (Tucker and Talbot, 2001; Grenville-Briggs and van West, 2005). Indeed, the appressorium provides a focal point for the concentration of resources to breach the host plant cuticle using mechanical pressure to force its way physically. In addition, appressoria may secrete hydrolytic enzymes to facilitate the invasion by degrading the cell wall components, such as pectin, cellulose and xyloglucan. For example, cell wall transglutaminases, annexins, mucins, and glycosyl hydrolases have been reported among *Phytophthora* species. Glycosyl hydrolases such as (1-3)-beta-glucanases are present in the cell wall throughout the life cycle of oomycetes and thus may play a role in the remodeling of their own cell wall

(Brunner *et al.*, 2002b; Meijer *et al.*, 2006; Grenville-Briggs *et al.*, 2010). They may also be involved in the degradation of host cell glucans during the development of the appressoria and haustoria. Transglutaminases may have structural function in the cell wall of appressoria. They

(Brunner *et al.*, 2002b; Meijer *et al.*, 2006; Grenville-Briggs *et al.*, 2010). They may also be involved in the degradation of host cell glucans during the development of the appressoria and haustoria. Transglutaminases may have structural function in the cell wall of appressoria. They



**Fig. 5:** immunolocalization of Car proteins of *Phytophthora infestans*

Germinated cyst of *P. infestans* was incubated with antibodies raised against Car proteins. An overlay of serial confocal optical sections through the germinated cyst is shown. Ap: appressorium, C: cyst, white bar: 10 $\mu$ m. (Görnhardt *et al.*, 2000 )

covalently link free amino acids to peptide-bound glutamine and they induce the polymerization of cell wall proteins to organize the oomycete cellular architecture (Brunner *et al.*, 2002a; Reiss *et al.*, 2011).

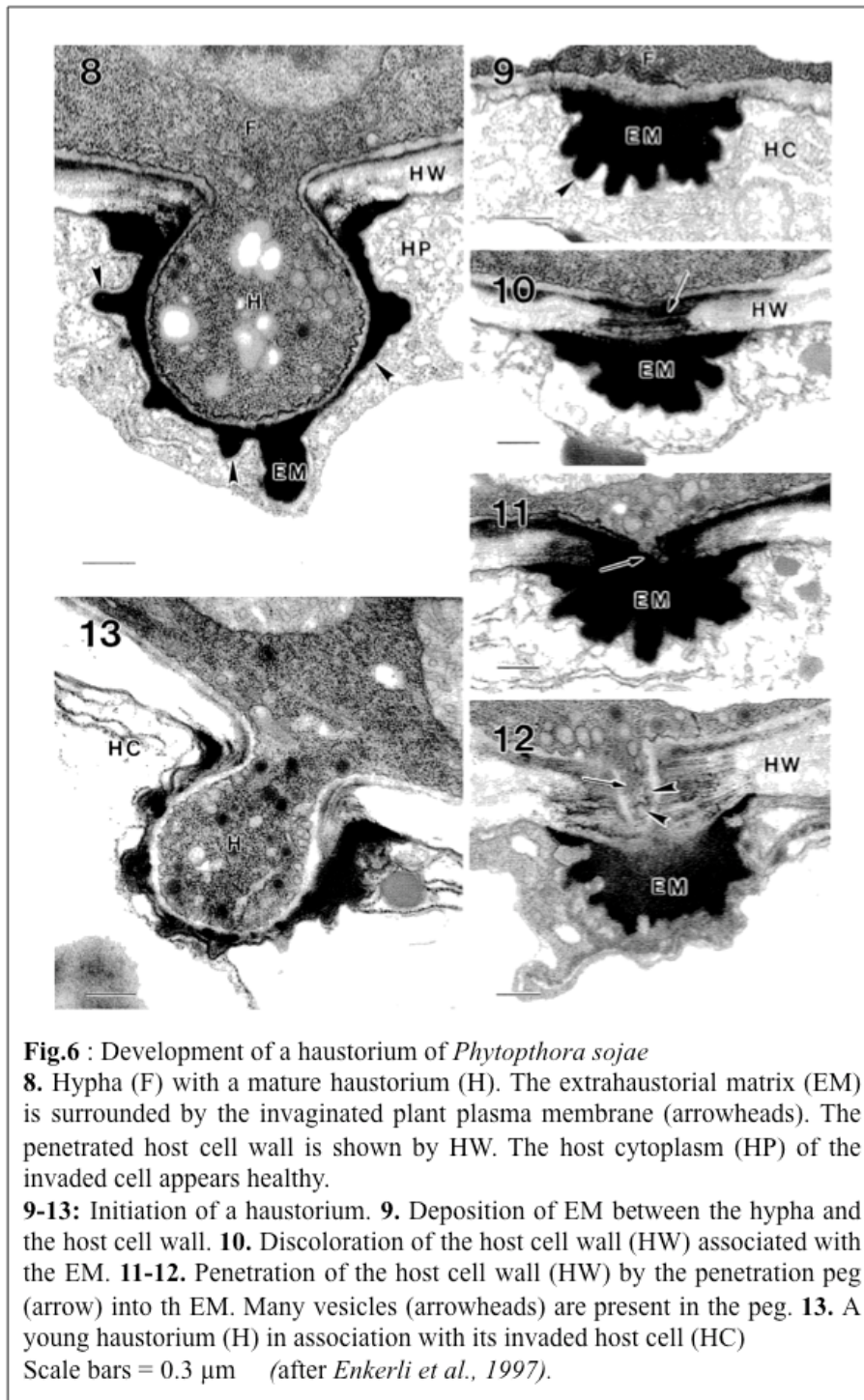
Following penetration into the host tissues, oomycetes generate vegetative hyphae that grow between host cells. During the biotrophic phase of the interaction, the pathogens need living cells to ensure nutrient intake and growth. In this case, hyphal contact with a suitable cell triggers side branches, which penetrate the host plant's cell wall. These structures called haustoria provide intimate contact with the host, allowing the pathogen to draw nutrients from the space between the cell wall and plasma membrane without penetrating the plant cell itself (Fawke *et al.*, 2015). Foliar pathogens develop haustoria toward mesophyll cells, whereas root pathogens form haustoria targeting cortical cells.

### *3.1.2 The haustorium, an intimate contact between host and pathogen*

During biotrophic interactions, oomycetes adjust a delicate balance between the appropriation of the resources necessary for their development while keeping the plant alive and the control of the plant defenses. This balance is ensured by haustoria, which therefore perform two main tasks: supply nutrient to the pathogen and fight plant defenses. Haustoria are also major sites of the transfer of effectors that neutralize defense systems. These effectors possess a specific RXLR motif, which acts as translocation signal for delivery of the effector proteins into host plant cells (Whisson *et al.*, 2007). The diversity, secretion and functions of oomycete effectors will not be described in details here, as these subjects have been extensively reviewed in recent years (Stassen and van den Ackerveken, 2011; Bozkurt *et al.*, 2012; Wawra *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2015; Fawke *et al.*, 2015). It is widely accepted that the main role of effectors is to suppress host defenses, but they are also likely to have other roles in remodeling cellular processes such as host metabolism, that could provide nutrients for pathogen growth. Bacterial and fungal pathogens manipulate host sugar transport by activating SWEET transporter genes during infection (Stassen and van den Ackerveken, 2011). In rice, a bacterial effector has been shown to binds to the OsSWEET11 promoter to activate the sugar transporter gene (Chen *et al.*, 2010). However, little is currently known about the impact of effectors on host metabolism, and about the haustorium-specific nutrient transportation processes in oomycetes.

The degree of compatibility of the interaction influences frequency and timing of the formation of haustoria, as well as their final size. Perfectly compatible interaction leads to the formation of a large number of well-developed haustoria. However, the comparison of the interactions between *P. viticola* and *V. vinifera* cv. *Müller-Thurgau* (compatible) or *V. rupestris* (incompatible) showed that the formation of haustoria was very much slowed down during incompatible interaction, albeit not totally inhibited (Unger *et al.*, 2007).

At the very beginning of haustorium formation, an electron-dense material accumulates locally in the plant cell wall (Fig 6). This material has been observed during infection leaves and potato roots by *P. infestans*. It persists during the onset of haustoria and gives rise the extrahaustorial matrix (EM), which is composed of anamorphous mixture of polysaccharides complexed to other macromolecules such as proteins, derived of both partners (Enkerli *et al.*, 1997). The cell wall of the host cell is then locally degraded, and a hypha of the pathogen grows through the wall to invaginate the plant plasma membrane as it enters and continues to expand within the cell wall (Fig 6) (Enkerli *et al.*, 1997). This implies that the haustorium is functionally in contact with a protoplast of the host cell.



Little data is available about oomycetes haustoria structure. A strong presence of vacuoles, Golgi apparatus and endoplasmic reticulum has been observed in haustoria, reflecting the strong secretory activity of this structure (Mims and Richardson, 2003; Soyly, 2004). At the level of the haustorium membrane, only one specific protein, Phimp1, has been clearly identified in *P. infestans* (Avrova et al., 2008). The *Phimp1* gene is highly expressed in cyst and appressoria, but the corresponding protein accumulates specifically in haustoria. Phimp1 is a transmembrane protein presenting a MIDAS motif, that has been identified in cell attachment



proteins of animal pathogens (Akhouri *et al.*, 2004). The specific role of Pihmp1 remains to be determined, but a transient silencing of the *Pihmp1* gene in *P. infestans* led to total loss of pathogenicity. The Pihmp1-silenced strain was unable to spread further after entering the leaf via stomata. This protein may play a major role in stabilizing haustorial membranes of *P. infestans*.

The host cell membrane in contact with haustoria is reorganized in a so-called extrahaustorial membrane (EHM) (O'Connell and Panstruga, 2006). Several lines of evidence indicate that the EHM surrounding fungal haustoria differs from the plasma membrane by a distinct composition and functional differentiation. For example, a number of plasma membrane-resident proteins are excluded from the EHM produced around fungal haustoria (Koh *et al.*, 2005). In order to analyze whether the same is true in the case of oomycetes, Lu *et al.* (2012) investigated the impact of oomycete infection on the localization of a number of plasma membrane proteins. They performed live-cell imaging using confocal microscopy in *A. thaliana* and *Nicotiana benthamiana* lines expressing fluorescent-tagged marker proteins, after infection by *Hyaloperonospora arabidopsidis* and *P. infestans*, respectively. The location of the syntaxin PEN1, involved in the resistance against some pathogenic fungi, was not disturbed during *H. arabidopsidis* infection, since it was equally distributed in the plasma membrane and in the EHM. This result is in agreement with the fact that PEN1 was previously shown to be dispensable for the defense against *H. arabidopsidis* (Kwon *et al.*, 2008). Lu *et al.* (2012) also analyzed the distribution of the plasma membrane receptor kinases FLS2 and EFR, which are both involved in plant immunity as sensors of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). FLS2 was observed in the EHM of *H. arabidopsidis* but, conversely, both FLS2 and EFR were not detected in EHM of *P. infestans*. Although these two receptors have not been yet shown as being involved in the immunity against *P. infestans*, their absence in the EHM could be the result of a pathogen-induced exclusion mechanism. These results indicate that during a compatible interaction, oomycetes may be able to influence the composition of the EHM to their benefit, by down regulating plant PAMP receptors. This may be achieved through the manipulation of the secretory pathway of the host cell, which as been shown to be actively involved in EHM formation (Meyer *et al.*, 2009). Indeed, analysis of vesicular markers during infection by *H. arabidopsidis* and *P. infestans* revealed a pathogen-specific reprogramming host cell vesicle trafficking (Lu *et al.*, 2012). These results suggest the existence of selective mechanisms that control protein diffusion from the plasma membrane into the EHM and specifically prevent the delivery of unwanted membrane proteins to the EHM. In cells *N. benthamiana* infected by *P. infestans*, part of late endocytic trafficking was

diverted toward the EHM. Indeed, the endosomal BRI1 protein and the late endosome protein and tonoplast marker RabG3c (Rab7 GTPase family) were recruited to the EHM. Conversely, the tonoplast-localized sucrose transporter SUC4 did not accumulate at the EHM. Some but not all vacuolar proteins were targeted to haustoria, suggesting therefore a specific rerouting of vacuole-targeted late endosomes to the host–pathogen interface (Bozkurt *et al.*, 2015). The formation of the plant cell EMH surrounding oomycete haustoria involves therefore a complex pathogen-induced remodeling of vesicle trafficking, whose mechanisms still need to be characterized.

Appressoria and haustoria are essential elements in the establishment of pathogenic biotrophic stage. They recognize external components of plant cells, allowing pathogen adhesion on its host. These structures also interact with the plant metabolism, by the secretion of effector proteins, in order to control the defense reactions and monopolize nutrients required for their growth. However, these activities can indicate the presence of the pathogen to the host, who will in return attempt to fight invasion.

## ***3.2 Molecular dialogue in plant-oomycete interactions***

### ***3.2.1 Specific and non-specific defenses in plant immunity***

During evolution, plants have developed two complex signaling systems, which detect pathogens or disease-related disturbances. Pattern recognition receptors (PRRs) of the plant cell membrane ensure the first line of defense against pathogens. In early stage of infection, these receptors recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of haustoria or intracellular hypha (Jones and Dangl, 2006; Zipfel and Robatzek, 2010) and subsequently initiate PAMP-triggered immunity (PTI). PTI is a basal immunity response and it is not pathogen-specific. The second line of defense involves direct or indirect recognition of the pathogen effectors by the products of plant resistance genes (R genes), resulting effector-triggered immunity (ETI). This "gene for gene" response generates a rapid and strong defense reaction that can cause cell death known as hypersensitivity response (HR) around the site of infection (Chisholm *et al.*, 2006), which results in an incompatible interaction. Because it involves the specific interaction of an R protein with a pathogen effector, this mechanism of resistance is pathogen-specific. Partially resistant phenotypes may result from “weak” R gene-effector interactions (Steinbrenner *et al.*, 2015).

In addition to the detection of pathogen molecules, plants are able to detect the pressure produced by hypha, which attempt to penetrate the plant epidermis. In vitro, activation of these

sensory system by a micro-needle, results in the reorganization of the cytoplasm of the cells at the site of contact (Gus-Mayer *et al.*, 1998; Hardham *et al.*, 2008), as well as in the expression of defense genes (Braam, 2004). During initial infection phases, plant responses to oomycetes are similar in compatible and incompatible interactions, although weaker and slower in the susceptible plant (Desender *et al.*, 2007; Silvar *et al.*, 2008; Huibers *et al.*, 2009). These responses are non-specific and associated with PTI. In the interaction between *A. thaliana* and *H. arabidopsidis* only 2 to 5% of the genes have been found to undergo an at least two-fold change in their expression during the early stage of disease (Hok *et al.*, 2011). Three days post infection by *H. arabidopsidis*, 97% of the activated or repressed genes in *A. thaliana* exhibit the same expression profile in the compatible and incompatible interactions (Huibers *et al.*, 2009).

### 3.2.2 Oomycete elicitors and plants receptors

A number of molecules inducing the host defense responses have been identified in oomycetes. Some of them, including peptides/proteins, sugars or lipids, are recognized as PAMPs and trigger PTI responses (Fawke *et al.*, 2015). For example, the OPEL protein, secreted by *Phytophthora* species, has been shown to induce plant basal immunity and systemic acquired resistance (Chang *et al.*, 2015). OPEL possesses a thaumatin-like domain, a glycine-rich protein domain, and a glycosyl hydrolase (GH) domain with laminarinase activity. OPEL-induced PTI response is likely to be elicited by degradation products linked to the laminarinase activity, rather than by the recognition of the protein itself (Chang *et al.*, 2015). The cellulose-binding lectin elicitor (CBEL) from *Phytophthora parasitica nicotianae* possesses two domains allowing binding to cellulose and is recognized as a PAMP by *N. tabacum* (Gaulin *et al.*, 2006). Elicitor lipid transfer proteins are common in *Phytophthora* species (Mikès *et al.*, 1998). Cryptogein (*P. cryptogea*) (Mikes *et al.*, 1997), parasiticein (*P. parasitica*) (Ricci *et al.*, 1992), the capsicein (*P. capsici*) (Ricci *et al.*, 1989) or INF1 (*P. infestans*) (Kamoun *et al.*, 1993), all of them induce necrosis and HR reaction.  $\beta$ -glucans corresponding to cell wall fragments of oomycetes (Cheong *et al.*, 1991) or oomycetes-specific lipids may be perceived as PAMPs. Arachidonic acid (AA) and eicosapentaenoic acid (EPA) isolated from extracts of *Phytophthora infestans* both elicit the accumulation of antimicrobial stress metabolites in potato tubers (Bostock *et al.*, 1981). More recently, the role of EPA and AA as PAMP has been extended to other plant-oomycete interactions (Savchenko *et al.*, 2010; Bostock *et al.*, 2011). Due its remarkable abundance in *Plasmopara halstedii*, EPA has been proposed as a marker for downy mildew contamination in sunflower seeds (Spring and Haas, 2004).



Most of plant pattern recognition receptors (PRRs) are receptor like kinase type (RLK) (Shiu and Bleecker, 2003), with a variable extracellular portion including lectin domain, lysin-motif pattern (LysM), leucine-rich-repeat motif (LRR) (Tör *et al.*, 2009). Only two receptors recognizing oomycete elicitors have been identified to date. The BAK1/SERK3-dependent ELR receptor kinase is involved in INF1 detection (Du *et al.*, 2015) and CERK1, a Glucan-dependent LysM receptor cellulose-elicitor receptor kinase (CERK1) detect  $\beta$ -glucans (Miya *et al.*, 2007).

### 3.3 Defense signaling pathways

Perception of oomycetes pathogen by the host plant stimulates signaling pathways linked to salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) or ethylene, which will induce secondary responses including HR (Halim *et al.*, 2009). Effective defense against biotrophic pathogens such as oomycetes is considered to rely mainly on activation of defense responses regulated by the SA-dependent pathway, leading to programmed cell death in the host (Glazebrook, 2005).

#### 3.3.1 Lipid elicitors

The oomycetes lipids AA and EPA may be perceived as PAMPs by some plants (Bostock *et al.*, 1981). AA and EPA may therefore be used to protect plants from oomycete infection. Application of AA and EPA can protect susceptible millet seedlings from infection by *Sclerospora graminicola* (Amruthesh *et al.*, 2005). Similar results were obtained on potato leaves, which exhibited systemic resistance to *P. infestans* five days after treatment with AA and EPA (Cohen *et al.*, 1991). Induction of systemic resistance led to the hypothesis that lipid elicitors may activate SA pathway. However, transgenic *A. thaliana* plants producing eicosadienoic, eicosatrienoic, and AA showed a decrease in SA production and an increase in JA levels, together with a better resistance to *P. capsici* (Savchenko *et al.*, 2010). On the other hand, treatment of potato and pepper seedlings with AA in lead to an increase in ethylene, which is known to regulate SA and JA production (Bostock *et al.*, 1986; Garcia-Pineda and Lozoya-Gloria, 1999). These data suggest that lipids elicitors modulate SA and JA signaling pathways. As these two molecules are generally considerate as antagonists (Kunkel and Brooks, 2002), it possible that the plant response to lipids is dose dependent. This hypothesis is

consistent with the appearance of necrosis in the presence of high doses of lipids. However, signal pathways activated by lipid elicitors are complex and far from being fully understood.

### 3.3.2 *β-glucans elicitors*

Laminarin, a  $\beta$ -1,3-glucan polymer extracted from *Laminaria digitata* (brown alga) can induce an accumulation defense responses in tobacco and Arabidopsis leaves. In particular, laminarin sulfate (PS3) is an inducer of SA and stimulates SA-dependent defenses in *A. thaliana* (Klarzynski *et al.*, 2000). PS3 has proven very effective against grapevine infection by *P. viticola*. Inhibition of the SA pathway abolishes PS3-induced resistance, highlighting the major role of SA in this phenomenon. Similarly, inhibition of callose synthase and LOX pathway leads to a 30% and 80% decreased of resistance, respectively, suggesting that PS3-induced resistance relies partly on JA and that the deposition of callose plays an important role (Trouvelot *et al.*, 2008).

### 3.3.3 *Protein elicitors*

The OPEL protein, secreted by *Phytophthora* species, has been shown to induce a systemic resistance to *P. parasitica* in *N. tabacum*. OPEL treatment induced expression of SA responsive genes (PR1, PR5 and PAL), but had little effect on both JA and ethylene-responsive genes. This suggests that SA is the main player in OPEL-induced resistance (Chang *et al.*, 2015). The PAMP Pep-13 is a highly conserved motif from an extracellular transglutaminase in *Phytophthora*, which was identified as an activator of SA and JA pathways (Halim *et al.*, 2006). In transgenic potato plants with altered SA or JA biosynthesis, Pep-13 was no longer able to induce HR, suggesting that both SA and JA are involved in Pep-13-induced defenses. However, potato plants deficient in JA did not allow higher growth of *P. infestans* suggesting, that basal defense against this oomycete were not abolished in these plants (Halim *et al.*, 2009). These results suggest that in potato, PAMP responses rely on both SA and JA pathways, whereas SA and JA rather show antagonistic effects in Arabidopsis (Kunkel and Brooks, 2002).

### 3.4 *Early events at the plant-oomycete interface*

Early perception of oomycete components induces drastic changes in host cells, including cytoplasmic aggregations and rearrangement of the cytoskeleton, which are among the first visible cellular responses to the infection.

#### 3.4.1 *Rearrangements of the cytoskeleton*

In cells in contact with the pathogen, rapid rearrangement of cytoskeletal components is carried out, and leads the relocation of nuclei and other organelles (Takemoto *et al.*, 2003). F-actin polymerizes and is reoriented toward the pathogen, below the penetration site and in neighboring cells. At the contact point, the cortical microtubules depolymerize, resulting of a concentrated free GFP-tubulin spot (Cahill *et al.*, 2002). This phenomenon has also been observed several hours after the cryptogein treatment of tobacco cell suspensions (Higaki *et al.*, 2007). In a grapevine transgenic actin marker line, contact with zoospores of *Plasmopara viticola* induced the formation of a perinuclear actin basket not only the guard cells, but also epidermal pavement cells, where no zoospores had attached (Guan *et al.*, 2014). This observation supports the hypothesis that guard cells may act as gatekeepers signaling the presence of the pathogen to the neighboring epidermal cells. All together, these data suggest that actin is intimately associated with early defense reactions, and that its reorganization is supported by microtubule depolymerization. However, in lettuce challenge with *B. lactucae*, microtubules are reorganized at the point contact between host and the pathogen, ensuring the invagination of the plasma membrane in the compatible interaction and thus promoting the formation of haustoria (Lebeda *et al.*, 2008). Although these results contradict those obtained in other pathosystems, cytoskeletal reorganization in host cells seems generally non-specific. In fact, the same patterns of reorganization can be obtained by exerting a pressure on cells, simulating a pathogen attempt to penetrate the plant (Hardham *et al.*, 2008). Cessation of the stimulation induces a return to the initial state, suggesting that these mechanisms are reversible.

#### 3.4.2 *Callose formation*

Like cytoskeleton rearrangements, callose deposition in response to oomycete infection is generally observed in both compatible and incompatible interactions. However, the intensity of callose deposition is significantly influenced by the degree of compatibility of the pathosystem

(Parker *et al.*, 1993; Donofrio and Delaney, 2001). When the plant reaction is stronger, deposits can extend around haustoria and hyphae (Toffolatti *et al.*, 2012), resulting in the haustoria being encased by a double-layered cup-shaped callose-containing membrane structure (Lu *et al.*, 2012). The appearance of these encased haustoria is related to the level of compatibility between *P. parasitica* and *A. thaliana*. When haustoria are encased by epidermis cells, they do not develop anymore, indicating a non-host interaction (Koch and Slusarenko, 1990).

### **3.5 Impact of oomycete infection on host primary metabolism**

Haustoria are major structures involved in nutrient absorptions. However, The discovery of glycolytic enzymes and transporters genes in the *Phytophthora* mycelia suggest that in a nutrient-rich environment, they are also able to capture external energy and synthesize amino acids, cofactors, and secondary metabolites (Judelson *et al.*, 2009). However, an inhibitor of the plant plasma membrane sucrose transporter (p-chloromercuribenzenesulfonate) blocks sucrose uptake by haustoria but not by intercellular hyphae, suggesting that nutrient uptake by haustoria and hyphae involve different mechanisms. In this chapter, we will focus on nutrient uptake by oomycetes during the biotrophic phase and in compatible interactions.

#### **3.5.1 Carbohydrate metabolism**

During light period, the photosynthesis process allows the conversion of CO<sub>2</sub> into sugars. Sources organs or tissues correspond to plants parts capable of photosynthesis, for example, mature leaves. Conversely, immature leaves, and developing roots are regarded as “sink tissues”. They import carbohydrates and nutrients for active metabolisms. A portion of the sugars produced are kept in the leaf chloroplasts and accumulated as starch during the day, and almost completely metabolized at night, when photosynthesis is no longer active (Yu *et al.*, 2015).

##### **3.5.1.1 Starch metabolism**

Early work indicated that starch amounts were modified in oomycete-infected plant organs. Infection by *Abulgo trapogonis* or *A. candida* led to a gradual disappearance of starch from infected tissues (Whipps and Cooke, 1978; Tang *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 2000). Following pathogen invasion, starch disappeared in the areas of mycelium propagation, while increasing in the healthy part of the leaf. In agreement with the microscopic observations, the

expression of genes related to the synthesis of starch (AGPase, soluble starch synthase) was suppressed in infected tissues, both in the dark and light periods (Chou *et al.*, 2000).

Similarly, infection by *Phytophthora* species induce drastic changes in the plant primary metabolism during the biotrophic phase. In tomato leaves, infection by *P. infestans* or *P. capsici* leads to an increase in the expression of genes related to starch degradation and mitochondrial metabolism (Jupe *et al.*, 2013; Zuluaga *et al.*, 2015). On the other hand, infection of susceptible *Fagus sylvatica* roots with *P. citricola*, resulted in the repression of defense genes, and in the induction of the expression of genes involve in energy metabolism. This suggests that infection triggered resource allocation into the roots to support the increased sink caused by pathogen growth (Schlink, 2010). In grapevine leaves infected by *P. viticola*, starch was accumulated at the end of dark period, co-localizing with oil-spot symptoms, whereas starch amounts were very low at that time in parenchyma of control leaves. During the light period, starch was uniformly distributed in control leaves, while it was concentrated in the oil-spot areas of infected leaves (Gamm *et al.*, 2011). This modification of starch metabolism was accompanied by a decrease in the expression of starch related genes, including those encoding soluble starch synthase, AGPase and  $\beta$ -amylase. Surprisingly, the gene encoding  $\alpha$ -amylase was highly induced during *P. viticola* infection,  $\alpha$ -amylase activation being a common characteristic of sink tissues. These results suggest that, in *P. viticola*-infected leaves,  $\alpha$ -amylase replaces  $\beta$ -amylase for starch degradation

### 3.5.1.2 Sucrose

Sucrose and starch synthesis are in competition, since they depend on the same triose phosphate pool. The main sucrose biosynthesis pathway in the source tissues uses sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase enzymes. If required, sucrose is transported to sink tissues in order to be metabolized or converted on starch. Sucrose is the most abundant carbohydrate in the flow of metabolites (Fettke and Fernie, 2015). During early stages of the infection of *A. thaliana* leaves by *A. candida*, sucrose amounts are similar in both non-inoculated leaves and healthy tissues infected leaves. However, sucrose biosynthesis is promoted in infected leaves at later stages of infection (Tang *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 2000). Increase in sucrose concentrations in *Senecio squalidus* leaves infected by *A. tragononis* had been reported earlier (Whipps and Cooke, 1978).

In contrast, grapevines leaves challenge with *P. viticola*, exhibit a gradual sucrose depletion along the infection cycle (Brem *et al.*, 1986). The decrease in sucrose concentrations in *P. viticola*-infected grapevine leaves was specific to the light period, and correlated with the

repression of sucrose phosphate synthase gene expression (Gamm *et al.*, 2011). Similarly, infection of tobacco leaves by *P. nicotiana* reduced sucrose export toward the petiole. In the first hours post inoculation, sucrose export was reduced by 70% compared to control leaves, but its concentration in the apoplast raised by 50% (Scharte *et al.*, 2005). Sucrose retention in this compartment correlated with callose formation at the interface of spongy mesophyll cells. A blockade of intercellular communications by callose deposition at plasmodesmata had already been observed during infection by *P. sojae* (Enkerli *et al.*, 1997). Sucrose accumulation in the apoplastic compartment may therefore be a consequence of the inhibition of export caused by callose formation (Scharte *et al.*, 2005). Oomycete-induced modification of sucrose metabolism is accompanied by a local increase of the expression of genes encoding soluble invertase, and more significantly, apoplastic invertase (Brem *et al.*, 1986; Scharte *et al.*, 2005; Polesani *et al.*, 2010).

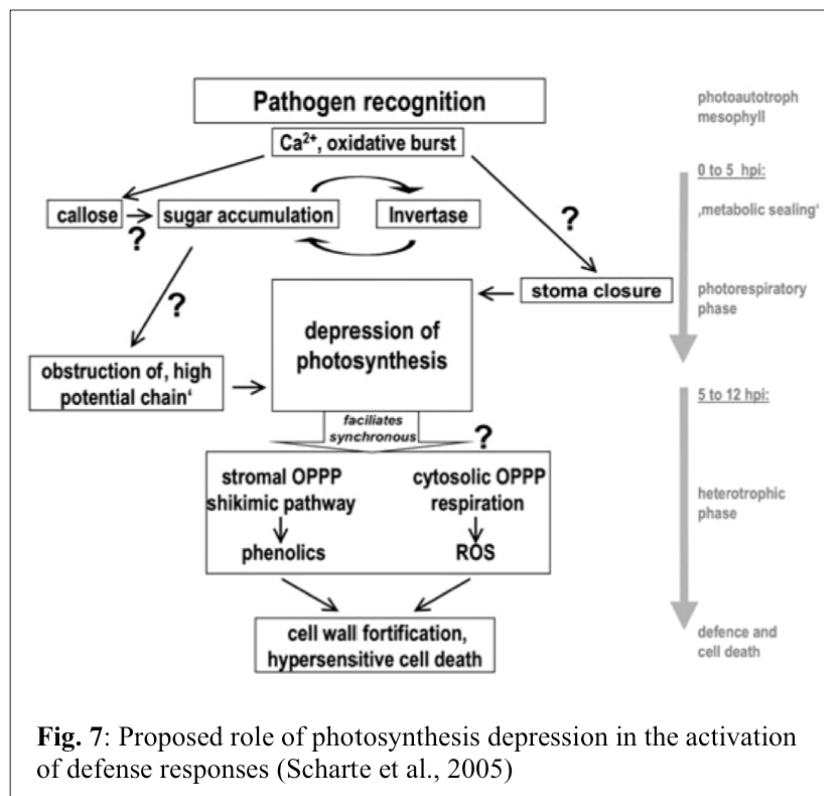
### **3.5.1.3 Invertase activity and increase in hexose concentrations**

Invertases are key enzymes in the carbohydrate allocation, cleaving sucrose to fructose and glucose (Ludewig and Flügge, 2013). Apoplastic invertase is highly active in sink tissues and increased apoplastic invertase activity in oomycete-infected tissues may reflect a local shift from source to sink. However, it is difficult to attribute this increased invertase activity to perturbation of the plant metabolism or to expression of oomycete invertases. Indeed, oomycetes possess invertase that may allow efficient sugar acquisition (Judelson *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2010; Luis *et al.*, 2013). Treatment of tobacco leaves with cell-free filtrate of *Phytophthora nicotiana* enhanced invertase activity, showing that increased invertase activity in infected tissues is, at least partly, due to plant enzymes (Scharte *et al.*, 2005). Increase in invertase activity leads to an accumulation of soluble carbohydrates in latter stage of infectious cycle, which may bring fuel pathogen growth and sporulation (Tang *et al.*, 1996; Scharte *et al.*, 2005; Gamm *et al.*, 2011). In return, sugars may initiate different signaling pathways leading to activation of pathogenesis-related (PR) proteins and defense-related genes, and down-regulation of photosynthesis (Roitsch, 1999).

### **3.5.1.4 Disruption of photosynthesis**

Increased hexose concentration in oomycete-infected host tissues lead to the suppression of photosynthetic gene expression, such as chlorophyll ab binding proteins (Cab), cytochrome B and ribulose 1-5 bisphosphate carboxylase (Rubisco) (Chou *et al.*, 2000; Gamm *et al.*, 2011;

Malacarne *et al.*, 2011). Infection of *A. thaliana* leaves by *A. candida* resulted in a 50% decrease of Rubisco activity in comparison with healthy leaves, as the result of a decrease in the amount of Rubisco protein, while enzymatic activity by Rubisco unit increased (Tang *et al.*, 1996). Similarly, infection of grapevine leaves by *P. viticola* lead to the induction of the chlorophyllase gene involved in chlorophyll degradation (Gamm *et al.*, 2011). Chlorophyll fluorescence imaging of tobacco leaves challenged with virulent *Phytophthora nicotianae* showed that very localized decline of photosynthesis occurred in single mesophyll cells and *Albugo candida* has been shown to lower the rate of host photosynthesis in discrete regions of infected leaves (Chou *et al.*, 2000; Scharte *et al.*, 2005). This has led these authors to propose that depression of photosynthesis is a prerequisite for the metabolic shift in the cytosol towards respiratory activity and activation of the oxidative pentose phosphate pathway and, thus, for defense and hypersensitive cell death (Fig. 7).



### 3.5.2 Amino acid metabolism

In addition to their major impact carbohydrate metabolism, oomycete may also influence or rely on the metabolism of amino acids in host cells. In return, pathogens fitness may be affected by amino acid-derived defense metabolites, such as the Trp-derived phytoalexin camalexin and indolic glucosinolates (Bednarek *et al.*, 2009). A screen for *A. thaliana* mutants

with increased resistance to *H. arabidopsidis* has led to the identification of a loss-of-inhibition allele of Aspartate kinase2 and a loss-of-function allele of dihydrodipicolinate synthase2 (Stuttman *et al.*, 2011). Both mutations affected amino acid homeostasis, leading to over-accumulation of the Asp derived amino acids Met, Thr, and Ile. Apparently, these perturbations in amino acid homeostasis did not activate specific defense mechanisms or metabolites, but rendered the mutant plants unsuitable as an infection host for *H. arabidopsidis*. Enhanced resistance was found to be specifically linked the accumulation of Thr. Indeed, mutant plants that over-accumulated only Met were not hyper-resistant to *H. arabidopsidis*, and pretreatment of plants with Thr, but not Ile, led to reduced pathogen sporulation. Conversely, both mutants retained full susceptibility to the obligate biotrophic fungus *Golovinomyces orontii* (Stuttman *et al.*, 2011). Another genetic screen identified the *dmr1* mutant of *A. thaliana*, which exhibits enhanced resistance to *H. arabidopsidis*. The *dmr1* mutant is affected in the gene encoding homoserine kinase (HSK), resulting in the accumulation of high levels of homoserine in chloroplasts. The molecular bases of homoserine-dependent enhanced resistance are still unknown, but resistance of the *dmr1* mutants was specific to *H. arabidopsidis*, as these plants were still susceptible to other pathogens (van Damme *et al.*, 2009).

### 3.6 Secondary responses to oomycete infection

#### 3.6.1 Oxidative burst

Following plant infection, the so-called oxidative burst leads to the production of reactive oxygen species (ROS), including superoxide anion ( $O_2^-$ ), singlet oxygen ( $O_2^*$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) or ozone ( $O_3$ ), often accompanied by the production of nitric oxide (NO) (Lamb and Dixon, 1997; Delledonne *et al.*, 1998). ROS are highly reactive molecules due to the presence of unpaired valence electrons. These molecules have many functions in the plant and, in response to biotic stress, they participate in both defense reactions (antimicrobial agent, HR and necrosis) and signalization pathways (induction of gene expression and of phytoalexin biosynthesis) (Shetty *et al.*, 2008).

ROS are particularly toxic antimicrobial agents, as 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  can inhibit the growth of *P. infestans* up to 95% (Wu *et al.*, 1995). ROS are also implicated in cell wall strengthening. The cell wall is the first line of defense against pathogens. This natural barrier may be strengthening during infection, with additional deposition of lignin (Hamann, 2012). As peroxidases (POX) are involved in lignin formation, POX activity and lignin deposition has been analyzed in "Chardonnay" (sensitive) and "Bianca" (resistant) grapevine varieties



following inoculation with *P. viticola*, as well as in fifteen of their hybrids. In both early and later infection stages, POX activity was detected at the walls of the guard cells and stomata vacuoles, close to the infection area. Host cells browning correlated with POX localization, and, in resistant plants, with altered pathogen structures. These results showed a co-localization between lignin and ROS reaction, together with a positive correlation between lignin deposition and resistance (Toffolatti *et al.*, 2012). Lignin deposition is a common defense response during incompatible interaction with oomycete pathogens, and lead to strengthens of cells walls and interferences with the enzymatic hydrolysis and mechanical penetration of plant tissue (Mohr and Cahill, 2001). Like SA and JA, ROS are involved in the activation of phytoalexins biosynthesis. A correlation between accumulation of capsidiol and superoxide production has been established in tobacco. The incompatible interaction between *N. tabacum* and *P. nicotiana* causes a first oxidative burst in early response, followed by second more powerful one, which is involved in HR response (Perrone *et al.*, 2003). The same biphasic oxidative burst has been observed in other plant-oomycete interactions, including *L. sativa* challenged by *B. lactucae*, grapevine and *P. viticola* interaction or potato challenged with *P. infestans* (Polkowska-Kowalczyk and Maciejewska, 2001; Sedlářová *et al.*, 2007; Toffolatti *et al.*, 2012). However, this biphasic responses is not specific to oomycete infections (Shetty *et al.*, 2008).

### 3.6.2 Induction of defense-related secondary metabolism by oomycetes

Phytoalexins are low molecular weight antimicrobial substances produced *de novo* by plants during infection or stress. Phytoalexins may be synthesized in responses to both biotic and abiotic stress, but their actual role in resistance again pathogens is still a matter of debate (Ahuja *et al.*, 2012). Camalexin, the main phytoalexin of *A. thaliana*, is one of the few compounds, whose potential role against different pathogens has been studied. Analysis of *A. thaliana* mutants affected in their capacity to produce camalexin upon pathogen challenge revealed that camalexin plays a role in resistance to several necrotrophic fungi but not to the hemibiotrophic bacteria *Pseudomonas syringae*. Camalexin has been shown to be produced in response to different oomycete pathogens including *Phytophthora brassicae* and *Pythium sylvaticum* (Ahuja *et al.*, 2012). Analysis of Arabidopsis mutants affected in the biosynthesis of tryptophan-derived secondary metabolites has shown that resistance to *P. brassicae* relies on the sequential action of indole glucosinolates and camalexin (Schlaeppli *et al.*, 2010).

Phytoalexins include a vast diversity of secondary metabolites, belonging to tree main families: alkaloids, isoprenoids (terpenoid) and phenylpropanoids (Großkinsky *et al.*, 2012).

Table 1 provides a non-exhaustive list of the main phytoalexins identified in different plant species upon infection by various oomycete pathogens.

Phytoalexins	Metabolism	Plantes species	Plant tissu	Oomycetes	Reference
Brassinins	Indole alkaloids	<i>Brassica rapa</i>	Leaves	<i>Albugo candida</i>	Pedras <i>et al.</i> 2008
Camalexin	Indole alkaloid	<i>A. thaliana</i>	leaves	<i>Phytophthora capsici</i>	Wang <i>et al.</i> 2013
		<i>A. thaliana</i>	leaves	<i>P. brassicae</i>	Schlaeppli <i>et al.</i> 2010
		<i>A. thaliana</i>	leaves	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	Mert-Turk <i>et al.</i> 2003
Solanine	Alkaloid	<i>Solanum tuberosum</i>	tuber	<i>P. infestans</i>	Sarquis <i>et al.</i> 2000
Capsidiol	Isoprenoid	<i>Capsicum annuum</i>		<i>P. capsici</i>	Villar-Luna <i>et al.</i> 2015
		<i>N. benthamiana</i>	leaves	<i>P. infestans</i>	Ohtsu <i>et al.</i> , 2014
		<i>N. tabacum</i>	Cell culture	<i>P. nicotanae</i>	Perrone <i>et al.</i> 2003
		<i>N. tabacum</i>	Cell culture	<i>P. palmivora</i>	Perrone <i>et al.</i> 2003
Lettucenin	Isoprenoid	<i>L. sativa</i>	leaves	<i>Bremia lactucae</i>	Bennett <i>et al.</i> 1994
Rishitin	Isoprenoid	<i>S. tuberosum</i>	tuber	<i>P. infestans</i>	Wang <i>et al.</i> 2008
Glyceollin	Phenylpropanoids	<i>F. glycinea</i>	roots	<i>P. sojae</i>	Lygin <i>et al.</i> 2013
Resveratrol, viniferins, piceids, pterostilbene	Phenylpropanoids (Stilbenes)	<i>V. vinifera</i>	leaves	<i>Plasmopara viticola</i>	Alonso-Villaverde <i>et al.</i> 2011
Scopoletin	Phenylpropanoids (Coumarin)	<i>N. tabacum</i>	Cell culture	<i>P. nicotanae</i>	Perrone <i>et al.</i> 2003
		<i>N. tabacum</i>	Cell culture	<i>P. palmivora</i>	Perrone <i>et al.</i> 2003

**Table 1.** Main phytoalexins identified in a selection of plant-oomycete interactions

Phytoalexins exhibit antimicrobial properties *in vitro*. The toxicity of phytoalexins is most often non-specific, although different pathogens may be more or less sensitive to a given phytoalexin. For example, *P. infestans* is more sensitive to the antimicrobial activity of capsidiol than *P. capsici*. Capsidiol is produced by several *Solanaceae*, including *Capsicum annuum* and *N. tabacum*, but not by *S. tuberosum*, the host of *P. infestans* (Giannakopoulou *et al.*, 2014). This is consistent with the hypothesis that this phytoalexin contributes to the non-host resistance of *Solanaceae* to *P. infestans*. Apart from the specific case of *A. thaliana* where mutants are available, the actual role of phytoalexin in resistance against pathogens is still

unclear. For example, the grapevine phytoalexin resveratrol and the derived stilbene family has been proposed to contribute to the defense against the downy mildew agent *Plasmopara viticola* (Schnee *et al.*, 2008; Alonso-Villaverde *et al.*, 2011). Indeed, resveratrol reduced the germination of sporangia and zoospore mobility of *P. viticola* and pterostilbene, the dimethylated form of resveratrol, had a 5-fold higher activity than resveratrol (Pezet *et al.*, 2004). In a grapevine population segregating for resistance to downy mildew, resistance was positively correlated with the accumulation of stilbenes in infected plants (Malacarne *et al.*, 2011). However, the lack of grapevine mutants unable to produce stilbenes make it difficult to evaluate the actual role of these phytoalexins in the resistance against *P. viticola*.

#### 4. Sporulation

Following the biotrophic phase, hypha will give rise to sporophores bearing sporangia or conidia. They contain zoospores responsible for the disease spread and secondary infections. Saturated atmosphere humidity and darkness are the optimum conditions for this process. Although the mechanisms underlying sporulation are poorly understood, it depends on both plant factors and environmental conditions (Hardham and Hyde, 1997). Several plant factors have been found to inhibit sporulation, however, the intensity of the sporulation rather reflects the overall compatibility level between the host and the pathogen. Both ROS production and callose deposition could contribute to reduced levels of sporulation. In grapevine,  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA)-induced resistance against downy mildew (*P. viticola*) leads to a strong reduction of mycelial growth and sporulation through callose formation and JA signaling. This BABA-induced resistance was partially abolished by the callose synthesis inhibitor 2-deoxy-D-glucose (Hamiduzzaman *et al.*, 2005; Trouvelot *et al.*, 2008). Similarly, resveratrol and resveratrol analogues were proposed to inhibit the growth and sporulation of *P. viticola* (Chalal *et al.*, 2014).

## Conclusion

Plant infection by oomycetes relies on intense communication with the host throughout the pathogen cycle, from the attraction of zoospores to mycelial growth and sporulation. Zoospore attraction involves chemical signals, and specially for roots, electric signals. Apart from a few molecules identified as chemoattractants in specific pathosystems, these chemical interactions seem largely non-specific. However, this conclusion may be biased due to the fact that this infection stage has been mainly studied on *Phytophthora* species. These pathogens have a broad host spectrum, which means they are likely to detect the presence of a potential host via the perception of ubiquitous molecules.

The establishment of specificity in the interaction appears during the formation of the first haustoria. Indeed, the contact of an haustorium with a plant cell during a non-host interaction results in a rapid response from the plant and in the destruction of pathogen structures (Díez-Navajas *et al.*, 2008). Altogether, the degree of compatibility in the interaction influences the number and the development of haustoria produced by the pathogen (Unger *et al.*, 2007). These observations indicate that haustoria are not simple feeding structures, but also places of intense exchanges between the plant and the pathogen.

The penetration of plant tissues by oomycetes during an incompatible interaction induces intense physiological and cellular responses. First, the cytoskeleton of cells in contact with haustoria is reorganized. At the tissue level, the plant then responds by the deposition of callose, the induction of an oxidative burst, and finally the production of defense-related secondary metabolites. The toxicity of phytoalexins is generally non-specific, although some oomycetes may be more or less sensitive to a given phytoalexin (Giannakopoulou *et al.*, 2014). In compatible interaction, oomycete-induced cell and tissue perturbations are much more subtle. Pathogen feeding induces disturbance of the carbohydrate metabolism, with inhibition of photosynthesis and starch formation, together with stimulation of the release of hexoses, which can be used to support mycelial growth (Chou *et al.*, 2000; Scharte *et al.*, 2005; Gamm *et al.*, 2011; Malacarne *et al.*, 2011). However, the overall impact of oomycete-infection on host metabolism is poorly understood, especially in compatible situations. Studies have mostly focused on carbohydrate metabolism (Scharte *et al.*, 2005), but a more general picture of oomycete-induced changes in host metabolism is still missing. Related to this, what makes a given plant a "good" host for an oomycete is not known. A good host will provide the pathogen with all it needs for optimal growth, but this complex set of elements is still poorly characterized, in particular in the case of obligate biotrophs. In recent years, oomycete genomic

resources and transcriptomic data on plant-oomycete interactions have greatly developed (Fawke *et al.*, 2015). However, similar to the situation for powdery mildews, there are currently little systematic studies of the oomycete metabolome (Bindschedler *et al.*, 2016). Future developments of metabolomics will help to get a better picture of oomycete-induced modifications of host metabolism, and will shed some light on oomycete-specific metabolism.

## References

- Adhikari BN, Hamilton JP, Zerillo MM, Tisserat N, L'vesque CA, Buell CR** (2013) Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. *PLoS ONE* **8**: e75072
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* **17**: 73–90
- Akhouri RR, Bhattacharyya A, Pattnaik P, Malhotra P, Sharma A** (2004) Structural and functional dissection of the adhesive domains of Plasmodium falciparum thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). *Biochem J* **379**: 815–822
- Allen RN, Harvey JD** (1974) Negative chemotaxis of zoospores of *Phytophthora cinnamomi*. *J Gen Microbiol* **84**: 28–38
- Allen RN, Newhook FJ** (1973) Chemotaxis of zoospores of *Phytophthora cinnamomi* to ethanol in capillaries of soil pore dimensions. *Transactions of the British Mycological Society* **61**: 287–302
- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring J-L, Gindro K** (2011) The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiol Biochem* **49**: 265–274
- Amruthesh KN, Geetha NP, Jorgensen H, de Neergaard E, Shetty HS** (2005) Unsaturated fatty acids from zoospores of *Sclerospora graminicola* induce resistance in pearl millet. *Eur J Plant Pathol* **111**: 125–137
- Anderson RG, Deb D, Fedkenheuer K, McDowell JM** (2015) Recent Progress in RXLR Effector Research. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 1063–1072
- Appiah AA, van West P, Osborne MC, Gow NAR** (2005) Potassium homeostasis influences the locomotion and encystment of zoospores of plant pathogenic oomycetes. *Fungal Genet Biol* **42**: 213–223
- Avrova AO, Boevink PC, Young V, Grenville-Briggs LJ, van West P, Birch PRJ, Whisson SC** (2008) A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cell Microbiol* **10**: 2271–2284
- Baxter L, Tripathy S, Ishaque N, Boot N, Cabral A, Kemen E, Thines M, Ah-Fong A, Anderson R, Badejoko W, et al** (2010) Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome. *Science* **330**: 1549–1551
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, et al** (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**: 101–106
- Behrens HM, Weisenseel MH, Sievers A** (1982) Rapid Changes in the Pattern of Electric Current around the Root Tip of *Lepidium sativum* L. following Gravitstimulation. *Plant Pathology* **70**: 1079–1083
- Bimpong CE, Clerk GC** (1970) Motility and Chemotaxis in Zoospores of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. *Ann Bot* **34**: 617–624
- Bindschedler LV, Panstruga R, Spanu PD** (2016) Mildew-Omics: How Global Analyses Aid the Understanding of Life and Evolution of Powdery Mildews. *Front Plant Sci* **7**: 123
- Bircher U, Hohl HR** (1997) Environmental signalling during induction of appressorium formation in *Phytophthora*. *Mycol Res* **101**: 395–402
- Blanco FA, Judelson HS** (2005) A bZIP transcription factor from *Phytophthora* interacts with a protein kinase and is required for zoospore motility and plant infection. *Mol Microbiol* **56**: 638–648
- Bloodgood RA** (1991) Transmembrane signaling in cilia and flagella. *Protoplasma* **164**: 12–22
- Bostock RM, Kuc JA, Laine RA** (1981) Eicosapentaenoic and Arachidonic Acids from *Phytophthora infestans* Elicit Fungitoxic Sesquiterpenes in the Potato. *Science* **212**: 67–69
- Bostock RM, Savchenko T, Lazarus C, Dehesh K** (2011) Eicosapolyenoic acids: novel MAMPs with reciprocal effect on oomycete-plant defense signaling networks. *Plant Signal Behav* **6**: 531–533

- Bostock RM, Schaeffer DA, Hammerschmidt R** (1986) Comparison of elicitor activities of arachidonic acid, fatty acids and glucans from *Phytophthora infestans* in hypersensitivity expression in potato tuber. *Physiological Plant Pathology* **29**: 349–360
- Bozkurt TO, Belhaj K, Dagdas YF, Chaparro-Garcia A, Wu C-H, Cano LM, Kamoun S** (2015) Rerouting of Plant Late Endocytic Trafficking Toward a Pathogen Interface. *Traffic* **16**: 204–226
- Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S** (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 483–492
- Braam J** (2004) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol* **165**: 373–389
- Brem S, Rast DM, Ruffner HP** (1986) Partitioning of photosynthate in leaves of *Vitis vinifera* infected with *Uncinula necator* or *Plasmopora viticola*. *Physiol Mol Plant Pathol* **29**: 285–291
- Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM** (2008) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl Environ Microbiol* **74**: 738–744
- Broembsen von SL, Deacon JW** (1997) Calcium Interference with Zoospore Biology and Infectivity of *Phytophthora parasitica* in Nutrient Irrigation Solutions. *Phytopathology* **87**: 522–528
- Broembsen von SL, Deacon JW** (1996) Effects of calcium on germination and further zoospore release from zoospore cysts of *Phytophthora parasitica*. *Mycol Res* **100**: 1498–1504
- Brunner F, Rosahl S, Lee J, Rudd JJ, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D, Nürnberger T** (2002a) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora transglutaminases*. *EMBO J* **21**: 6681–6688
- Brunner F, Wirtz W, Rose JKC, Darvill AG, Govers F, Scheel D, Nürnberger T** (2002b) A beta-glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete, *Phytophthora infestans*. *Phytochem* **59**: 689–696
- Byrt PN, Irving HR, Grant BR** (1982) The effect of cations on zoospores of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. *J Gen Microbiol* **128**: 1189–1198
- Cahill D, Rookes J, Michalczyk A, McDonald K** (2002) Microtubule dynamics in compatible and incompatible interactions of soybean hypocotyl cells with *Phytophthora sojae*. *Plant Pathol* **51**: 629–640
- Cahill DM, Hardham AR** (1994a) Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **84**: 193–200
- Cahill DM, Hardham AR** (1994b) A dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. *Phytopathology* **84**: 1284–1292
- Cameron JN, Carlile MJ** (1978) Fatty acids, aldehydes and alcohols as attractants for zoospores of *Phytophthora palmivora*. *Nature* **271**: 448–449
- Carlile MJ** (1983) Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*, APS Press. 95–107
- Carzaniga R, Bowyer P, O'Connell RJ** (2001) Production of extracellular matrices during development of infection structures by the downy mildew *Peronospora parasitica*. *New Phytol* **149**: 83–93
- Chalal M, Klinguer A, Echairi A, Meunier P, Vervandier-Fasseur D, Adrian M** (2014) Antimicrobial activity of resveratrol analogues. *Molecules* **19**: 7679–7688
- Chang Y-H, Yan H-Z, Liou R-F** (2015) A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. *Mol Plant Pathol* **16**: 123–136
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, et al** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532
- Cheong JJ, Birberg W, Fügedi P, Pilotti A, Garegg PJ, Hong N, Ogawa T, Hahn MG** (1991) Structure-activity relationships of oligo-beta-glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Cell* **3**: 127–136
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803–814
- Chou HM, Bundock N, Rolfe SA, Scholes JD** (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol Plant Pathol* **1**: 99–113
- Cohen Y, Gisi U, Mosinger E** (1991) Systemic Resistance of Potato Plants Against *Phytophthora-Infestans* Induced by Unsaturated Fatty-Acids. *Physiol Mol Plant Pathol* **38**: 255–263
- Connolly MS, Williams N, Heckman CA, Morris PF** (1999) Soybean isoflavones trigger a calcium influx in *Phytophthora sojae*. *Fungal Genet Biol* **28**: 6–11
- Deacon JW, Saxena G** (1998) Germination triggers of zoospore cysts of *Aphanomyces euteiches*. *Mycol Res* **102**: 33–41
- Declercq B, Devlamynck J, De Vleeschauwer D, Cap N, De Nies J, Pollet S, Höfte M** (2011) New Insights in the Life Cycle and Epidemics of *Phytophthora porri*. *J Phytopathol* **160**: 67–75

## Revue bibliographique

- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588
- Desender S, Andrivon D, Val F** (2007) Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cell Microbiol* **9**: 21–30
- Díez-Navajas AM, Wiedemann-Merdinoglu S, Greif C, Merdinoglu D** (2008) Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* **98**: 776–780
- Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG** (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol* **183**: 993–1000
- Donaldson SP, Deacon JW** (1993) Changes in motility of *Pythium* zoospores induced by calcium and calcium-modulating drugs. *Mycol Res* **97**: 877–883
- Donofrio NM, Delaney TP** (2001) Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defence-compromised *Arabidopsis* *nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 439–450
- Doud MB, Koksai AC, Mi L-Z, Song G, Lu C, Springer TA** (2012) Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 7817–7822
- Du J, Verzaux E, Chaparro-Garcia A, Bijsterbosch G** (2015) Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants* **1**: 1–5
- Emmett RW, Parbery DG** (1975) Appressoria. *Annu Rev Phytopathol* **13**: 147–165
- Enkerli K, Mims CW, Hahn MG** (1997) Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Can J Bot* **75**: 1493–1508
- Fawke S, Doumane M, Schornack S** (2015) Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 263–280
- Fettke J, Fernie AR** (2015) Intracellular and cell-to-apoplast compartmentation of carbohydrate metabolism. *Trends Plant Sci* **20**: 490–497
- Förster H, Tyler BM, Coffey MD** (1994) *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 780–791
- Fry WE** (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol* **9**: 385–402
- Galiana E, Rivière M-P, Pagnotta S, Baudouin E, Panabières F, Gounon P, Boudier L** (2005) Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Cell Microbiol* **7**: 1365–1378
- Gamm M, Héloir M-C, Bligny R, Vaillant-Gaveau N, Trouvelot S, Alcaraz G, Frettinger P, Clément C, Pugin A, Wendehenne D, et al** (2011) Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1061–1073
- Garcia-Pineda E, Lozoya-Gloria E** (1999) Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant Science* **145**: 11–21
- Gascuel Q, Martínez Y, Boniface M-C, Vear F, Pichon M, Godiard L** (2015) The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Mol Plant Pathol* **16**: 109–122
- Gaulin E, Bottin A, Dumas B** (2010) Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. *Plant Signal Behav* **5**: 258–260
- Gaulin E, Dramé N, Lafitte C, Torto-Alalibo T, Martínez Y, Ameline-Torregrosa C, Khatib M, Mazarguil H, Villalba-Mateos F, Kamoun S, et al** (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell* **18**: 1766–1777
- Gaulin E, Jauneau A, Villalba F, Rickauer M, Esquerré-Tugayé M-T, Bottin A** (2002) The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var-*nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J Cell Sci* **115**: 4565–4575
- Giannakopoulou A, Schornack S, Bozkurt TO, Haart D, Ro D-K, Faraldos JA, Kamoun S, O'Maille PE** (2014) Variation in capsidiol sensitivity between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora capsici* is consistent with their host range. *PLoS ONE* **9**: e107462
- Gilchrist** (1996) Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 189–196
- Gisi U** (1983) Biophysical aspects of the development of *Phytophthora*, APS Press. 109–119
- Glazebrook J** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–227
- Gow NA** (1993) Nonchemical signals used for host location and invasion by fungal pathogens. *Trends Microbiol* **1**: 45–50
- Görnhardt B, Rouhara I, Schmelzer E** (2000) Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 32–42

## Revue bibliographique

- Grant BR, Griffith JM, Irving HR** (1986) A model to explain ion-induced differentiation in zoospores of *Phytophthora palmivora*. *Exp Mycol* **10**: 89–98
- Grant BR, Irving HR, Radda M** (1985) The effect of pectin and related compounds on encystment and germination of *Phytophthora palmivora* zoospores. *J Gen Microbiol* **131**: 669–676
- Grenville-Briggs LJ, Avrova AO, Hay RJ, Bruce CR, Whisson SC, van West P** (2010) Identification of appressorial and mycelial cell wall proteins and a survey of the membrane proteome of *Phytophthora infestans*. *Fungal Biol* **114**: 702–723
- Grenville-Briggs LJ, van West P** (2005) The biotrophic stages of oomycete-plant interactions. *Adv Appl Microbiol* **57**: 217–243
- Griffith JM, Iser JR, Grant BR** (1988) Calcium control of differentiation in *Phytophthora palmivora*. *Arch Microbiol* **149**: 565–571
- Großkinsky DK, van der Graaff E, Roitsch T** (2012) Phytoalexin transgenics in crop protection--fairly tale with a happy end? *Plant Sci* **195**: 54–70
- Grünwald NJ, Garbelotto M, Goss EM, Heungens K, Prospero S** (2012) Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends Microbiol* **20**: 131–138
- Guan X, Buchholz G, Nick P** (2014) Actin marker lines in grapevine reveal a gatekeeper function of guard cells. *J Plant Physiol* **171**: 1164–1173
- Gubler F, Hardham AR** (1988) Secretion of adhesive material during encystment of *Phytophthora cinnamomi* zoospores, characterized by immunogold labelling with monoclonal antibodies to .... *J Cell Sci* **90**: 225–235
- Gubler F, Hardham AR, Duniec J** (1989) Characterizing adhesiveness of *Phytophthora cinnamomi* zoospores during encystment. *Protoplasma* **149**: 24–30
- Gus-Mayer S, Naton B, Hahlbrock K, Schmelzer E** (1998) Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8398–8403
- Halim VA, Altmann S, Ellinger D, Eschen-Lippold L, Miersch O, Scheel D, Rosahl S** (2009) PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant J* **57**: 230–242
- Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S** (2006) The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 307–313
- Halsall DM, Forrester RI** (1977) Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium, and iron ions. *Can J Microbiol* **23**: 994–1001
- Hamann T** (2012) Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front Plant Sci* **3**: 77
- Hamiduzzaman MM, Jakab G, Barnavon L, Neuhaus J-M, Mauch-Mani B** (2005) beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 819–829
- Hardham AR** (2005) *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Plant Pathol* **6**: 589–604
- Hardham AR** (1985) Studies on the cell surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*: The influence of fixation on patterns of lectin binding. *J Histochem Cytochem* **33**: 110–118
- Hardham AR** (2007) Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cell Microbiol* **9**: 31–39
- Hardham AR, Hyde GJ** (1997) Asexual sporulation in the oomycetes. *Advances in Botanical Research* **24**: 353–398
- Hardham AR, Takemoto D, White RG** (2008) Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biol* **8**: 63
- Higaki T, Goh T, Hayashi T, Kutsuna N, Kadota Y, Hasezawa S, Sano T, Kuchitsu K** (2007) Elicitor-Induced Cytoskeletal Rearrangement Relates to Vacuolar Dynamics and Execution of Cell Death: In Vivo Imaging of Hypersensitive Cell Death in Tobacco BY-2 Cells. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1414–1425
- Hok S, Danchin EGJ, Allasia V, Panabières F, Attard A, Keller H** (2011) An *Arabidopsis* (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease. *Plant Cell Environ* **34**: 1944–1957
- Horio T, Kawabata Y, Takayama T, Tahara S** (1992) A potent attractant of zoospores of *Aphanomyces cochlioides* isolated from its host, *Spinacia oleracea*. *Experientia* **48**: 410–414
- Hu L, Wang D, Liu L, Chen J, Xue Y, Shi Z** (2013) Ca<sup>2+</sup> Efflux Is Involved in Cinnamaldehyde-Induced Growth Inhibition of *Phytophthora capsici*. *PLoS ONE* **8**: e76264
- Huibers RP, de Jong M, Dekter RW, van den Ackerveken G** (2009) Disease-specific expression of host genes during downy mildew infection of *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1104–1115
- Irving HR, Griffith JM, Grant BR** (1984) Calcium efflux associated with encystment of *Phytophthora palmivora* zoospores. *Cell Calcium* **5**: 487–500



## Revue bibliographique

- Jackson SL, Hardham AR** (1996) A transient rise in cytoplasmic free calcium is required to induce cytokinesis in zoosporangia of *Phytophthora cinnamomi*. *Eur J Cell Biol* **69**: 180–188
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Jones SW, Donaldson SP, Deacon JW** (1991) Behaviour of zoospores and zoospore cysts in relation to root infection by *Pythium aphanidermatum*. *New Phytol* **117**: 289–301
- Judelson HS, Blanco FA** (2005) The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nat Rev Microbiol* **3**: 47–58
- Judelson HS, Roberts S** (2002) Novel Protein Kinase Induced during Sporangial Cleavage in the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Eukaryotic Cell* **1**: 687–695
- Judelson HS, Tani S, Narayan RD** (2009) Metabolic adaptation of *Phytophthora infestans* during growth on leaves, tubers and artificial media. *Mol Plant Pathol* **10**: 843–855
- Jupe J, Stam R, Howden AJM, Morris JA, Zhang R, Hedley PE, Huitema E** (2013) *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biol* **14**: R63
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, et al** (2014) The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **16**: 413–434
- Kamoun S, Huitema E, Vleeshouwers V** (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci* **4**: 196–200
- Kamoun S, Klucher KM, Coffey MD, Tyler BM** (1993) A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 573–581
- Katsura K, Masago H, Miyata Y** (1966) Movements of zoospores of *Phytophthora capsici*. I. Electrotaxis in some organic solutions. **32**: 215–220
- Kebdani N, Pieuchot L, Deleury E, Panabieres F, Le Berre J-Y, Gourgues M** (2010) Cellular and molecular characterization of *Phytophthora parasitica* appressorium-mediated penetration. *New Phytol* **185**: 248–257
- Khew KL, Zentmyer GA** (1973) Chemotactic response of zoospores of five species of *Phytophthora*. **63**: 1511–1517
- Kiefer B, Riemann M, Büche C, Kassemeyer H-H, Nick P** (2002) The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* **215**: 387–393
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert J-M, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B** (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Pathology* **124**: 1027–1038
- Koch E, Slusarenko A** (1990) *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* **2**: 437–445
- Koh S, André A, Edwards H, Ehrhardt D, Somerville S** (2005) *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *Plant J* **44**: 516–529
- Kong P, Moorman GW, Lea-Cox JD, Ross DS, Richardson PA, Hong C** (2009) Zoospore tolerance to pH stress and its implications for *Phytophthora* species in aquatic ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4307–4314
- Kortekamp A** (2005) Staining methods for the investigation of *Plasmopara viticola* and its infection structures in semi-thin sections. *Vitis* **44**: 45–47
- Kunkel BN, Brooks DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 325–331
- Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, et al** (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature* **451**: 835–840
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251–275
- Latijnhouwers M, Ligterink W, Vleeshouwers VGAA, van West P, Govers F** (2003) A *Ga* subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiol* **51**: 925–936
- Latijnhouwers M, Munnik T, Govers F** (2002) Phospholipase D in *Phytophthora infestans* and Its Role in Zoospore Encystment. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 939–946
- Lebeda A, Sedlářová M, Petřivalský M** (2008) Diversity of defence mechanisms in plant–oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. *Eur J Plant Pathol* **122**: 71–89
- Lee S-J, Rose JKC** (2010) Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant Signal Behav* **5**: 769–772
- Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J** (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746–785
- Longman D, Callow JA** (1987) Specific saccharide residues are involved in the recognition of plant root surfaces by zoospores of *Pythium aphanidermatum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **30**: 139–159

- Lu Y-J, Schornack S, Spallek T, Geldner N, Chory J, Schellmann S, Schumacher K, Kamoun S, Robatzek S** (2012) Patterns of plant subcellular responses to successful oomycete infections reveal differences in host cell reprogramming and endocytic trafficking. *Cell Microbiol* **14**: 682–697
- Ludewig F, Flügge U-I** (2013) Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front Plant Sci* **4**: 231
- Luis P, Gauthier A, Trouvelot S, Poinssot B, Frettinger P** (2013) Identification of *Plasmopara viticola* genes potentially involved in pathogenesis on grapevine suggests new similarities between oomycetes and true fungi. *Phytopathology* **103**: 1035–1044
- Malacarne G, Vrhovsek U, Zulini L, Cestaro A, Stefanini M, Mattivi F, Delledonne M, Velasco R, Moser C** (2011) Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol* **11**: 114
- María Laxalt A, Latijnhouwers M, van Hulten M, Govers F** (2002) Differential expression of G protein alpha and beta subunit genes during development of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol* **36**: 137–146
- Martínez-Prada I, Kortekamp A** (2015) Effect of sterol biosynthesis inhibitors and azole-type inducers on growth and development of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Vitis* **54**: 91–96
- Meijer HJG, van de Vondervoort PJI, Yin QY, de Koster CG, Klis FM, Govers F, de Groot PWJ** (2006) Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1348–1358
- Meyer D, Pajonk S, Micali C, O'Connell R, Schulze-Lefert P** (2009) Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *Plant J* **57**: 986–999
- Mikes V, Milat M-L, Ponchet M, Ricci P, Blein J-P** (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett* **416**: 190–192
- Mikès V, Milat ML, Ponchet M, Panabieres F, Ricci P, Blein JP** (1998) Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 133–139
- Miller AL, Gow N** (1989) Correlation between profile of ion-current circulation and root development. *Physiol Plant* **75**: 102–108
- Miller AL, Smith GN, Raven JA, Gow N** (1991) Ion currents and the nitrogen status of roots of *Hordeum vulgare* and non-nodulated *Trifolium repens*. *Plant Cell Environ* **14**: 559–567
- Mims CW, Richardson EA** (2003) Ultrastructure of the zoosporangia of *Albugo ipomoeae-panduratae* as revealed by conventional chemical fixation and high pressure freezing followed by freeze substitution. *Mycologia* **95**: 1–10
- Mitchell HJ, Hardham AR** (1999) Characterisation of the water expulsion vacuole in *Phytophthora nicotianae* zoospores. *Protoplasma* **206**: 118–130
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 19613–19618
- Mohr PG, Cahill DM** (2001) Relative roles of glyceollin, lignin and the hypersensitive response and the influence of ABA in compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora sojae*. *Physiol Mol Plant Pathol* **58**: 31–41
- Morris BM, Gow N** (1993) Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* **83**: 877–882
- Morris PF, Ward E** (1992) Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. *Physiol Mol Plant Pathol* **40**: 17–22
- O'Connell RJ, Panstruga R** (2006) Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol* **171**: 699–718
- Parker JE, Szabo V, Staskawicz BJ, Lister C** (1993) Phenotypic characterization and molecular mapping of the Arabidopsis thaliana locus RPP5, determining disease resistance to *Peronospora parasitica*. *Plant J* **4**: 821–831
- Perrone ST, McDonald KL, Sutherland MW, Guest DI** (2003) Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. *Physiol Mol Plant Pathol* **62**: 127–135
- Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H** (2004) Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43**: 145–148
- Polesani M, Bortesi L, Ferrarini A, Zamboni A, Fasoli M, Zadra C, Lovato A, Pezzotti M, Delledonne M, Polverari A** (2010) General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC genomics* **11**: 117
- Polkowska-Kowalczyk L, Maciejewska U** (2001) The oxidative processes induced in cell suspensions of *Solanum* species by culture filtrate of *Phytophthora infestans*. *Z Naturforsch, C, J Biosci* **56**: 235–244

## Revue bibliographique

- Raftoyannis Y, Dick MW** (2006) Zoospore encystment and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species on plant roots. *Microbiol Res* **161**: 1–8
- Rathore KS, Goldsworthy A** (1985) Electrical control of growth in plant tissue cultures. *Nat Biotech* **3**: 253–254
- Reiss K, Kirchner E, Gijzen M, Zocher G, Löffelhardt B, Nürnberger T, Stehle T, Brunner F** (2011) Structural and phylogenetic analyses of the GP42 transglutaminase from *Phytophthora sojae* reveal an evolutionary relationship between oomycetes and marine *Vibrio* bacteria. *J Biol Chem* **286**: 42585–42593
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC** (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* **183**: 555–563
- Ricci P, Trentin F, Bonnet P, Venard P** (1992) Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathology* **41**: 298–307
- Riemann M, Büche C, Kassemeyer HH, Nick P** (2002) Cytoskeletal responses during early development of the downy mildew of grapevine (*Plasmopara viticola*). *Protoplasma* **219**: 13–22
- Robold AV, Hardham AR** (2005) During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Curr Genet* **47**: 307–315
- Roitsch T** (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 198–206
- Savchenko T, Walley JW, Chehab EW, Xiao Y, Kaspi R, Pye MF, Mohamed ME, Lazarus CM, Bostock RM, Dehesh K** (2010) Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *Plant Cell* **22**: 3193–3205
- Scharte J, Schön H, Weis E** (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ* **28**: 1421–1435
- Schlaeppli K, Abou-Mansour E, Buchala A, Mauch F** (2010) Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *Plant J* **62**: 840–851
- Schlink K** (2010) Down-regulation of defense genes and resource allocation into infected roots as factors for compatibility between *Fagus sylvatica* and *Phytophthora citricola*. *Functional & integrative genomics* **10**: 253–264
- Schnee S, Viret O, Gindro K** (2008) Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiol Mol Plant Pathol* **72**: 128–133
- Sedlářová M, Luhová L, Petřivalský M, Lebeda A** (2007) Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiol Biochem* **45**: 607–616
- Shetty NP, Jørgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB, Shetty HS** (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol* **121**: 267–280
- Shiu SH, Bleeker AB** (2003) Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Pathology* **132**: 530–543
- Shreaz S, Sheikh RA, Bhatia R, Neelofar K, Imran S, Hashmi AA, Manzoor N, Basir SF, Khan LA** (2011) Antifungal activity of  $\alpha$ -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. *Biometals* **24**: 923–933
- Silvar C, Merino F, Díaz J** (2008) Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J Plant Physiol* **165**: 1120–1124
- Sing VO, Bartnicki-Garcia S** (1975a) Adhesion of *Phytophthora palmivora* zoospores: electron microscopy of cell attachment and cyst wall fibril formation. *J Cell Sci* **18**: 123–132
- Sing VO, Bartnicki-Garcia S** (1975b) Adhesion of *Phytophthora palmivora* zoospores: detection and ultrastructural visualization of concanavalin A-receptor sites appearing during encystment. *J Cell Sci* **19**: 11–20
- Soylu S** (2004) Ultrastructural characterisation of the host-pathogen interface in white blister-infected *Arabidopsis* leaves. *Mycopathologia* **158**: 457–464
- Spring O, Haas K** (2004) Eicosapentaenoic acid, a possible marker for downy mildew contamination in sunflower seeds. *Advances in Downy Mildew Research—Volume 2*
- Stassen JHM, van den Ackerveken G** (2011) How do oomycete effectors interfere with plant life? *Curr Opin Plant Biol* **14**: 407–414
- Steinbrener AD, Goritschnig S, Staskawicz BJ** (2015) *Arabidopsis* NLR Receptor to an Oomycete Effector Protein. *PLoS Pathogens* **11**: e1004665
- Stuttman J, Hubberten H-M, Rietz S, Kaur J, Muskett P, Guerois R, Bednarek P, Hoefgen R, Parker JE** (2011) Perturbation of *Arabidopsis* amino acid metabolism causes incompatibility with the adapted biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Cell* **23**: 2788–2803

## Revue bibliographique

- Sugimoto T, Watanabe K, Yoshida S, Aino M** (2008) Select calcium compounds reduce the severity of *Phytophthora* stem rot of soybean. *Plant Dis* **92**: 1559–1565
- Takayama T, Mizutani J, Tahara S** (1998) Drop Method as a Quantitative Bioassay Method of Chemotaxis of *Aphanomyces cochlioides* Zoospore. *Ann Phytopathol Soc Japan* **64**: 175–178
- Takemoto D, Jones DA, Hardham AR** (2003) GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular reorganization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycete pathogens. *Plant J* **33**: 775–792
- Tang X, Rolfe SA, Scholes JD** (1996) The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **19**: 967–975
- Toffolatti SL, Venturini G, Maffi D, Vercesi A** (2012) Phenotypic and histochemical traits of the interaction between *Plasmopara viticola* and resistant or susceptible grapevine varieties. *BMC Plant Biol* **12**: 1–16
- Toko K, Fujiyoshi T, Tanaka C, Iiyama S, Yoshida T** (1989) Growth and electric current loops in plants. *Biophys Chem* **33**: 161–176
- Tör M, Lotze MT, Holton N** (2009) Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J Exp Bot* **60**: 3645–3654
- Troutman JL, Wills WH** (1964) Electrotaxis of *Phytophthora parasitica* zoospores and its possible role in infection of tobacco by the fungus. **54**: 225–228
- Trouvelot S, Varnier A-L, Allègre M, Mercier L, Baillieu F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert J-M, Pugin A, et al** (2008) A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 232–243
- Tucker RP** (2004) The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 969–974
- Tucker SL, Talbot NJ** (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 385–417
- Tyler BM** (2002) Molecular basis of recognition between *phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 137–167
- Tyler BM, Wu M, Wang J, Cheung W, Morris PF** (1996) Chemotactic Preferences and Strain Variation in the Response of *Phytophthora sojae* Zoospores to Host Isoflavones. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2811–2817
- Unger S, Büche C, Boso S, Kassemeyer H-H** (2007) The Course of Colonization of Two Different *Vitis* Genotypes by *Plasmopara viticola* Indicates Compatible and Incompatible Host-Pathogen Interactions. *Phytopathology* **97**: 780–786
- van Damme M, Zeilmaker T, Elberse J, Andel A, de Sain-van der Velden M, van den Ackerveken G** (2009) Downy mildew resistance in *Arabidopsis* by mutation of HOMOSERINE KINASE. *Plant Cell* **21**: 2179–2189
- van West P, Morris BM, Reid B, Appiah AA, Osborne MC, Campbell TA, Shepherd SJ** (2002) Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 790–798
- Vleeshouwers VG, van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT** (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: 853–864
- Walker CA, van West P** (2007) Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* **21**: 10–18
- Wang Y, Li A, Wang X, Zhang X, Zhao W, Dou D, Zheng X, Wang Y** (2010) GPR11, a putative seven-transmembrane G protein-coupled receptor, controls zoospore development and virulence of *Phytophthora sojae*. *Eukaryotic Cell* **9**: 242–250
- Warburton A, Deacon J** (1998) Transmembrane Ca<sup>2+</sup> fluxes associated with zoospore encystment and cyst germination by the phytopathogen *phytophthora parasitica*. *Fungal Genet Biol* **25**: 54–62
- Wawra S, Belmonte R, Löbach L, Saraiva M, Willems A, van West P** (2012) Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Current Opinion in Microbiology* **15**: 685–691
- Weste G** (1983) *Phytophthora cinnamomi*: the dynamics of chlamydospore formation and survival. *J Phytopathol* **106**: 163–176
- Whipps JM, Cooke RC** (1978) Comparative physiology of *Albugo tragopogonis*-infected and *Puccinia Lagenophorae*-infected plants of *Senecio squalidus* L. *New Phytol* **81**: 307–319
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, et al** (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**: 115–118
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM** (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* **7**: 1357–1368
- Yu S-M, Lo S-F, Ho T-HD** (2015) Source–Sink Communication: Regulated by Hormone, Nutrient, and Stress Cross-Signaling. *Trends Plant Sci* **20**: 844–857

## Revue bibliographique

**Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760

**Zipfel C, Robatzek S** (2010) Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant Pathology* **154**: 551–554

**Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**: 764–767

**Zuluaga AP, Vega-Arreguín JC, Fei Z, Matas AJ, Patev S, Fry WE, Rose JKC** (2015) Analysis of the tomato leaf transcriptome during successive hemibiotrophic stages of a compatible interaction with the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol* **17**: 42–54

## *Objectifs de la thèse*

---



# Objectifs de la thèse

---

## 1. Contexte

### 1.1 *La viticulture en France*

La vigne (*Vitis vinifera*) est une culture historique en France comme en Europe et les vins sont indissociables des traditions, des terroirs et de l'économie française. Présente sur 80 départements et 16 grands vignobles, la vigne constitue une contribution significative à la richesse nationale. En effet, bien que ne constituant que 3% des surfaces agricoles françaises, la viticulture représente 15% de la valeur de la production agricole. La France est le premier exportateur de vin au monde, avec un chiffre d'affaires à l'export de 7,6 milliards d'euros en 2013. Cependant, la viticulture représente également 20% des fongicides consommés, faisant de la France le premier utilisateur de pesticides en Europe, avec 35000 tonnes de substances actives vendues en 2011 (<http://ww.franceagrimer.fr>).

### 1.2 *Plasmopara viticola, agent pathogène de la vigne*

Les fongicides sont notamment utilisés pour combattre la propagation du mildiou. *Plasmopara viticola*, l'agent pathogène de cette maladie, a été introduit accidentellement en Europe en 1878, probablement lors de l'importation de porte-greffes américains résistants au phylloxera (Viennot-Bourgin, 1949). La maladie s'est ensuite rapidement propagée dans toute l'Europe.

*P. viticola* est un parasite biotrophe obligatoire appartenant aux oomycètes. En raison de leur mode de vie, tels que la croissance apicale des hyphes ou l'organotrophie et l'absence de pigments photosynthétiques, les oomycètes ont été longtemps considérés comme des organismes de type champignon. Ces parasites sont pourtant phylogénétiquement plus proches des algues brunes. *P. viticola*, comme les oomycètes du genre *Phytophthora*, *Peronospora*, *Bremia* et *Albugo*, appartient à l'ordre des Péronosporales (Kamoun, 2003). Contrairement à la plupart des oomycètes de genre *Phytophthora* qui sont des hémibiotrophes à large gamme



## Objectifs de la thèse

d'hôte, les parasites du genre *Plasmopara*, *Peronospora* et *Hyaloperonospora* sont des agents pathogènes biotrophes qui présentent une gamme d'hôtes très restreintes (Beakes et al., 2012). Ainsi, *P. viticola* infecte uniquement les tissus herbacés de la vigne (feuilles, vrilles et bourgeons, fleurs, baies vertes) et provoque des défoliations ainsi que le brunissement et l'assèchement des baies et des tiges. Les premiers symptômes d'une attaque de mildiou dans un vignoble sont l'apparition de taches jaunes grossissant sur la face adaxiale des feuilles ainsi qu'une sporulation duveteuse sur la face abaxiale.

*P. viticola* est un agent pathogène hétérothallique diploïde (Wong et al., 2001). Son cycle de vie se compose d'une phase sexuée et d'une phase asexuée (Fig.1). La phase sexuée conduit à la production de spores sexuées ou oospores qui permettent au pathogène de passer l'hiver protégé du froid (Galet, 1977). Au début du printemps, lorsque l'humidité augmente et que la température s'élève au dessus de 11°C, les oospores latentes dans le sol produisent un tube germinatif à travers lequel le noyau de l'oospore migre pour donner un seul macrophage terminal, puis des zoospores flagellées se forment par divisions mitotiques et sont relâchées. Ces zoospores sont responsables des infections primaires (Spencer, 1981).

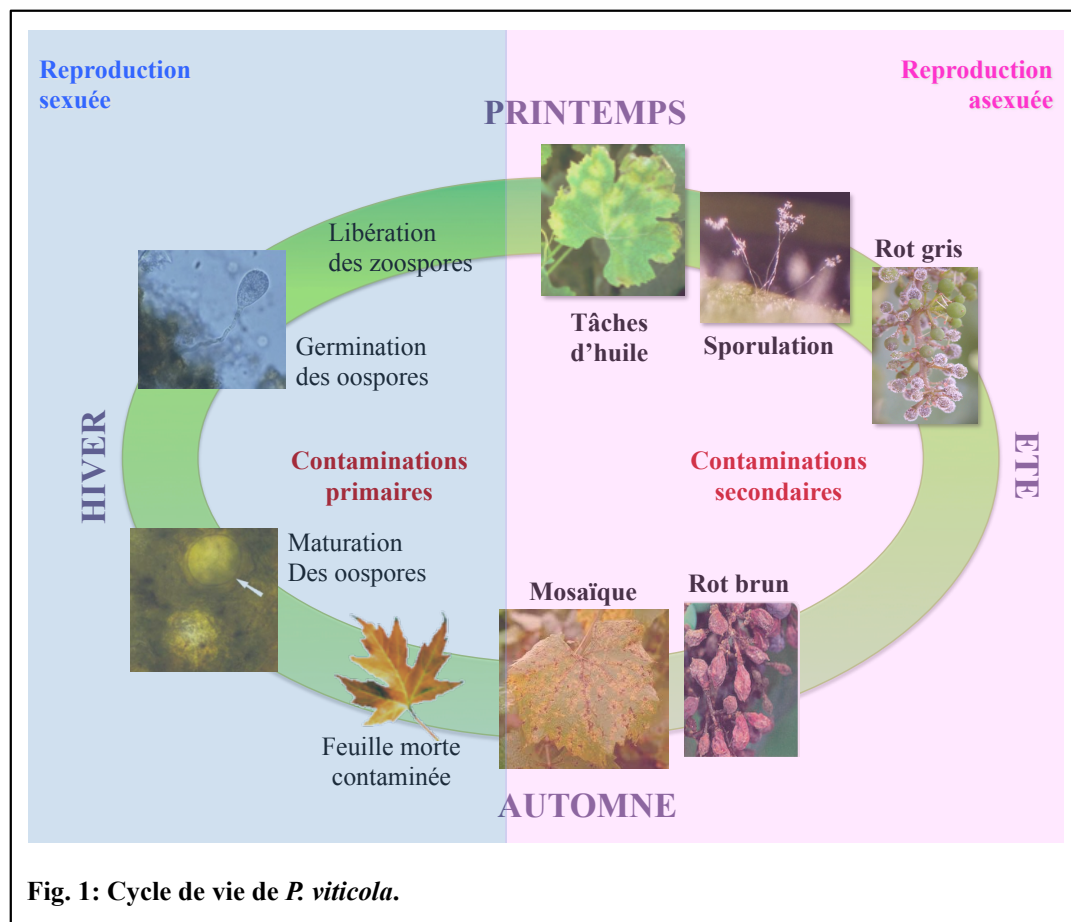
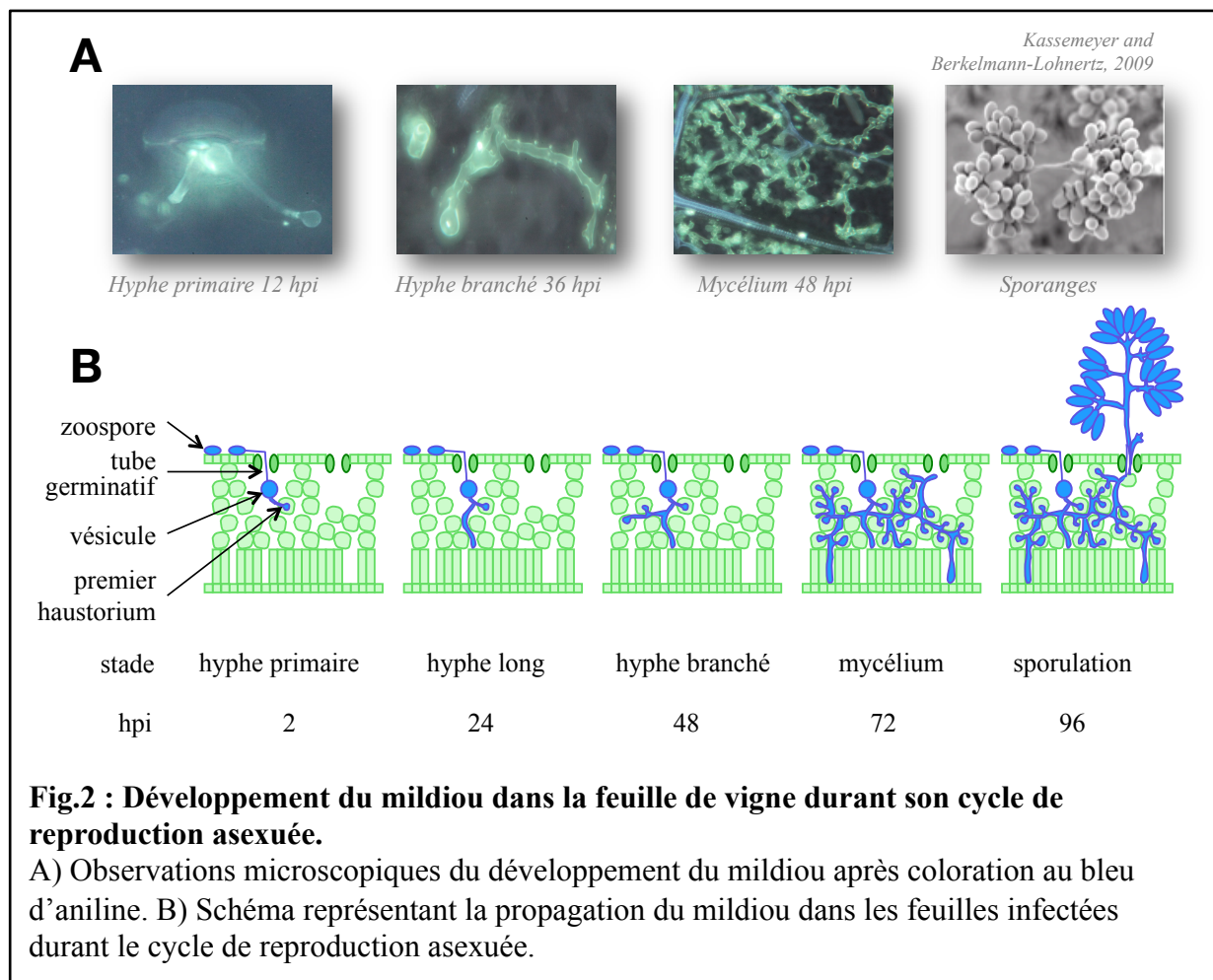


Fig. 1: Cycle de vie de *P. viticola*.

## Objectifs de la thèse

Les zoospores libérées sont attirées vers les stomates des feuilles de vignes, perdent leurs flagelles, s'enkystent, et produisent un tube germinatif qui pénètre dans la feuille par le stomate. Dans la chambre sous-stomatique, le tube gonfle et devient une vésicule de laquelle émerge un hyphe primaire. L'hyphe grandit dans le mésophylle de la feuille, se branche et produit des structures singulières spécifiques des pathogènes biotrophes, appelées haustoria (Latijnhouwers et al., 2003). Ces organes correspondent à une interface entre la vigne et le pathogène et permettent l'absorption des nutriments nécessaires du pathogène, ainsi que l'échange d'effecteurs.

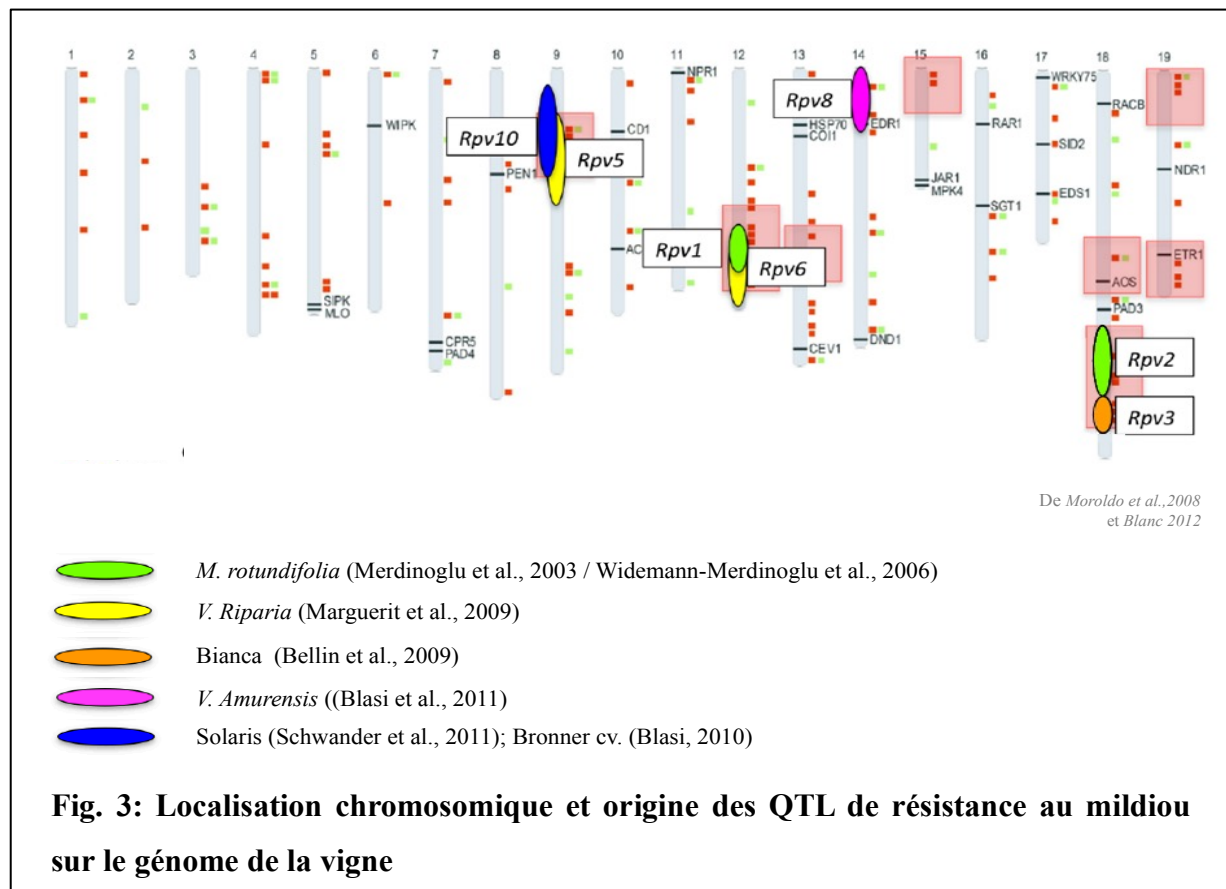


### 1.3 Les facteurs de résistance au mildiou

La sensibilité des vignes au mildiou dépend chaque année de l'interaction de plusieurs variables plus ou moins favorables au pathogène, telles que le climat ou l'état physiologique de

la plante. Dans des conditions climatiques favorables pour la maladie, le mildiou peut entraîner jusqu'à 75% de pertes de récolte (Agrios 1997).

Bien que l'espèce européenne de vigne *Vitis vinifera* qui produit la majorité des vins de qualité soit très sensible à cette maladie, plusieurs espèces du genre *Vitis* d'origines américaine et asiatique sont résistantes au mildiou. Quelques facteurs de résistance issus d'espèces de *Vitis* ou d'hybrides interspécifiques ont été identifiés, parmi lesquels *Rpv1* (Merdinoglu et al., 2003), *Rpv2* (Wiedemann-Merdinoglu et al., 2006), *Rpv3* (Bellin et al., 2009), *Rpv5* et *Rpv6* (Marguerit et al., 2009), *Rpv8* (Blasi et al., 2011) et *Rpv10* (Schwander et al., 2012) (Fig. 3).



Les facteurs de résistance *Rpv1* et *Rpv2* ont été identifiés chez des hybrides *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon et *M. rotundifolia* cv. Trayshed (Merdinoglu et al., 2003; Wiedemann-Merdinoglu et al., 2006). *Rpv2* est le seul facteur identifié conférant une résistance totale dans un fond génétique sensible (Di Gaspero et al., 2007). Un autre facteur de résistance au mildiou appelé *Rpv3* a été identifié par Bellin et al. (2009) dans l'hybride Bianca. Cette variété a été produite par croisement de la variété « Villard Blanc », un hybride ayant des ancêtres nord-américains résistants, et la variété sensible « Bouvier » (Casagrande et al., 2011). Ce facteur

## Objectifs de la thèse

situé sur le groupe de liaison 18 confère une résistance partielle de haut niveau et explique 74,6% de la variance phénotypique pour la densité des sporangiophores. Ce locus chevauche celui identifié pour la résistance des feuilles et des baies de l'hybride Regent (Fisher et al., 2004 ; Welter et al., 2007). La position imprécise du facteur *Rpv3* selon les différentes années d'observation et son large intervalle de confiance ont conduit les auteurs à supposer que plusieurs gènes fonctionnels pourraient résider dans le locus *Rpv3*.

*Rpv5* et *Rpv6* ont été mis en évidence dans l'espèce *V. riparia* cv. Gloire de Montpellier, à partir du croisement entre *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon et *V. riparia*. 2 facteurs de résistance ont été détectés sur les groupes de liaison 1 et 8 de la carte réalisée par Marino et al. (2003). Ces groupes de liaison correspondent aux groupes 12 et 4 de la nomenclature internationale (Grando et al., 2003; Adam-Blondon et al., 2004). Etant donné que la carte de Marino et al. (2009) a été construite avec des marqueurs AFLP absents sur les autres cartes génétiques, Marguerit et al. (2009) n'ont pu confirmer que les facteurs détectés dans leur étude se trouvaient au même endroit que ceux de Marino et al. (2003).

En 2011, Blasi et al. (2011) ont localisé le facteur de résistance *Rpv8* au mildiou à partir de *V. amurensis*. Ce facteur est situé sur le groupe de liaison 14 et a été identifié dans la descendance d'une autofécondation de *V. amurensis* cv. Ruprecht. Il explique 86,3% de la variance phénotypique globale, soit 100% de la variance génétique en considérant l'héritabilité estimée à 86,2% (Blasi et al., 2011).

Le facteur *Rpv10* a été identifié dans le cultivar Bronner (Blasi et al., 2010). Bronner est une variété de vigne cultivée issue du croisement entre deux espèces américaines *V. rupestris* et *V. lincecumii*, de l'espèce asiatique *V. amurensis* et de variété *V. vinifera*. La résistance de Bronner est partielle mais de haut niveau. Le facteur *Rpv10* est localisé sur le groupe de liaison 9, et son intervalle de confiance colocalise avec le facteur identifié dans le cultivar « Solaris », hybride entre les variétés américaines et européennes *V. amurensis* et *V. vinifera* (Schwander et al., 2012). La localisation du facteur *Rpv10* chevauche également celle du facteur *Rpv5* mis en évidence par Marguerit et al. (2009) chez *V. riparia*.

Plusieurs facteurs de résistance mineurs ont aussi été identifiés, bien que leur implication dans les mécanismes de résistance soit faible, ces facteurs renforcent la capacité des variétés de vigne à résister au mildiou. 2 facteurs de résistance mineurs ont été mis en évidence dans la variété Regent. Le premier est localisé sur le groupe de liaison 5 (Adam-Blondon et al., 2004), le second a été identifié au niveau du groupe de liaison 4 et explique 22,6% des variations de résistance (Welter et al., 2007). Bianca possède également un facteur de résistance mineur sur le groupe de liaison 7 (Bellin et al., 2009) et explique jusqu'à 12,1% de la variance

phénotypique pour la variation de la densité des sporangiophores. Enfin, un facteur mineur a été mis en évidence sur le groupe de liaison 19 dans la variété Bronner (Blasi et al., 2010).

### 1.4 Contrôle du développement du mildiou

Les principaux moyens de lutte contre le mildiou reposent sur l'utilisation massive de fongicides. La pression sanitaire est donc particulièrement forte. L'Indicateur de Fréquence des Traitements (IFT) moyen de la vigne est de 13 alors qu'il est en moyenne de 3,8 en grandes cultures (2 pour le tournesol, 4 pour le blé, jusqu'à 16 pour la pomme de terre) (Butault et al., 2010). Ces produits sanitaires ont donc un coût élevé mais également des effets très dommageables sur l'environnement et la santé humaine. Le plan Ecophyto 2018, une des mesures proposées en France par le Grenelle de l'environnement fin 2007 et reprise ensuite par le PNSE2 (second Plan National Santé Environnement en 2009), a pour mission de réduire et sécuriser l'utilisation des produits sanitaires. L'un des objectifs est de diviser par deux l'usage de pesticides avant 2018. Cependant cette formulation est imprécise, car elle n'indique pas s'il s'agit de tonnage, de matière active, de toxicité, etc. De plus, l'émergence d'isolats de mildiou résistants aux fongicides diminue l'efficacité de leur utilisation (Gisi et al. 2007, Gisi et al. 2002, Chen et al. 2007) (Fig. 4). La recherche de méthodes de luttés alternatives contre les maladies devient nécessaire.

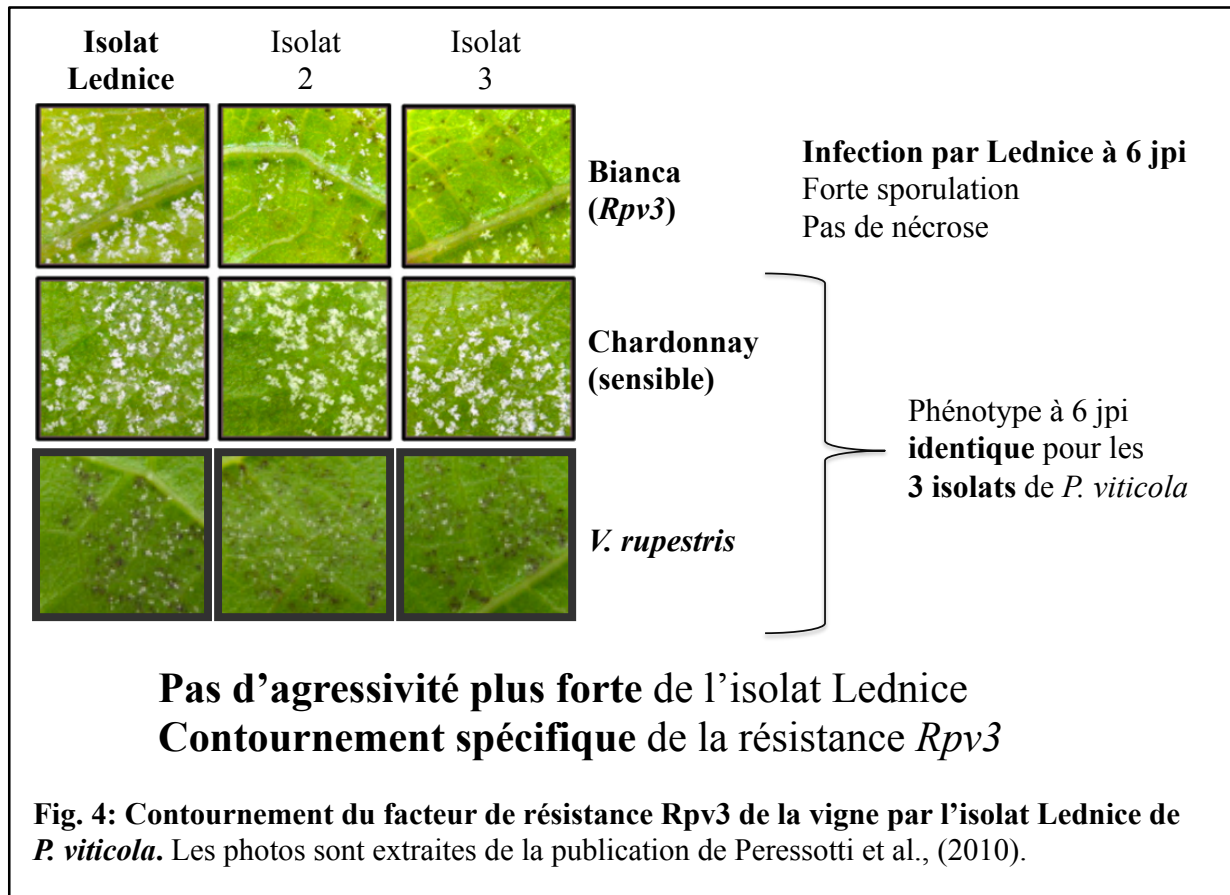
Dans le but de contrôler le développement du mildiou, de nombreux travaux de recherche au sein de l'INRA ont été orientés vers la création de nouvelles variétés de vignes résistantes. Ces travaux s'appuient en partie sur l'introggression de gènes de résistance issus de variétés sauvages résistantes dans les variétés cultivées sensibles.

La durabilité des résistances introduites est l'une des préoccupations majeure lors de la création de variétés résistantes. Plusieurs variétés résistantes ont été déployées en Europe de l'Est, incluant l'hybride Bianca, sélectionné dans les années 60, qui a hérité du gène majeur de résistance *Rpv3* de ses ancêtres nord-américains (Bellin et al., 2009). Bien que la pression de sélection liée à l'utilisation de variétés résistantes est encore très limitée en Europe, la découverte de l'isolat Lednice de *P. viticola* virulent face à la résistance de Bianca, constitue le premier signalement d'un contournement d'une résistance au mildiou de la vigne et démontre que ce risque est bien réel (Peressotti et al., 2010).

Outre son efficacité, un critère important pour qualifier une résistance est donc sa durabilité. Une résistance est dite durable « lorsqu'elle reste efficace dans une variété cultivée sur de grandes surfaces, pendant une longue période de temps, et dans des conditions

## Objectifs de la thèse

favorables au développement de la maladie » (Johnson, 1981). Bien qu'il s'agisse d'un jugement rétrospectif, il est maintenant bien établi que l'association de plusieurs facteurs de résistance, appelée pyramidage, permet d'augmenter très sensiblement le potentiel de durabilité de la résistance, alors que les gènes majeurs utilisés seuls dans un fond génétique sensible sont facilement contournés (Palloix et al, 2009; Brun et al, 2010).



## 2. Objectifs de la thèse de la thèse

L'émergence de ce nouvel isolat virulent montre l'importance de pyramider plusieurs facteurs de résistance pour construire des variétés de vignes durablement résistantes au mildiou (Bellin *et al.*, 2009 ; Peressotti *et al.*, 2010). La connaissance des relations entre la vigne et *P. viticola* et des mécanismes mis en jeu dans l'interaction permet, en outre, d'affiner le choix des gènes à associer. Le pathosystème Bianca/*P. viticola* offre l'avantage d'étudier les relations vigne-mildiou en situation compatible et incompatible sur un matériel végétal identique. Il évite ainsi les principaux écueils de ce type d'analyse, où les effets dus aux facteurs étudiés, ici, la nature compatible ou incompatible de l'interaction plante-pathogène, peuvent être confondus

## Objectifs de la thèse

avec ceux dus à la variation du fond génétique. En effet, les études précédentes menées sur cette question consistaient à la confrontation d'un isolat de *P. viticola* à différents génotypes de vigne sensibles ou résistants (Polesani *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2009; Polesani *et al.*, 2010).

Dans ce projet, nous proposons d'utiliser ce pathosystème original, basé sur la variété Bianca en situation compatible, inoculée avec l'isolat Lednice et incompatible, inoculée avec l'isolat Colmar, pour obtenir une image globale de l'impact sur la vigne de l'infection par *P. viticola*. Les travaux menés au cours de ma thèse ont visé à combiner différentes méthodes globales pour caractériser la physiopathologie de la vigne infectée par *P. plasmopara*.

Les principales tâches du projet sont les suivantes:

- a - Infection contrôlée de Bianca avec les souches compatible et incompatible de *P. viticola*
- b - Analyse cytologique de l'infection.
- c - Analyses métabolomiques par LC-MS, RMN et enzymologie à haut débit.
- d - Analyse des données, identification des métabolites importants en conditions compatible et incompatible.

La méthode d'évaluation du niveau de résistance de la vigne au mildiou utilisée en routine au laboratoire est basée sur la quantification de la sporulation du pathogène en fin d'infection. Cette quantification est effectuée par comptage des spores émises ou par analyse d'images (Peressotti *et al.*, 2011). Au cours de nos expérimentations, nous avons réalisé que ces méthodes ne rendaient pas parfaitement compte du développement de l'infection, car elles ne permettent d'obtenir qu'une quantification finale sans tenir compte des aspects cinétiques du développement du pathogène. De plus, les observations microscopiques ont suggéré que l'intensité de la sporulation n'était peut-être pas absolument proportionnelle au développement du pathogène dans les tissus foliaires, en particulier lorsqu'il s'agit de comparer différentes souches de *P. viticola*. Aussi, nous avons décidé de développer des méthodes complémentaires permettant de quantifier la biomasse du pathogène à n'importe quel moment du cycle d'infection. Ces méthodes sont basées sur la quantification de séquences géniques de *P. viticola* par PCR quantitative, mais également sur la quantification de métabolites spécifiques de *P. viticola* identifiés au cours de ce travail. La thèse sera donc constituée de trois chapitres intitulés :

- I. Identification de marqueurs lipidiques de l'infection de la vigne par *Plasmopara viticola*
- II. Analyse qualitative et quantitative de l'infection de la vigne par *Plasmopara viticola*

## Objectifs de la thèse

### III. Analyse métabolomique de l'interaction entre la vigne et *Plasmopara viticola* en conditions compatible et incompatible

Le premier chapitre est rédigé sous la forme d'un manuscrit d'article intitulé "Identification of lipid markers of *Plasmopara viticola* infection in grapevine using a non-targeted metabolomic approach", qui sera soumis très prochainement pour publication.





## *Matériel et méthodes*

---



# Matériel et méthodes

---

## 1. Matériel

### 1.1 *Vitis vinifera*

Les plants de vignes sont cultivés dans des godets de 630 ml, remplis d'un terreau composé de perlite, de tourbe blonde et de sphaigne (Steckmedium, KLASMANN). Ce substrat de bouturage est aéré, drainant et possède une bonne réserve hydrique, il favorise aussi l'enracinement tout en limitant les risques de maladie. Les vignes sont cultivées en serre, sous éclairage naturel.

### 1.2 *Isolats de Plasmopara viticola*

Deux isolats de *P. viticola* ont été utilisés pour ce travail. L'isolat Colmar a été collecté sur un plant de *V. vinifera* cv Chardonnay à l'INRA de Colmar (France). L'isolat Lednice a été collecté sur un plan de vigne de la variété Bianca, à la station expérimentale de Lednice (République Tchèque).

### 1.3 *Préparation de l'inoculum de mildiou*

La face abaxiale de feuilles de plants sensible de Muscat Ottonel âgés de 2 mois est pulvérisée avec une suspension de sporanges ( $10^5$  sporanges / mL dans de l'eau stérile) de l'isolat Colmar ou Lednice. Les plantes inoculées sont ensuite stockées dans une chambre de culture à 21°C avec 16 heures de lumière par jour. 7 jours après l'inoculation, les feuilles sporulantes sont soigneusement coupées et lavées dans de l'eau ultrapure pour collecter les sporanges.

### 1.4 *Inoculation des feuilles de vignes par P. viticola*

Les boutures vertes des variétés de vigne sélectionnées (*V. vinifera* cv Syrah,

## Matériel et méthodes

*V. vinifera* cv Bianca, *V. vinifera* cv Johanniter, *V. vinifera* cv Regent *V. riparia*) sont cultivées en serre durant 3,5 mois. La sixième feuille, comptée à partir de l'apex des plantes est lavée à l'eau déminéralisée. Les feuilles sont inoculées par flottaison pendant 5 heures, avec la surface abaxiale tournée vers une suspension de sporanges de *P. viticola*. L'inoculum est à concentration saturante de  $10^5$  sporanges / mL. Après inoculation, les feuilles sont transférées dans des plateaux sur un papier humide, la face abaxiale tournée vers le haut. Les plateaux sont fermés hermétiquement par des sacs plastiques transparents et stockés dans une chambre de culture à 21°C, avec 16 heures de lumières par jour. Au cours de l'infection, des disques foliaires de 1,5 cm de diamètres sont prélevés et pesés. Les disques foliaires prélevés pour les analyses métabolomiques et les analyses qPCR sont congelés directement dans de l'azote liquide et conservés à -80%. Les disques pour analyse en microscopie sont prélevés et conservés à -20°C.



## 2. Méthodes

### 2.1 Observations microscopiques

#### 2.1.1 Matériel

Les observations cytologiques et histologiques ont été effectuées à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence (DiaplanLeitz à lampe à mercure, excitation à 340 nm et filtre barrière à 380 nm). Un appareil photo Nikon EOS50 relié à un ordinateur permet la prise des photos. Les photos ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel ImajeJ.

Les observations cytologiques ont été effectuées sur des feuilles infectées des variétés Bianca, Syrah, Johanniter et Regent. Pour chacun des deux isolats étudiés, trois feuilles de chaque variété ont été infectées. Trois disques foliaires de 1,5 cm de diamètre ont été prélevés sur les feuilles Bianca, deux sur les feuilles des autres variétés, au temps de cinétique 12 hpi. Un des disques prélevés par feuille de la variété Bianca a été coloré au Blankophor. Les deux autres ont été colorés au bleu d'aniline. Deux disques foliaires ont été prélevés sur chaque feuille infectée au temps 24, 36, 48 hpi, puis colorés au bleu d'aniline.

### **2.1.2 Colorations histologiques**

#### **2.1.2.1 Coloration au DAPI de l'ADN d'une suspension de sporanges**

Afin d'estimer le nombre moyen de zoospores contenu dans les sporanges des isolats Lednice et Colmar de *P. viticola*, des suspensions de sporanges de chaque isolat ont été colorées au DAPI. Le DAPI est une molécule fluorescente qui se lie fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN. Le DAPI absorbe la lumière UV (350 nm) et émet une fluorescence bleue (450-490 nm).

Une solution mère de DAPI à 0,2 mg / mL est préparée dans de l'eau distillée et conservée à 4°C. La solution de coloration a été obtenue par dilution à 0.1% de la solution mère dans du tampon McIlvaine (pH7). 5 mL d'inoculum ( $10^5$  sporanges / mL) est centrifugé à 13500g pendant 20 minutes. Le surnageant est retiré, et le culot obtenu est remis en suspension dans 2 mL de solution de coloration puis conservé à l'abri de la lumière. 30 minutes après la coloration, une goutte d'inoculum coloré est montée sur lame de verre et les noyaux contenus dans les sporanges sont observés grâce à un microscope à épi-fluorescence. 300 sporanges ont été observés pour les deux isolats de mildiou.

#### **2.1.2.2 Coloration au Blankophor des parois de zoospores enkystés**

La quantification des spores des isolats Colmar et Lednice enkystés au niveau des stomates a été effectuée à partir de disques foliaires de Bianca colorés au Blankophor. Le Blankophor se lie aux polysaccharides de la paroi des zoospores et émet une couleur bleue (420 nm) après excitation sous UV. Le nombre de spores enkystées a été évalué sur cent stomates par disques foliaires. Une solution mère de Blankophor (4,44'-bis(4-phényl-1,2,3-triazol-5-yl)-2,2'-disulfonate-disodium) à 1‰ (v/v) a été préparée dans de l'eau distillée. La solution de coloration a été obtenue par dilution à 5% de la solution mère dans de l'eau distillée. 3 feuilles Bianca inoculées par l'isolat Colmar et Lednice sont prélevées à 12 hpi. Les disques foliaires ont été recouverts par 2 mL de la solution de coloration, montés sur lame de verre et laissés 2 minutes à température ambiante avant observation au microscope à épi-fluorescence.

#### **2.1.2.3 Coloration au bleu d'aniline**

L'analyse du développement des isolats Lednice et Colmar a été effectué sur des disques foliaires infectés provenant des variétés Bianca, Johanniter, Regent et Syrah, prélevés à 12, 24, 36 et 48 hpi. Les disques ont été colorés au bleu d'aniline. Ce colorant se lie au  $\beta$ -glucans de la paroi du mycélium. Après excitation par lumière UV, il émet une lumière bleue (455 nm).

Les disques foliaires sont fixés dans 1 mL de méthanol durant la nuit, à température ambiante. Les disques sont ensuite transférés dans un nouvel eppendorf rempli d'1mL d'hydrate de chloral (2,5g / mL) et clarifiés pendant 8 heures à température ambiante. L'hydrate de chloral est prélevé à l'aide d'une pastette. Les disques foliaires sont rincés 2 fois dans du tampon phosphate (pH 8), pendant au moins 10 minutes. Enfin, les échantillons sont colorés durant une nuit à l'abri de la lumière dans une solution de bleu d'aniline solubilisé dans du tampon phosphate à 0,5 mg / mL. Les disques sont montés entre lame et lamelle dans une goutte de colorant, et observé en microscopie à fluorescence. Ils se conservent au réfrigérateur, à l'abri de la lumière.

## 2.2 *Quantification de la biomasse du mildiou*

### 2.2.1 *Matériel*

La quantification de la biomasse de mildiou a été effectuée sur trois feuilles infectées par l'isolat Colmar et trois feuilles non-infectées des variétés Bianca, Syrah et Riparia. 4 disques ont été prélevés avant inoculation pour être analysés par LC-MS et qPCR. Les feuilles ont ensuite été prélevées à 24, 48, et 72 hpi. 5 disques ont été prélevés par temps de cinétiques : 2 pour suivre l'infection en microscope à epi-fluorescence, deux disques poolés pour l'analyse qPCR, et enfin un disque pour analyse en LC-MS. Enfin, un disque a été prélevé par feuille à 6 jpi pour quantifier la sporulation du mildiou.

### 2.2.2 *Estimation de la concentration des suspensions de sporanges*

La quantification de la sporulation de *P. viticola* en fin de cycle infectieux et l'estimation de la concentration des inocula ont été effectuées à l'aide d'une lame de Malassez. La totalité de la cellule de Malassez est composée de 100 rectangles. Le volume total de la cellule est de 1 mm<sup>3</sup>. Les sporanges sont comptés dans 10 rectangles non-contigus pris au hasard sur la cellule. Le volume d'un rectangle étant de 0,01 µL. Il suffit ensuite de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre de cellule par mL. Les sporanges sont détachés par lavage des feuilles dans 1,5 mL d'eau stérile. Les glissières latérales de la lame sont humidifiées avant d'y déposer la lamelle. L'extrémité de la pipette est placée contre la lamelle, et la solution à quantifier est délivrée par capillarité. Les spores sont comptées sous la loupe binoculaire.

### 2.2.3 Quantification du mildiou par analyse qPCR

#### 2.2.3.1 Extraction de l'ADN de feuilles de vignes et de suspension de sporanges

L'ADN de disques foliaires prélevés sur des variétés Syrah, Bianca et V. riparia ont été extraits à l'aide du Kit d'extraction Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit. Les disques foliaires ont été broyés dans l'azote liquide pendant 30 secondes à 30Hz. Du PVP a été ajouté au tampon de d'extraction fourni avec le kit (10mg de PVP30 par échantillon) : le PVP absorbe particulièrement bien les polyphénols et permet donc d'obtenir en fin d'extraction des ADN présentant une bonne pureté avec de meilleurs rendements. Pour l'extraction d'ADN de *P. viticola*, une suspensions de sporanges a été centrifugée à 13500g pendant 20 minutes, le surnageant a été retiré, et l'ADN du culot obtenu a été extrait à l'aide du Kit d'extraction Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit.

#### 2.2.3.2 Dessin des amorces qPCR spécifiques à *P. viticola* et *V. vinifera*

Les amorces ont été conçues en utilisant le logiciel Beacon designer. Les données de séquences de *V. vinifera* ont été obtenues sur le site genoscope. Les séquences de *P. viticola* ont été obtenues auprès de Pere Mestre (INRA, Colmar).

Gène	Amorce	Amorce sens	Amorce antisens
Actine	Actin- <i>P. viticola</i>	ACTTCTTTTCCGCCTCTTCCT	CCCGACGATCGAGGGAAAC
Facteur d'initiation de traduction	IF2/IF5- <i>P. viticola</i>	GTCGGAGAGTCACTTAGCGT	TACTTGGCCACCTGGTTGTTC
Facteur d'initiation de traduction	eIF1a- <i>P. viticola</i>	GCCCTTGACAACCTGAACGC	GTGGTAACCATAACCGGGCTT
Cytochrome B	CytoB- <i>P. viticola</i>	TGATGGCGACTGCATTTATGG	TCAACGGCGAATCCACCC
Cyclo-oxygenase	Cox2- <i>P. viticola</i>	TGTTCCGGAAAGTGATTTAGCA	TTCCCAATGAAGGTATCGCCC
Actine	Actin- <i>V. vinifera</i>	CCAGAAGTCCTCTTCCAGCC	GGTTGACCCACCACTAAGCA
Facteur d'initiation de traduction	EiF4G- <i>V. vinifera</i>	TGTGTTGAGGAGCTGAAATC	AAATCCCTAGCAGCAAAAC
Facteur d'initiation de traduction	eIF1a- <i>V. vinifera</i>	ATTGCTGTTCGTGACATGCG	CTTCTCTGTTGAGCTCCATT



### 2.2.3.3 Amplification PCR

Les amorces produites ont été testées en PCR sur une extraction d'ADN de sporanges, de feuilles non infectés et de feuilles infectées. La réaction PCR se déroule dans le milieu réactionnel suivant :

Milieu réactionnel	concentration
<b>Taq polymérase (Taq Core Kit, MP Biomedicals)</b>	1,5U
<b>Tampon PCR 1 X</b>	1
<b>dNTP</b>	200 $\mu$ M
<b>Primer sens</b>	0,5 mM
<b>Primer anti-sens</b>	0,5 mM
<b>Matrice :</b>	10ng. $\mu$ l <sup>-1</sup>
<b>H<sub>2</sub>O qsp 20 <math>\mu</math>l</b>	

Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes :

Phase du cycle PCR	durée	température
<b>Dénaturation</b>	2 minutes	94°C
<b>Dénaturation</b>	30 secondes	94°C
<b>Hybridation</b>	30 secondes	60°C
<b>Elongation</b>	45 secondes	72°C
<b>Dénaturation</b>	10 minutes	72°C

Les amplicons sont ensuite envoyés pour séquençage (Genoscreen).

### 2.2.3.4 PCR quantitative

La PCR en temps réel repose sur la détection de la fluorescence émise par un fluorophore lié à l'ADN, au cours de chaque cycle d'amplification. Le fluorophore utilisé est le SybrGreen, capable de se lier à l'ADN et d'émettre une fluorescence uniquement lorsqu'il est intégré dans l'ADN double brin de façon aspécifique. Au cours de la phase exponentielle de la PCR, la fluorescence sera directement proportionnelle à la quantité d'amplicons formés, mais aussi à la quantité de matrice initiale. Le système optique couplé au thermocycleur iCycler System (Biorad) permet de détecter à chaque cycle d'amplification la fluorescence du SybrGreen. Les données de fluorescence sont transmises au logiciel MyIQ (Biorad) qui détermine un cycle «

## Matériel et méthodes

seuil », Cq, pour lequel le signal fluorescent émis est supérieur au bruit de fond. Le Ct sera donc d'autant plus faible que la quantité de matrice cible initiale sera élevée.

Dans chaque puit ont été déposés 2,5 µL d'ADN dilués à 10ng / µL, 12,5 µl de SybrGreen Supermix (Biorad) et 200 nM de chaque amorce, pour un volume final de 20 µl. Chaque réaction a été réalisée en duplicat. Pour chaque plaque, un témoin sans matrice a été déposé.

Pour établir la gamme étalon de chaque fragment cible, celui-ci a été amplifié par PCR puis dosé par spectrophotométrie (Nanodrop). Le nombre de chaque nucléotide a permis d'établir la masse molaire de l'amplicon ainsi que la concentration de l'amplicon en nombre de copies / µL. La gamme étalon a enfin été ajustée par dilution en cascade au 1/10<sup>ème</sup> pour déposer de 10<sup>8</sup> à 10<sup>2</sup> copies. La pente de la droite établie grâce à la gamme étalon a permis de vérifier l'efficacité de la PCR : Efficacité (E) = 10<sup>-1/pente</sup>.

Le programme du thermocycleur est le suivant :

Phase du cycle qpcr	Durée	Température
<b>Dénaturation initiale</b>	30 secondes	95 °C
<b>Dénaturation</b>	5 secondes	95 °C
<b>Hybridation</b>	60 secondes	60 °C
<b>Elongation</b>	77 secondes	77 °C
<b>Acquisition de la fluorescence</b>	10 secondes	77 °C
<b>Courbe de fusion</b>	pas de 0,5 °C toutes les 5secondes	55 °C à 95 °C

L'expression de chaque gène d'intérêt (gene of interest: GOI) a été normalisée par rapport au gène codant pour le facteur d'initiation de la traduction de vigne (*eIF4G*). Le taux d'expression relatif de chaque GOI a été calculé entre les conditions inoculées et les plantes au temps 0 de l'expérience. Le calcul tient compte de l'efficacité (E) de PCR qui peut varier d'un gène à l'autre.

$$\text{Taux expression relatif} = \frac{(1 + E_{GOI})^{\Delta Ct(\text{Eau} - \text{inoculé})}}{(1 + E_{V\text{ACT}})^{\Delta Ct(\text{Eau} - \text{inoculé})}}$$

Où E : Efficacité de la PCR ;  $\Delta C_q$  : Différence entre le cycle seuil pour la condition témoin (ex : eau) et le cycle seuil pour l'autre condition (ex : inoculé).

### 2.3 Analyses métabolomiques

#### 2.3.1 Analyse LC-MS

##### 2.3.1.1 Système d'analyse des métabolites

Les analyses ont été réalisées sur un système de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) Dionex Ultimate 3000, équipé d'une colonne Nucleodur C18 HTec (Macherey-Nagel, 150 mm x 2 mm diamètre interne, particules de 1,8  $\mu\text{m}$  de diamètre) maintenue à 30 °C. Les éluants utilisés sont les suivants : eau / acide formique (0,1 %, v/v ; éluant A) et acétonitrile / acide formique (0,1 %, v/v; éluant B) ; le débit est maintenu à 0,25 mL / minute. Le programme de séparation utilisé est le suivant : 80% d'éluant A dans les conditions initiales, 80% à 70% d'éluant A en 4 minutes, 70% à 50% d'éluant A en 1 minute, 1.5 minutes en isocratique à 50% d'éluant A, 50% à 1% d'éluant A en 2 minutes et enfin isocratique avec 1% d'éluant A pendant 1.5 minutes. Le volume d'échantillon injecté est de 1  $\mu\text{l}$ .

Le système chromatographique est couplé à un spectromètre de masse haute résolution Exactive (Thermo Fischer Scientific, San Jose, USA) équipé d'une source à ionisation électrospray opérant en mode positif ou négatif. Les paramètres du spectromètre sont fixés à 300°C pour la température du capillaire de transfert des ions et 2500 V pour le voltage de l'aiguille de nébulisation. Les débits d'azote du gaz de nébulisation (sheath gas) et du gaz auxiliaire (auxiliary gas) sont maintenus à 50 et 5 (en unités arbitraires) respectivement. Les spectres sont enregistrés sur la gamme de masse m/z entre 100 to 1200 unité de masse atomique (u.m.a.), en utilisant une résolution de 50 000 à m/z 200 u.m.a. Le système est calibré dans la gamme m/z 100-2000 u.m.a. en utilisant les calibrants Thermo Fisher, donnant une précision en masse inférieure à 2 ppm. Les instruments sont contrôlés par le logiciel Xcalibur et les données sont traitées par les logiciels Xcalibur (analyses ciblée) et XCMS (analyse non ciblée).

Le spectromètre de masse Exactive (Thermo Fischer) possède un analyseur de masse Orbitrap™ permettant une analyse qualitative et quantitative de tous les métabolites présents dans un échantillon complexe (méthode « full scan »), de masses comprises entre 100 et 1 200

## Matériel et méthodes

m/z dans notre cas, avec une excellente sensibilité, et une très haute résolution. La figure ci-dessous schématise les différentes parties qui composent le spectromètre de masse. Les métabolites provenant de l'UHPLC ou injectés directement dans le spectromètre de masse par infusion, sont ionisés par une source d'ionisation électrospray (ESI : electro spray ionisation source). La cellule C-Trap permet de rediriger le flux d'ions soit vers la cellule HCD qui permet de fragmenter les ions (utilisation pour la détermination de structure), soit vers la cellule Orbitrap™. La cellule Orbitrap™ est une électrode creuse à l'intérieur de laquelle est placée une électrode en fuseau, cette cellule permet de piéger les ions par une force électrostatique. Les ions qui pénètrent dans la cellule Orbitrap™ entament un mouvement oscillato-rotatoire autour de l'électrode. Ce mouvement est détecté et analysée par la cellule Orbitrap™ et permet une mesure de m/z très précise (de 1 à 2 ppm) et une excellente résolution (env. 100 000). Ce spectromètre permet également de réaliser des cycles avec différentes polarités (changement de polarité réalisé en moins d'une seconde), ce qui permet par exemple de quantifier au cours d'une même analyse le resvératrol (mode négatif) et le ptérostilbène (mode positif)



Figure 1: Chaîne de chromatographie liquide UHPLC Dionex Ultimate 3000 (à droite sur la photo) couplée au spectromètre de masse Thermo Exactive (à gauche sur la photo).

### ***2.3.1.2 Extraction des disques foliaires de vignes***

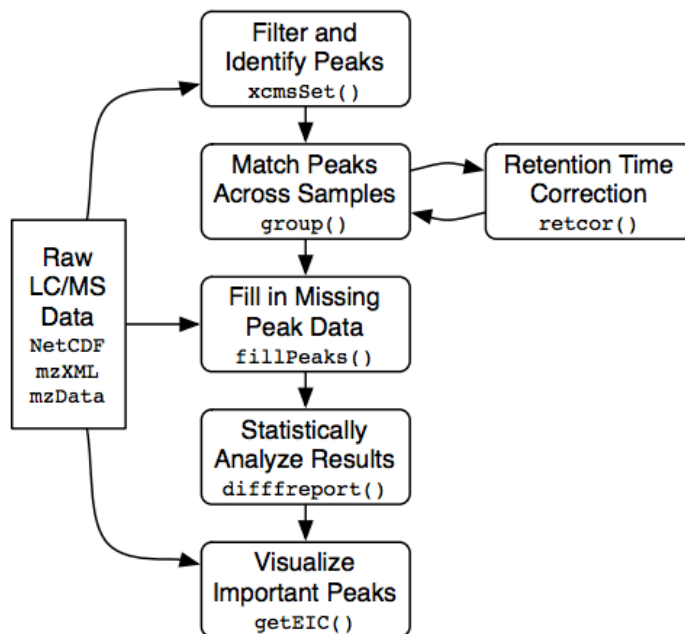
Les disques foliaires ont été préalablement déshydratés, pesés et broyés. Les extractions sont réalisées à 60 °C durant 45 minutes dans du méthanol pur. Le volume de méthanol ajouté aux échantillons pour extraction est de 15µl.mg<sup>-1</sup> de poids sec.

Après incubation, le mélange est centrifugé 20 minutes à 15 000 rpm puis le surnageant est prélevé avant d'être placé une nuit à -20 °C (cette phase de repos permet aux débris cellulaires restants de sédimenter). Le lendemain, ce mélange est re-centrifugé 20 minutes à

15 000 rpm, puis le surnageant clair est placé dans des tubes en verre adaptés aux injecteurs automatiques (vials contenant des inserts).

### 2.3.1.3 Analyse des données LC-MS.

Les données LC-MS analysées en ciblé ont été traitées par le logiciel Xcalibur (processing setup, QuanBrowser). Un fichier excel est généré à la suite du réalignement des pics. Un test de Student a ensuite permis de sélectionner les molécules présentant une différence significative entre les conditions étudiées (p-value <0,05).



Para ille, les Fig 2. : Diagramme montrant un aperçu du pré-traitement effectué par Xcms, les

## Matériel et méthodes

temps de rétention observés entre les groupes sont réalignés (`retcor()`). Les pics manquants sont identifiés par l'argument `fillpeak()`. Une analyse statistique des données obtenues est effectuée sur un groupe d'échantillons pré-définis. Un fichier de données excel est généré par R.

```
2 myDir = "C:\\Users\\Thermo\\Desktop\\LISE\\Nouvelle analyse Bianca"
3
4 myClass1 = "NI-0-hpi"
5 myClass2 = "NI-12-hpi"
6 myClass3 = "NI-24-hpi"
7 myClass4 = "NI-48-hpi"
8 myClass5 = "NI-72-hpi"
9 myClass6 = "col-12-hpi"
10 myClass7 = "col-24-hpi"
11 myClass8 = "col-48-hpi"
12 myClass9 = "col-72-hpi"
13 myClass10 = "led-12-hpi"
14 myClass11 = "led-24-hpi"
15 myClass12 = "led-48-hpi"
16 myClass13 = "led-72-hpi"
17
18
19
20 myResultDir = "myResults"
21
22
23 ### change working directory to your files, see +++ section
24 setwd(myDir)
25
26 rm### get working directory
27 wd <- getwd()
28
29 ### load the xcms package
30 library(xcms)
31 library(snow)
32
33 ### finds peaks in NetCDF
34
35 xset <- xcmsSet(method="centwave", ppm=2, noise=50000, mzdiff=0.0005, prefilter=c(5,15000), snthresh=6, peakwidth=c(6,35)) #, scanrange=c(f,g), fitgauss=x)
36
37 save(xset, file="C:\\Users\\Thermo\\Desktop\\LISE\\Nouvelle analyse Bianca\\save1")
38 load("C:\\Users\\Thermo\\Desktop\\LISE\\Nouvelle analyse Bianca\\save1")
39
40 ### print used files and memory usage
41 xset
42
43 ### Group peaks together across samples
44 ### Syntax: group(object, bw = 30, minfrac = 0.5, minsamp = 1, mzwid = 0.025, max = 5, sleep = 0)
45 xset <- group.density(xset)
46
47 ### calculate retention time deviations for every time
48 xset2 <- retcor(xset, method="obiwarp")
49
50 ### Group peaks together across samples, set bandwidth, change important m/z parameters here
51 ### Syntax: group(object, bw = 30, minfrac = 0.5, minsamp = 1, mzwid = 0.025, max = 5, sleep = 0)
52
53 xset2 <- group.density(xset2, bw =10, mzwid = 0.0025)
54
55 ### identify peak groups and integrate samples
56 xset3 <- fillPeaks(xset2)
57
58 save(xset3, file="C:\\Users\\Thermo\\Desktop\\LISE\\Nouvelle analyse Bianca\\save2")
59 load("C:\\Users\\Thermo\\Desktop\\LISE\\Nouvelle analyse Bianca\\save2")
60
61 ### print statistics
62 xset3
63
64 #source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
65 #biocLite("multtest")
66
67 ### create report and save the result in EXCEL file, print 20 important peaks as PNG
68 reporttab <- diffreport(xset3, myClass6, myClass10, myResultDir, eicmax=1500)
69
70 ### print file names
71 # dir(path = ".", pattern = NULL, all.files = FALSE, full.names = FALSE, recursive = FALSE)
72 xlsfile=read.table(paste(myDir, "/", myResultDir, ".tsv", sep=""), header=TRUE, sep="\t")
73 write.table(xlsfile, paste(myDir, "/", myResultDir, ".xls", sep=""), col.names=TRUE, row.names=FALSE, quote=FALSE,
74 sep="\t", dec=".")
75 ### output were done!
76 print("Finished, open by yourself the file myAlign.tsv and pictures in myAlign_eic")
77
```

Fig 3. : Script d'analyse du package Xcms sur R

Les données ont ensuite été traitées par une analyse ANOVA prenant en compte l'effet temps (T12, T24, T48, T72) et l'effet inoculation (NI, Lednice, Colmar), suivie d'une analyse Tukey pour déterminer précisément l'effet des variables.

## Matériel et méthodes

```
2 #Importation du fichier
3 #AnovaRep1<-read.xls("ANOVA.xls")
4 AnovaRep1<-read.csv("C:/Users/msv_1s/Desktop/Fichier_R_bianca2013.csv",sep=";", dec=".", header=T)
5 nb_col<-ncol(AnovaRep1)
6 summary(AnovaRep1[,1:10])
7
8 #Anova et test de Tukey metabo par metabo
9
10 a1 <- aov(AnovaRep1[,4]-AnovaRep1[,2]~AnovaRep1[,3])
11 posthoc <- TukeyHSD(x=a1, conf.level=0.95)
12
13
14 #Fichier des résultats pour tous les metabo
15 Pvalue<-data.frame(EIC=NA, Pval_Led12h_col12h=NA, Pval_Led24h_col12h=NA, Pval_Led48h_col12h=NA, Pval_Led72h_col12h=NA, Pval_NI12h_col12h=NA,
16 Pval_NI24h_col12h=NA, Pval_NI48h_col12h=NA, Pval_NI72h_col12h=NA, Pval_Led12h_NI24h=NA, Pval_Led24h_NI24h=NA, Pval_Led48h_NI24h=NA, Pval_Led72h_NI24h=NA)
17
18 #Boucle pour les résultats des anovas
19 for (i in 4:nb_col)
20 {
21
22 Pvalue[i,1]<-names(AnovaRep1)[i]
23 a1 <- aov(AnovaRep1[,i]-AnovaRep1[,2]~AnovaRep1[,3])
24 posthoc <- TukeyHSD(x=a1, conf.level=0.95)
25 Pvalue[i,2]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[40,4]
26 Pvalue[i,3]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[70,4]
27 Pvalue[i,4]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[91,4]
28 Pvalue[i,5]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[103,4]
29 Pvalue[i,6]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[41,4]
30 Pvalue[i,7]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[71,4]
31 Pvalue[i,8]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[92,4]
32 Pvalue[i,9]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[104,4]
33 Pvalue[i,10]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[51,4]
34 Pvalue[i,11]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[78,4]
35 Pvalue[i,12]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[96,4]
36 Pvalue[i,13]<-posthoc$`AnovaRep1[, 2]:AnovaRep1[, 3]`[105,4]
37 print(i)
38 print(names(AnovaRep1)[i])
39 }
40
41 #exporter le fichier sur le bureau
42 write.table(Pvalue,"C:/Users/msv_1s/Desktop/ANOVA_tukey_Lise.csv", sep=";", dec=".")
```

Fig 4. : Script de l'ANOVA suivi par un test de Tukey sur R

Les analyses effectuées sur ce pool de données ont été représentées par des heatmaps.

```
4 #load package #
5 library(vegan)
6 library(rcolorBrewer)
7 library(heatmap.plus)
8 library("ggplots", character.only=TRUE)
9 library(Heatplus)
10
11 #récupérer le fichier#
12 Heatmap2<-read.table("C:/Users/msv_1s/Desktop/ANOVA_tukey_Lise2.csv", header = T, sep = ";", dec=".", row.name="EIC")
13
14
15 #voir la tête des données, s'assurer de leur caractère numérique#
16 summary(Heatmap2)
17 quantile(Heatmap2[,1], probs=seq(0,1,0.05))
18
19
20 #faire la heatmap POS
21 Graph_heatmap<-heatmap.2(as.matrix(Heatmap2), scale="none", Rowv=T, Colv=F, col=hmcols, sepwidth=c(0.05,0.05), sepcolor="white", symbreaks=F, trace="none",
22 colsep=c(4,8), key=T, cex.axis=0.75, cex.lab=0.5, cexRow=0.05, cexCol=0.75, margins=c(7,7), breaks=c(0.0000001,0.000001,0.00001,0.0001,0.001,0.05))
23
24
25 #faire la heatmap NEG
26
27 hmcols<-colorRampPalette(c("yellow", "darkgoldenrod1", "darkgoldenrod2", "darkgoldenrod3", "darkgoldenrod4", "black"))(6)
28
29 Graph_heatmap<-heatmap.2(as.matrix(Heatmap2), scale="none", Rowv=T, Colv=T, col="redgreen", symbreaks=F, trace="none", key=F,
30 breaks=c(0.898056, 7.1844538, 15.2669644, 63.9416391, 120.6988244, 151.232753, 294.203384, 1425.2160290), xlab="name", cexRow=0.5, margins=c(1,5))
31
32 #récupérer le nom des lignes dans l'ordre apres clustering et l'exporter en .csv
33 ordre_des_lignes<-rownames(Heatmap2)[Graph_heatmap$rowind]
34 write.table(ordre_des_lignes, file = "C:/Users/msv_1s/Desktop/ordre_des_lignes_Heatmap.csv")
```

Fig 5. : Script de création de heatmap sur R

### 2.3.1.4 Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire

#### 2.3.1.4.1 Préparation des échantillons

Pour un échantillon, 40 +/-1 mg de disques foliaires lyophilisés et broyés sous forme de poudre ont été extraits avec un mélange de solvants constitué de 750 µL MeOD, 750 µL de solution tampon "pH" 6.00 (D<sub>2</sub>O, 90 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 3 mM EDTA, Na<sub>2</sub> + KOD). Le milieu est passé au vortex 3 sec, puis aux ultra-sons 30 minutes, et enfin centrifugé (13 000

## Matériel et méthodes

rpm, 4°C, 10 minutes). 800 µL du surnageant ont été prélevés et transférés dans un tube RMN (5 mm BBI Bruker probe).

### 2.3.1.4.2 Appareillage et traitement des données

Les études de résonance magnétique nucléaire 1D ( $^1\text{H}$  RMN) ont été réalisées sur un appareil Bruker (Avance III 500 MHz), avec comme lock, le déplacement chimique de  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ Vigne). Les Pulse séquences utilisées en 1D sont : noesygppr1d.metabo, 128 scans, 12 minutes d'acquisition, T 300K. Les acquisitions ont été exécutées par Catherine Deborde.

Les données ont été traitées avec TopSpin (transformée de Fourier, phasage manuel) et avec NMRProcFlow. 256 buckets ou zones spectrales de tailles variables ont été définis. Les acquisitions et les traitements des données de RMN ont été réalisés par Catherine Deborde et Annick Moing. Les analyses statistiques multivariées ont été obtenues avec BioStatFlow <http://biostatflow.org>. Elles ont été effectuées par Catherine Deborde, Daniel Jacob et Annick Moing.

### 2.3.1.4.3 Principe de la RMN

La spectroscopie RMN est basé sur le phénomène RMN qui se produit lorsque des noyaux atomiques de spin non nuls, comme le  $^1\text{H}$ , sont placés dans un champ magnétique externe et qu'ils sont excités par un rayonnement radiofréquence accordé sur les différences d'énergie existantes entre les multiples états possibles du spin nucléaire.

Donc, quand une molécule est placée dans un champ magnétique externe, des champs magnétiques locaux sont alors créés par la circulation des électrons induite dans les orbitales moléculaires sous l'action du champ. Ces champs magnétiques locaux s'opposent, le plus souvent, au champ magnétique global. Le champ ainsi vraiment « ressenti » localement par les noyaux atomiques n'est donc plus exactement le champ appliqué, mais la somme du champ global et du champ magnétique créé par les électrons. Tous les électrons environnants étant différents (électrons délocalisés, liaisons chimiques fortement polarisées, électrons non appariés), ils vont influencer le champ ressenti par les noyaux (comme ici les  $^1\text{H}$ ) de manière spécifique pour chacun d'eux. La fréquence de résonance de chaque noyau étant affectée par ces différents environnements électroniques locaux, le déplacement chimique résultant et mesuré et les signaux correspondants sont spécifiques à chaque noyau.





*Chapitre I :*  
*Identification de marqueurs*  
*lipidiques de l'infection de la*  
*vigne par *Plasmopara viticola**

---



# CHAPITRE I : Identification de marqueurs lipidiques de l'infection de la vigne par *Plasmopara viticola*

---

## 1. Introduction

La méthode d'évaluation du niveau de résistance de la vigne au mildiou utilisée en routine au laboratoire est basée sur la quantification de la sporulation du pathogène en fin d'infection. Cette quantification est effectuée par comptage des spores émises ou par analyse d'image de disque foliaires inoculés (Peressotti *et al.*, 2011). Au cours de nos expérimentations, nous avons réalisé que ces méthodes ne rendaient pas parfaitement compte du développement de l'infection. En effet, les méthodes de quantification finale ne permettent pas d'appréhender les aspects cinétiques du développement du pathogène. De plus, les observations microscopiques ont suggéré que l'intensité de la sporulation n'était peut-être pas absolument proportionnelle au développement du pathogène dans les tissus foliaires, en particulier lorsqu'il s'agit de comparer différentes souches de *P. viticola*. Les analyses métabolomiques non ciblées en chromatographie liquide à haute performance en couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (UHPLC-HRMS) offrent la possibilité d'obtenir une image globale des métabolites présents dans l'échantillon. L'analyse comparative de feuilles de vigne infectées ou non par le mildiou offre donc la possibilité de rechercher des métabolites spécifiques de *P. viticola*, susceptibles d'être utilisés pour le développement de méthodes alternatives de suivi de l'infection. La caractérisation de tels métabolites spécifiques pourrait en effet permettre un suivi dynamique du développement du pathogène, basé sur la quantification de ces molécules au cours de la progression de l'infection. C'est cette perspective qui a motivé le travail présenté dans ce chapitre sous la forme d'un manuscrit intitulé "Identification of lipid markers of *Plasmopara viticola* infection in grapevine using a non-targeted metabolomic approach", qui sera soumis prochainement pour publication. Dans ce travail, j'ai réalisé la plupart des manipulations et des analyses, à l'exception de l'identification des molécules inconnues. Cette partie du travail, qui nécessite des connaissances poussées en chimie analytique et structurale, a été réalisée par Raymonde Baltenweck, responsable de la plateforme analytique UHPLC-HRMS.

## Identification of lipid markers of *Plasmopara viticola* infection in grapevine using a non-targeted metabolomic approach

Lise Negrel, David Halter, Sabine Wiedemann-Merdinoglu, Camille Rustenholz, Didier Merdinoglu, Philippe Hugueney, Raymonde Baltenweck

SVQV, INRA, Université de Strasbourg, 68000, Colmar, France

### **Footnotes:**

D.M. and P.H. conceived the original research plans and raised the funding. R.B. supervised the experiments; L.N. performed most of the experiments; D.H. and C.R. participated in data analysis; S.W.M supervised the experiments with downy mildew; L.N., P.H. and R.B. wrote the article with contributions of all the authors. This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). L.N. was supported by a doctoral fellowship from the "Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace", the "Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux" and the "Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne" and from the Région Alsace

Corresponding author: Raymonde Baltenweck; Email: raymonde.baltenweck@Colmar.inra.fr; Fax: 33-3-89224933

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the Journal policy described in the Instructions for Authors (<http://www.plantphysiol.org>) is Raymonde Baltenweck (raymonde.baltenweck@Colmar.inra.fr)

## ABSTRACT

The Oomycete *Plasmopara viticola* is responsible for downy mildew, which is one of the most damaging grapevine diseases. Due the strictly biotrophic way of life of *P. viticola*, its metabolome of is relatively poorly characterized. In this work, we have used a mass spectrometry-based non-targeted metabolomic approach to identify potential mildew-specific metabolites. This has led to the characterization and structural elucidation of compounds belonging to three families of atypical lipids, which are not detected in healthy grapevine tissues. These lipids include ceramides and derivatives of arachidonic and eicosapentaenoic acid, most of which had not been previously described in Oomycetes. Furthermore, we have shown that these lipids can be detected in *Plasmopara*-infected tissues at very early stages of the infection process. Therefore, the potential use of these specific lipids as markers to monitor the development of *P. viticola* is discussed.

## INTRODUCTION

*Plasmopara viticola* is an obligate biotrophic Oomycete responsible for downy mildew, which is one of the most damaging grapevine diseases. As downy mildew outbreaks may result in significant economic losses, control of the disease is most often achieved by fungicide treatments, whose impacts on environment and health raise more and more concerns. The relationships between grapevine and *P. viticola* have therefore been subjected to thorough investigations in order to better understand the infection process and to identify potential targets for alternative control strategies (Gessler *et al.*, 2011). Grapevine responses to downy mildew infection have been characterized in both compatible and incompatible situations, through the study of susceptible *Vitis vinifera* cultivars and resistant species such as *Vitis riparia*, *V. rupestris* or *Muscadinia rotundifolia*. Transcriptomic analyses have shown that downy mildew infection induces a strong and rapid transcriptional reprogramming in host tissues, including the induction of pathogenesis-related proteins and enzymes required for the synthesis of phenylpropanoid-derived compounds (Bostock *et al.*, 1981; Gandhi and Weete, 1991; Spring and Haas, 2002; Spring and Haas, 2004; Kortekamp, 2006; Polesani *et al.*, 2008; Polesani *et al.*, 2010; Savchenko *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Bostock *et al.*, 2011; Legay *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2015; Lenzi *et al.*, 2016). Similarly, metabolomic profiling experiments have revealed profound changes in grapevine tissues upon downy mildew infection, which

affect both the primary and the secondary metabolism (Figueiredo *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2009). One of the most prominent metabolic change is the biosynthesis of large amounts of stilbenic phytoalexins in both compatible and incompatible interactions (Pezet *et al.*, 2003; Alonso-Villaverde *et al.*, 2011), although specific patterns of stilbene accumulation could be associated with increased resistance to the pathogen (Malacarne *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2015).

Despite the fact that many experiments have been performed, metabolomic analyses of grapevine-downy mildew interactions have mostly resulted in the characterization of metabolites from grapevine, the metabolome of *P. viticola* being paradoxically relatively poorly characterized. This is probably partly due to the strictly biotrophic way of life of *P. viticola*, which thus cannot be obtained in pure culture, making the characterization of its metabolome difficult.

In this work, we have used a high-resolution mass spectrometry-based non-targeted metabolomic approach to characterize metabolites differentially accumulated in grapevine and in *P. viticola*. The rationale behind this strategy was to look for prominent ions present in *P. viticola* and absent in grapevine healthy tissues, which may be derived from *Plasmopara*-specific molecules. This has led to the characterization and structural elucidation of compounds belonging to 3 families of atypical lipids, which are not detected in healthy grapevine tissues. These lipids include ceramides and derivatives of arachidonic and eicosapentaenoic acid, most of which had not been previously described in Oomycetes. Furthermore, we have shown that these lipids can be detected in *Plasmopara*-infected tissues at very early stages of the infection process. Therefore, the potential use of these specific lipids as markers to monitor the development of *P. viticola* is discussed.

## RESULTS

### Characterization of *Plasmopara*-specific metabolites using non-targeted metabolomics

As an obligate biotrophic pathogen, *P. viticola* cannot be grown in pure culture. However, sporangia can easily be collected. To this end, cuttings of *V. vinifera* cv. Muscat Ottonel were first infected by spraying a suspension of sporangia of *P. viticola* ( $10^5$  sporangia.mL<sup>-1</sup>). Six days post-infection, fresh sporangia were collected by carefully washing infected leaves with ultrapure water. Sporangia were then recovered by centrifugation and the corresponding pellet was extracted by methanol-chloroform (MeOH/CHCl<sub>3</sub>). In parallel, uninfected leaves of *V. vinifera* cv. Muscat Ottonel were powdered and extracted with MeOH/CHCl<sub>3</sub>. Extracts corresponding to 3 samples of sporangia and 3 samples of uninfected grapevine leaves were analyzed using ultra high performance liquid chromatography coupled to

high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS). Processing the output using the XCMS software (Smith *et al.*, 2006) led to the identification of a first set of 2156 ions. This first data set was further refined by selecting ions of interest based on their peak area and fold change between sporangia and leaf extracts. This has led to the selection of a final set of 123 major ions (peak area > 10<sup>6</sup>), which are at least 15 times more abundant in sporangia extracts than in leaf extracts, based on XCMS automated integration (Table S1).

Submission of these 123 ions to the Metlin database (Smith *et al.*, 2005) led to the putative identification of two compounds of particular interest. Indeed, one of the proposed structures for compounds giving the ion n°10 (M303T44) with *m/z* 303.2316 was eicosapentaenoic acid (EPA). Similarly, n°12 (M305T48) with *m/z* 305.2473 and arachidonic acid (AA), respectively (Table 1). Both EPA and AA had previously been identified in mycelial extracts of *Phytophthora infestans*, another phytopathogenic Oomycete causing the late blight of potato (Bostock *et al.*, 1981). Commercial EPA and AA standards were therefore analyzed by UHPLC-HRMS using the same conditions as those used for *P. viticola* extracts. The retention times (RT) and fragment patterns of the standards were identical to those of M303T44 (n°10) and M305T48 (n°12), confirming their identities as EPA and AA, respectively.

Ion n°	name	fold	mzmed	rtmed	Ion formula	(Putative) identification
4	M359T39	53	359,2577	38,81		fragment EPA [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
<b>5</b>	<b>M377T39</b>	<b>220</b>	<b>377,2683</b>	<b>38,81</b>	<b>C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>eicosapentaenoyl-glycerol</b>
<b>8</b>	<b>M379T42</b>	<b>29</b>	<b>379,2839</b>	<b>41,59</b>	<b>C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>arachidonoyl-glycerol</b>
<b>10</b>	<b>M303T44</b>	<b>347</b>	<b>303,2316</b>	<b>43,87</b>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>EPA</b>
<b>12</b>	<b>M305T48</b>	<b>68</b>	<b>305,2474</b>	<b>47,97</b>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>AA</b>
13	M281T50	16	281,2473	50,26	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<i>C<sub>18:2</sub> acid</i>
<b>16</b>	<b>M661T85</b>	<b>38</b>	<b>661,4825</b>	<b>84,66</b>		<b>dieicosapentaenoyl-glycerol</b>
<b>19</b>	<b>M492T96</b>	<b>Inf</b>	<b>492,4773</b>	<b>96,14</b>	<b>C<sub>32</sub>H<sub>64</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>Cer(d16:1/16:0)</b>
<b>30</b>	<b>M666T124</b>	<b>48</b>	<b>665,5134</b>	<b>123,80</b>	<b>C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>diarachidonoyl-glycerol</b>
<b>33</b>	<b>M236T125</b>	<b>173</b>	<b>236,2371</b>	<b>125,15</b>		<i>fragment N</i>
<b>34</b>	<b>M254T125</b>	<b>29</b>	<b>254,2477</b>	<b>125,15</b>		<i>fragment N'</i>
<b>37</b>	<b>M521T125</b>	<b>14665</b>	<b>520,5084</b>	<b>125,15</b>		<i>fragment [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
<b>42</b>	<b>M356T126</b>	<b>128</b>	<b>356,3156</b>	<b>125,61</b>		<i>fragment C</i>
<b>43</b>	<b>M284T126</b>	<b>22</b>	<b>284,2945</b>	<b>126,06</b>		<i>fragment A</i>
46	<b>M642T142</b>	<b>144</b>	<b>641,51342</b>	<b>141,805</b>	<b>C<sub>41</sub>H<sub>69</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>diglyceride 20:5/18:1</b>
<b>66</b>	<b>M236T165</b>	<b>272</b>	<b>236,2371</b>	<b>164,83</b>		<i>fragment N</i>
<b>67</b>	<b>M254T165</b>	<b>42</b>	<b>254,2476</b>	<b>164,83</b>		<i>fragment N'</i>
<b>71</b>	<b>M549T166</b>	<b>1134</b>	<b>548,5399</b>	<b>165,69</b>		<i>fragment [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
<b>73</b>	<b>M567T166</b>	<b>386</b>	<b>566,5502</b>	<b>165,80</b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>72</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>Cer(d16:1/20:0)</b>
<b>93</b>	<b>M236T223</b>	<b>81</b>	<b>236,2372</b>	<b>223,18</b>		<i>fragment N</i>
<b>94</b>	<b>M412T223</b>	<b>38</b>	<b>412,3784</b>	<b>223,18</b>		<i>fragment C</i>
<b>95</b>	<b>M577T223</b>	<b>54288</b>	<b>576,5713</b>	<b>223,18</b>		<i>fragment [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
<b>97</b>	<b>M595T223</b>	<b>26</b>	<b>594,5818</b>	<b>223,18</b>	<b>C<sub>38</sub>H<sub>76</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>Cer(d16:1/22:0)</b>
<b>117</b>	<b>M946T474</b>	<b>Inf</b>	<b>945,6964</b>	<b>473,78</b>	<b>C<sub>63</sub>H<sub>93</sub>O<sub>6</sub></b>	<b>trieicosapentaenoyl-glycerol</b>

**Table 1:** *Plasmopara*-specific ions identified by non-targeted metabolomics, which are referred to in the text. Major compounds are indicated in bold. Identifications confirmed by the corresponding standards are marked by a grey background. Putative identifications are indicated with italics. The full list of 51 ions identified is presented in Table S2.

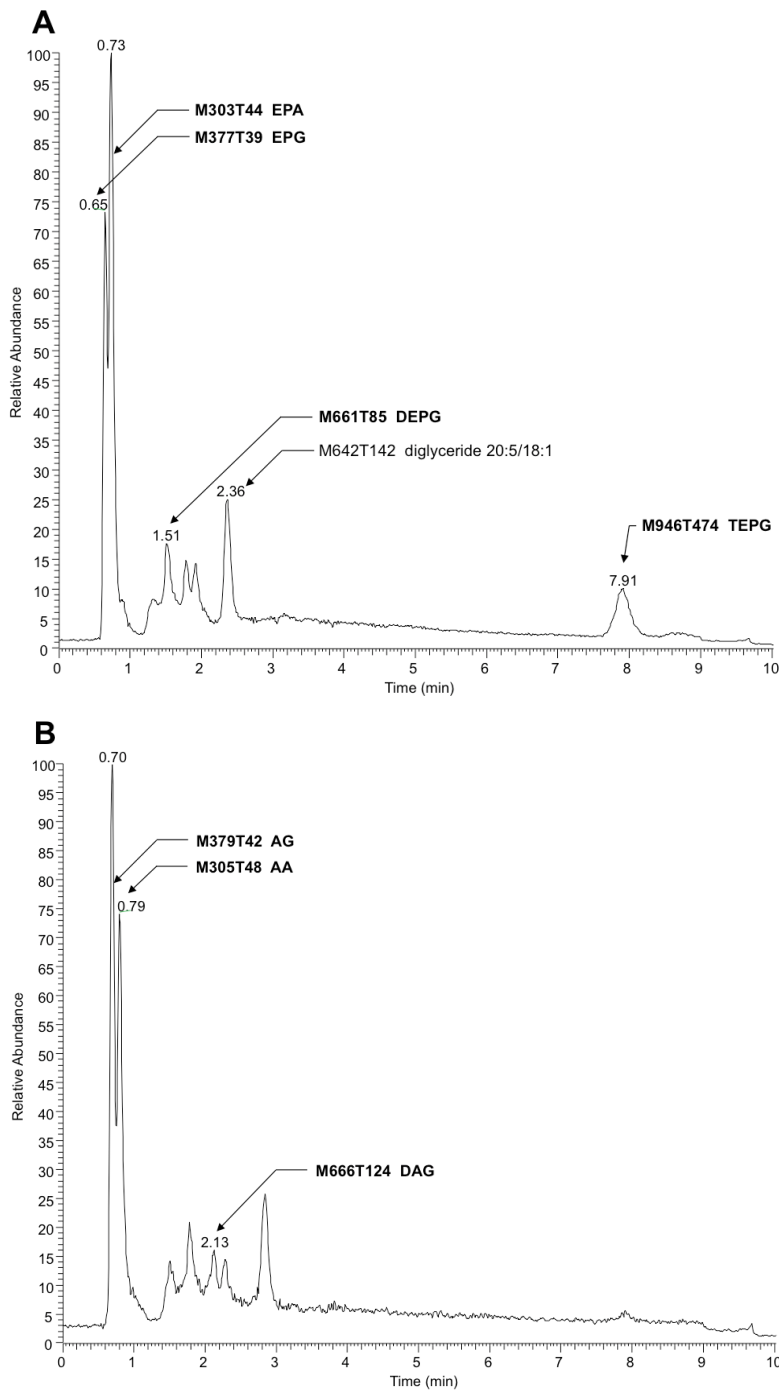
### Structural elucidation of eicosapentaenoic acid-containing lipids

In both the *P. viticola* extracts and the commercial standard, in source fragmentation of EPA produced a characteristic ion with *m/z* 285.2212 (C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O) corresponding to a loss of



water. Extracted ion chromatogram (EIC) for  $m/z$  285.2212 showed that other metabolites gave rise to this particular ion in *P. viticola* sporangia extracts (Fig. 1A), indicating that these molecules may contain EPA. A more detailed analysis of the mass spectra of some of these metabolites showed that they were actually present in our list of major *Plasmopara*-specific ions (Fig. 1A, Table 1). This prompted us to characterize these putative EPA-containing compounds further.

The mass and the formula of some of these compounds indicated that they may correspond to glycerides, constituted by glycerol ( $C_3H_8O_3$ ) partially or totally esterified by EPA. For example, the ion M377T39 (n°5) with  $m/z$  377.2683, corresponding to the formula  $C_{23}H_{37}O_4$  (average mass error, AME 0.8 ppm), was putatively identified as eicosapentaenoyl-glycerol (EPG). Indeed, it gave rise to a first dehydration fragment with  $m/z$  359.2579 ( $C_{23}H_{35}O_3$ ), as well as to the characteristic dehydration fragment of EPA ( $m/z$  285.2210). The first fragment corresponded to the ion M359T39 (n°4). The same reasoning could be applied to the ions M661T85 (n°16) and M946T474 (n°117), which were therefore putatively identified as dieicosapentaenoyl-glycerol (DEPG) and trieicosapentaenoyl-glycerol (TEPG) (Fig. 3), respectively. The identification of EPA glycerides was confirmed by comparing their characteristics to those of the corresponding synthetic standards (see below). Altogether, EPA and EPA glycerides give rise to 15 of 123 the major *Plasmopara*-specific ions selected Table S2.



**Fig. 1:** Extracted ion chromatogram of sporangia extracts showing putative EPA and AA-containing lipids

A. EIC of sporangia extracts for  $m/z$  285.2212 ( $\pm 2$  ppm), a characteristic ion of EPA

B. EIC of sporangia extracts for  $m/z$  287.2369 ( $\pm 2$  ppm), a characteristic ion of AA

Peaks corresponding to *Plasmopara*-specific ions identified by the non-targeted metabolomic approach (Table 1) are indicated. Compounds whose identity has been confirmed by using the corresponding standards are indicated in bold.

### Structural elucidation of arachidonic acid-containing lipids

In source fragmentation of the AA standard gave rise to a characteristic ion with  $m/z$  287.2369 ( $C_{20}H_{31}O$ , AME 0.1 ppm) corresponding to a loss of water. Using the same strategy as with EPA, EIC for  $m/z$  287.2369 revealed several potential AA-containing molecules in *P. viticola* sporangia extracts (Fig. 1B), some of them being listed among the *Plasmopara*-specific compounds (Table 1). Similarly, the formula and the fragmentation pattern of some of them indicate that they may be AA glycerides. For example, the ion M379T42 (n°8, Table 1) with  $m/z$  379.2839 ( $C_{23}H_{39}O_4$ , AME 1 ppm) could be putatively identified as arachidonoyl-glycerol (AG), as it produced a dehydration product with  $m/z$  361.2736 ( $C_{23}H_{37}O_3$ , AME 0.1 ppm) together with the characteristic dehydration ion of AA ( $m/z$  287.2369,  $C_{20}H_{31}O$ ). Applying the same reasoning, the ion M666T124 (n°30) was putatively identified as diarachidonoyl-glycerol (DAG). As TEPG was abundant in *P. viticola* sporangia, we logically looked for triarachidonoyl-glycerol (TAG), although no ion potentially derived from this compound was found in Table 1. TAG was indeed detected, albeit with a retention time of 21.81 min, exceeding the 10 min limit originally set for the XCMS analysis, and therefore explaining its absence in Table 1.

In order to confirm the identity of the fatty acid glycerides detected in *P. viticola* extracts, the corresponding standards were synthesized by  $ZnCl_2$ -catalyzed esterification of glycerol (Mostafa *et al.*, 2013). Using EPA and AA, mixtures of glycerides of the corresponding fatty acids were obtained and analyzed by UHPLC-HRMS using the same conditions as those used for sporangia extracts. The synthetic AG, DAG, EPG and DEPG exhibited the same RT and fragment patterns as the corresponding compounds detected in *P. viticola* extracts, therefore confirming their identity. The identities of the triglycerides were confirmed using the corresponding commercial TAG and TEPG standards.

### Characterization and structural elucidation of further *Plasmopara*-specific lipids

Among putative *Plasmopara*-specific metabolites, the ion with  $m/z$  236.2371 (putative formula  $C_{16}H_{30}N$ ) appeared three times at different RTs (ions n°33, 66 and 93, at RT 125, 165 and 223 s, respectively) (Table S2). For all RTs, this ion seemed to belong to a group of ions corresponding to fragments of larger metabolites. Indeed, EIC for  $m/z$  236.2371 revealed four different peaks at RTs 96, 125, 165 and 223 s (Fig. 2A). Analysis of the major ions present at these RTs revealed 4 compounds, which are also present in Table 1, namely M492T96, M521T125, M549T166, M577T223 (n°19, n°37, n°71, n°95). Each of these ions exhibited a mass difference of 28.031 amu with the following one, this mass increase being compatible

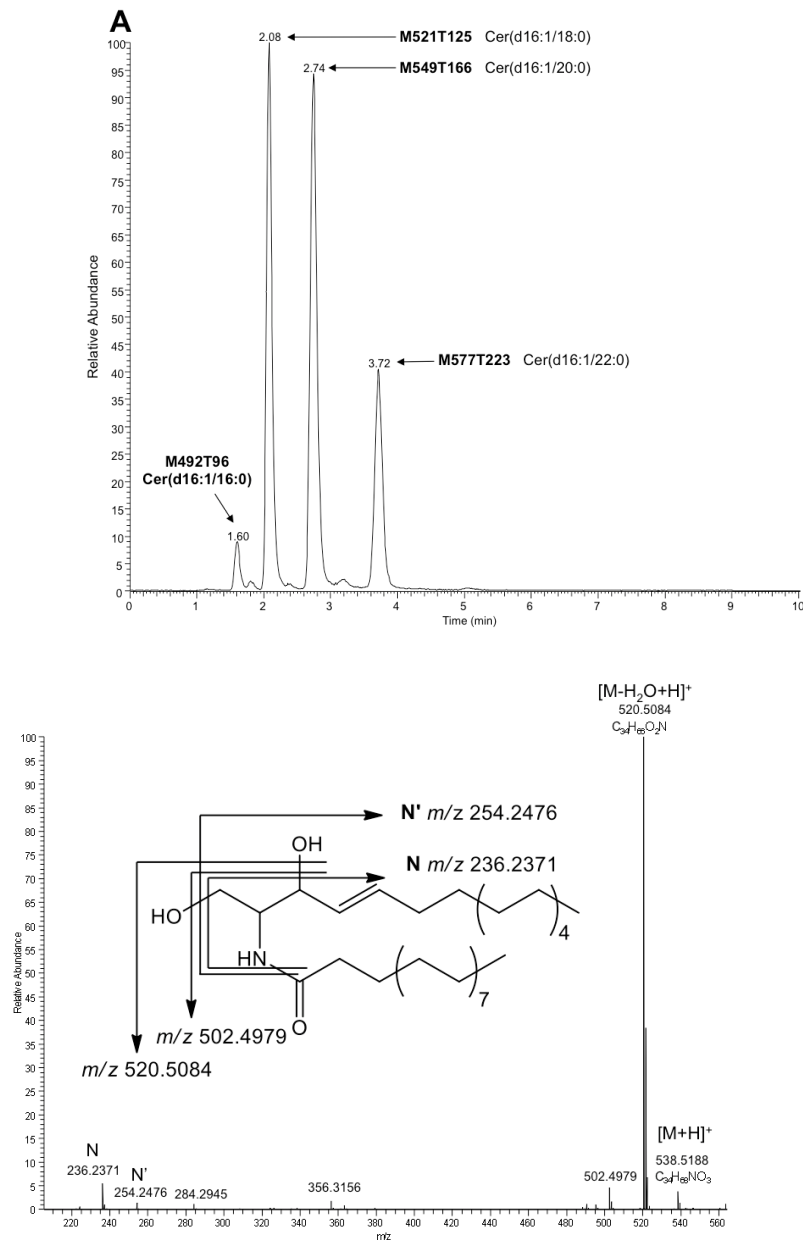
with their belonging to a family of compounds that differentiate themselves by an increasing number of ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) groups. Therefore, the putative formula of M492T96 (n°19) was C<sub>32</sub>H<sub>62</sub>O<sub>2</sub>N, and the following metabolites corresponded to the putative formulas C<sub>34</sub>H<sub>66</sub>O<sub>2</sub>N, C<sub>36</sub>H<sub>70</sub>O<sub>2</sub>N, C<sub>38</sub>H<sub>74</sub>O<sub>2</sub>N, respectively. Further analysis of the mass spectra revealed that, alongside the major ions listed above, we could detect minor ions corresponding to the same formula with either a loss of water or one additional water molecule (H<sub>2</sub>O). The latter ions corresponded to *m/z* 510.4877, 538.5189, 566.5502 and 594.5818, respectively. Search of the Metlin database for compounds possibly corresponding to these ions (with 1 ppm AME) retrieved candidates belonging to the ceramide family, composed of a C16:1 or C18:1 sphingosine, linked to a C14, C16, C18, C20 or C22 saturated fatty acid (Table S3). In order to validate these potential candidates, a commercial standard of the ceramide N-arachidoyl-D-sphingosine Cer(d18:1/20:0), which may correspond to the ion M577T223 (n°95), was analyzed by UHPLC-HRMS using the same conditions as those used for *P. viticola* extracts. Its mass spectrum showed a [M+H]<sup>+</sup> pseudo molecular ion with *m/z* 594.5814 corresponding to C<sub>38</sub>H<sub>76</sub>O<sub>3</sub>N, together with several fragments with *m/z* 264.2683 (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>N), *m/z* 282.2791 (C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>ON) and *m/z* 576.5713 (C<sub>38</sub>H<sub>74</sub>O<sub>2</sub>N), which was the major fragment. Ions coming from the fatty acid part were detected too (*m/z* 312.3258, C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>ON and *m/z* 354.3363, C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>N), in agreement with the fragmentation of ceramides described previously in several studies (Levery *et al.*, 2000; Hsu and Turk, 2002; Murphy, 2015) and obtained with this standard (Table S3). However, neither its RT nor its fragmentation corresponded to any of the ions found in *P. viticola*, excluding the hypothesis that some of these ions may be derived from C18:1 sphingosines.

A second set of candidates retrieved from the Metlin database contained C16:1 sphingosine. Indeed, the four compounds present in *P. viticola* extracts shared the same specific fragments with *m/z* 236.2371 (C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N) and 254.2476 (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>ON). The formulas of these fragments could be compatible with their being derived from a C16:1 sphingosine (Lhomme *et al.*, 1990; Pivot *et al.*, 1994). Therefore, a commercial standard of the ceramide Cer(d16:1/16:0) was analyzed by UHPLC-HRMS. Both its RT and its fragmentation pattern corresponded to that of the ion M492RT96 (n°19) found in *P. viticola* (Table S3). Furthermore, M492RT96 and Cer(d16:1/16:0) exhibited the same RT in three different chromatographic conditions (data not shown), showing that the ion M492RT96 (n°19) is indeed derived from Cer(d16:1/16:0) present in *P. viticola* extracts (Fig. 2A, Fig. 3). The ions M492T96, M521T125, M549T166 and M577T223 (n°19, n°37, n°71, n°95) all share common fragments with *m/z* 236.2373 and 254.2476, corresponding to C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N et C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>ON respectively, which

are derived from the C16:1 sphingosine. As for the commercial standards Cer(d16 :1/16 :0) and Cer(d18 :1/20 :0), 3 ions coming from the fatty acid part are detected for all 4 ceramides (Table S3). For cer(d16 :1/18 :0) (n°37), these characteristic fragments termed A, B and C are indicated Fig. 2B and Fig. S1.

Therefore, the ions M521T125, M549T166 and M577T223 (n°37, n°71, n°95) are very likely to be derived from a family of ceramides with a C16:1 sphingosyl group bound to a saturated fatty acid with 18 to 22 carbon atoms, namely Cer(d16:1/18:0), Cer(d16:1/20:0) and Cer(d16:1/22:0), respectively (Fig. 2A, Fig. 3). Detailed analysis of the fragments derived from these compounds is presented Table S3.

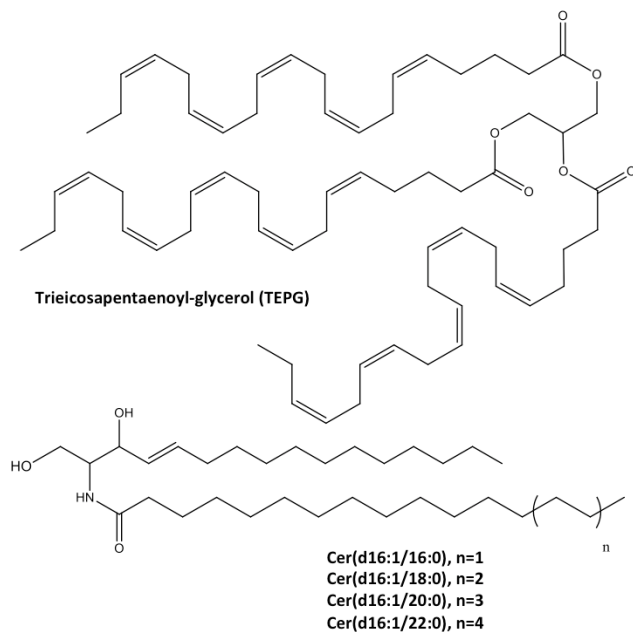
Altogether, we could propose an identification for 51 (Table S2) of our final set of 123 major ions, which are at least 15 times more abundant in sporangia extracts than in leaf extracts (Table S1).



**Fig. 2:** Characterization of ceramides in sporangia extracts

A. EIC of sporangia extracts for  $m/z$  236.2371 ( $\pm 2$  ppm), a characteristic ion of C16:1 ceramides. Peaks corresponding to *Plasmopara*-specific ions identified by the non-targeted metabolomic approach (Table 1) are indicated, with putative identifications. Identifications confirmed by using the corresponding standards are indicated in bold.

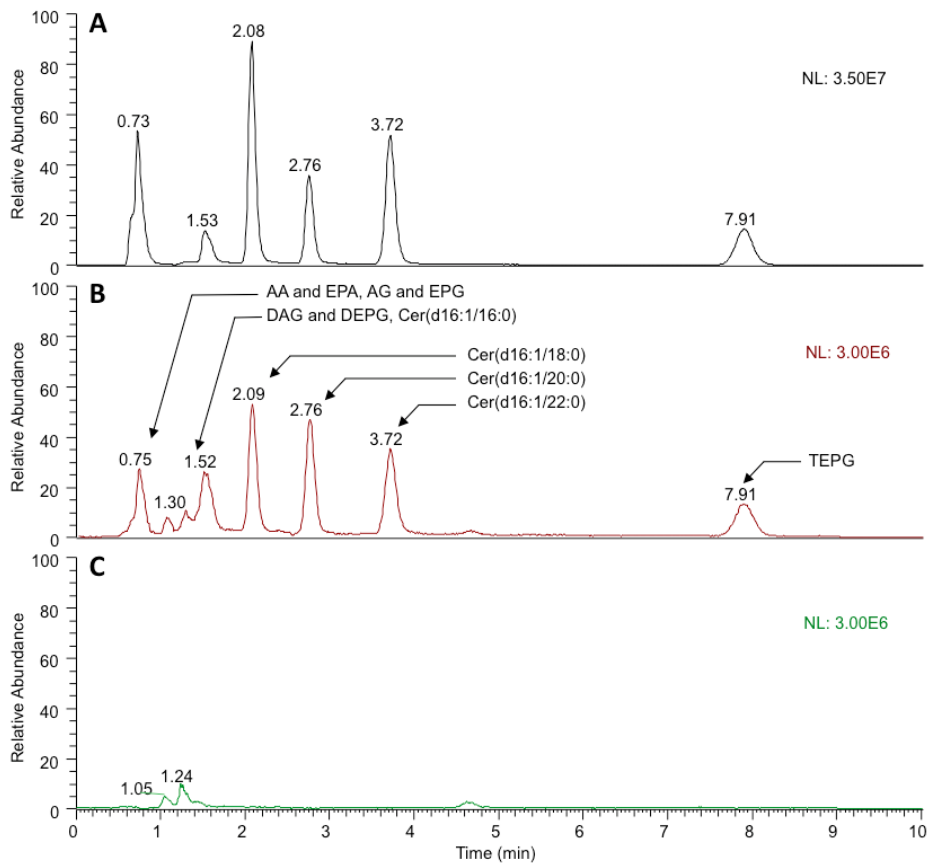
B. Mass spectrum of putative Cer(d16:1/18:0) (M521T125, n°37) from *P. viticola*. The fragmentation giving rise to the main fragments is indicated. A detailed fragmentation is given Fig. S1



**Fig. 3:** Structure of some of the lipids characterized in *P. viticola*

### ***Plasmopara*-specific lipids as markers of downy mildew infection in grapevine leaves**

Our differential metabolomic approach has led to the characterization of lipids, which are abundant in the sporangia of *P. viticola* and do not accumulate in grapevine leaf tissues (Fig. 3). This prompted us to evaluate the possibility to use these compounds to detect the presence of *P. viticola* in grapevine tissues before sporulation, i.e. as markers of downy mildew infection. To this end, leaves of *V. vinifera* cv Muscat Ottonel were infected by *P. viticola* and extracted with MeOH/CHCl<sub>3</sub> four days post infection. This extract was analyzed and compared to extracts of control leaves and sporangia of *P. viticola* (Fig. 4). All ceramides and fatty acid derivatives described above could be easily detected in the extract of infected leaves, all these compounds being absent in control leaves. This means that these *Plasmopara*-specific lipids could be used as markers of *P. viticola*, at least at late stages of the infection process.

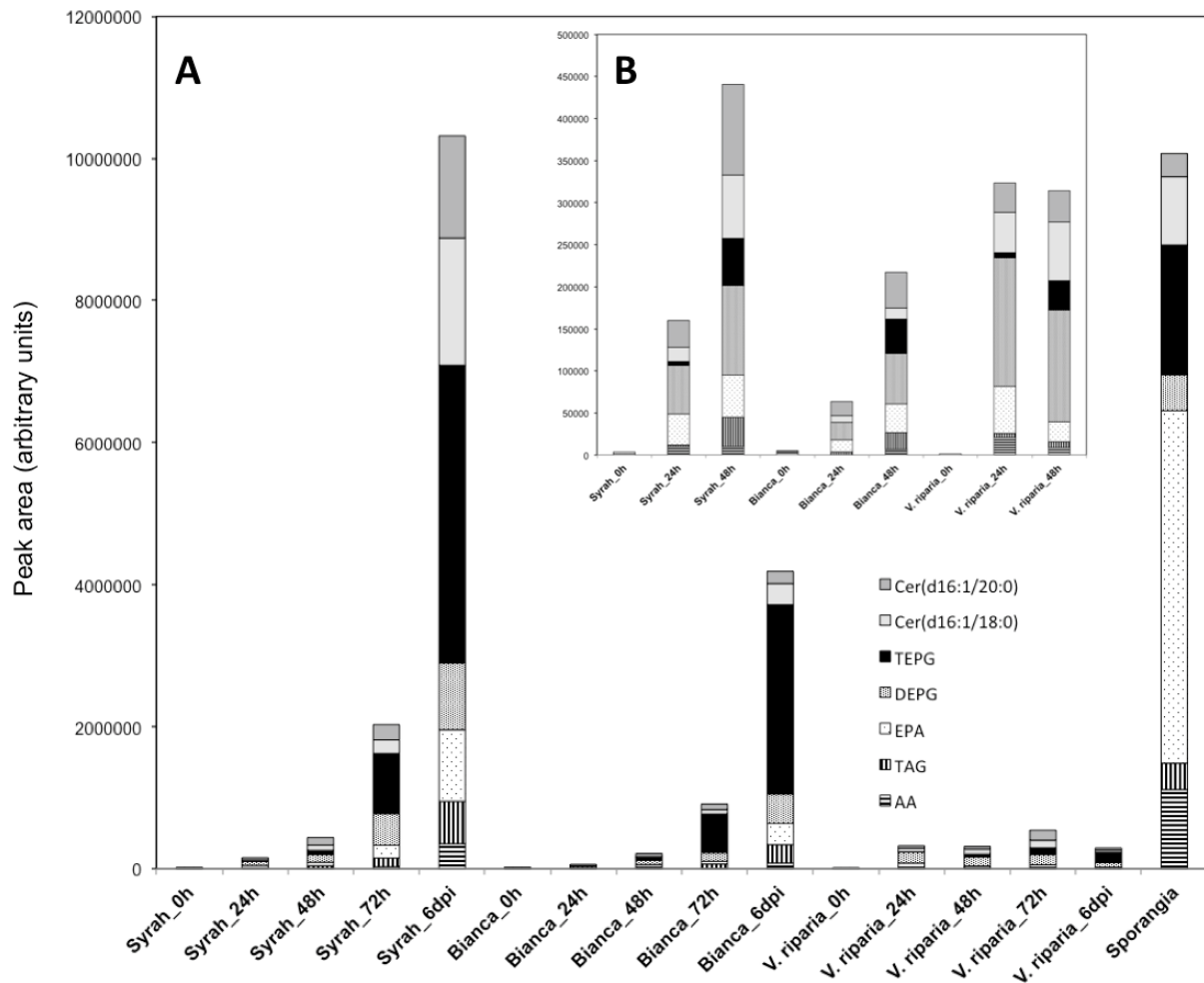


**Fig. 4:** Looking for makers of *P. viticola* in downy mildew-infected grapevine leaves  
 Analysis of MeOH/CHCl<sub>3</sub> extracts presenting the sum of the EIC for *m/z* of the characterized lipids of *P. viticola* ( $\pm 2$  ppm): 303.2316 + 305.2474 + 377.2683 + 379.2839 + 492.4773 + 520.5084 + 548.5399 + 576.5713 + 661.4825 + 665.5134 + 945.6964 + 951.7436. A: Sporangia of *P. viticola*; B: downy mildew-infected leaves 4 days post infection; C: control grapevine leaves. Infected (B) and control leaves (C) are presented at the same scale (Normalized Level, NL: 3.10<sup>6</sup>).

However, the main interest of *P. viticola*-specific biomarkers would be to allow an early detection of the pathogen. Therefore, we have evaluated the potential of the *Plasmopara*-specific lipids to describe the kinetic of *P. viticola* infection in 3 grapevines genotypes, which differ in their susceptibility to downy mildew. Leaves of *V. vinifera* cv Syrah (fully susceptible), *V. vinifera* cv Bianca (partially resistant) and *V. riparia* (resistant) were infected with a suspension of sporangia of *P. viticola*. Leaf discs were punched 0h, 24h, 48h, 72h and 6 days post infection, and analyzed for *Plasmopara*-specific lipids (Fig. S2, Fig. S3). Based on peak area, the 7 best-detected lipids (AA, TAG, EPA, DEPG, TEPG, Cer(d16:1/18:0), Cer(d16:1/20:0)) were selected for simplification of the quantification process (Fig. 5). All lipids could be efficiently detected even at early infection stages (24h post-inoculation), indicating that these lipids can be used for the development of sensitive metabolites-based quantification method of pathogen growth. As different patterns and timings of *Plasmopara*-



specific lipids accumulation were obtained in grapevine varieties with different susceptibility to downy mildew, such quantification method may be used to better characterize the relationships between *P. viticola* and grapevine in both compatible and incompatible contexts.



**Fig. 5:** Analysis of downy mildew infection in different grapevine cultivars

Grapevine cultivars with different susceptibility to downy mildew were used: *V. vinifera* cv Syrah (fully susceptible), *V. vinifera* cv Bianca (partially resistant) and *V. riparia* (resistant).

A. Leaf discs were analyzed for a selection of 7 *Plasmopara*-specific lipids 0h, 24h, 48h, 72h and 6 days post inoculation (dpi) with *P. viticola*. As a comparison, a typical lipid profile of sporangia of *P. viticola* is indicated.

B. Enlargement for early infection times (0h-48h). All samples were triplicates and means are presented. A complete analysis of *Plasmopara*-specific lipids in these samples is presented in Fig. S2.

## DISCUSSION

### ***P. viticola* is rich in unusual lipids, which are not detected in healthy grapevine leaf tissues**

In this work, we have looked for major metabolites, which are accumulated in sporangia of *P. viticola* and absent in healthy grapevine leaves, in order to identify potential markers of downy mildew infection. Our non-targeted metabolomic approach has led to the selection of 123 major ions, which are at least 15 times more abundant in sporangia extracts than in leaf extracts. Based on HRMS spectra, 51 of these 123 major ions could be identified as derivatives of *Plasmopara*-specific lipids, which include EPA and AA-containing lipids, in addition to a family of ceramides. Both EPA and AA have been isolated from extracts of *Phytophthora infestans*, as elicitors of the accumulation of antimicrobial stress metabolites in potato tubers (Bostock *et al.*, 1981). More recently, the role of EPA and AA as microbial associated molecular patterns (MAMPs) has been extended to other plant-Oomycete interactions (Savchenko *et al.*, 2010; Bostock *et al.*, 2011). EPA and AA have been detected in a number of other Oomycetes (Gandhi and Weete, 1991; Spring and Haas, 2002; Pang *et al.*, 2015). Due its remarkable abundance in *Plasmopara halstedii*, EPA has been proposed as a marker for downy mildew contamination in sunflower seeds (Spring and Haas, 2004).

However, analysis of lipids in Oomycetes has mostly targeted fatty acids released after total lipid hydrolysis and the information on complex lipids is very scarce. Here, we have used UHPLC-HRMS to directly characterize complex lipids without the modification usually needed for GC-MS analysis (hydrolysis, derivatization). In particular, optimized mild atmospheric pressure chemical ionization (APCI) has allowed the identification of ions corresponding to the whole molecules, as well as characteristic fragments. The use of APCI for the characterization of complex lipids has been reported very recently (Mutemberezi *et al.*, 2016), and this approach is likely to gain in popularity in the current context of the development of lipidomics.

UHPLC-HRMS has led to the characterization of two families of glycerides derived, respectively, from EPA and AA, which had not been formally identified in Oomycetes to date. Furthermore, TAG and TEPG are poorly documented in nature and, if any, very few natural sources of these triglycerides have been described. TAG has been reported in the red algae *Gracilaria verrucosa* (Kinoshita *et al.*, 1986). Several organisms such as *Mortierella sp.* (Shimizu *et al.*, 1988) and the Oomycetes *Pythium sp.* (Gandhi and Weete, 1991; O'Brien *et al.*, 1993) and *Saprolegnia sp.* (Shirasaka and Shimizu, 1995) have been reported to produce EPA-

containing triglycerides. However, to our knowledge, TEPG has not been formally identified in these organisms.

In addition to EPA and AA derivatives, sporangia of *P. viticola* contain a family of C16:1 ceramides including Cer(d16:1/16:0), whose identification could be confirmed using a commercial standard. Although we could not identify them formally due to the lack of standards, other major C16:1 ceramides of *P. viticola* are very likely to include Cer(d16:1/18:0), Cer(d16:1/20:0) and Cer(d16:1/22:0) (Fig. 3). Several shingophospholipids containing a C16:1 sphingosine have been detected in different Oomycete pathogens (Lhomme *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1998). However, Cer(d16:1/16:0), Cer(d16:1/18:0), Cer(d16:1/20:0) and Cer(d16:1/22:0) had not been reported in Oomycetes.

Analyses of leaves from different grapevine varieties have shown that none of the lipids characterized above are naturally present in significant amounts in healthy grapevine leaf tissues (Fig. 4). In the context of grapevine-downy mildew relationships, these lipids can therefore be considered as *Plasmopara*-specific. Their potential use as markers of downy mildew infection was therefore investigated.

### **Lipids of *P. viticola* can be used as early markers of downy mildew infection in grapevine leaves**

Most of the lipids characterized in sporangia extracts could be detected at early stages of downy mildew infection, indicating that these lipids are also present in the mycelium of *P. viticola*. Based on peak area, 7 lipids (AA, TAG, EPA, DEPG, TEPG, Cer(d16:1/18:0), Cer(d16:1/20:0)) were selected to monitor the development of the infection in grapevine varieties with different susceptibility to downy mildew. The presence of these 7 lipids could easily be detected 24h post-inoculation (Fig. 5), long before the first external symptoms, which usually start to appear 4 days post-inoculation on susceptible grapevine varieties (Peressotti *et al.*, 2011). The patterns of lipid accumulation were different in susceptible and resistant grapevine varieties. The accumulation of *Plasmopara*-specific lipids was unexpectedly higher 24h post-inoculation in *V. riparia* than in the more susceptible varieties, suggesting a rapid development of hyphae from zoospores, even on the resistant variety (Fig. 5). This is consistent with previous studies showing that *P. viticola* can form primary hyphae in the context of incompatible, compatible and even non-host interactions (Unger *et al.*, 2007; Diez-Navajas *et al.*, 2008; Mutemberezi *et al.*, 2016). However, the infection process was quickly stopped presumably as the result of plant defense reactions, the amount of detectable lipids reaching a plateau 24h post-inoculation. Lipid accumulation in the fully susceptible variety Syrah was

significantly higher than in Bianca, consistent with the partially resistant phenotype of this variety (Bellin *et al.*, 2009).

Interestingly, the pattern of lipid accumulation was modified along the infection process. At early stages, AA and EPA were rather accumulated as fatty acids, whereas at late stages, the corresponding triacylglycerols, and especially TEPG, were massively accumulated (Fig. 5), suggesting that the lipid pattern may be used as an indicator of infection developmental step. Indeed, the pattern of *Plasmopara*-specific lipids observed on Syrah leaves at late infection stage (6 dpi) differed substantially from that of sporangia (Fig. 5), although, at this stage, leaves were covered with an intense downy sporulation. This suggests that, even at the sporulation stage, the major part of *Plasmopara*-specific lipids comes from mycelial material localized inside grapevine leaves, this material being characterized by its high TEPG content. Altogether, these results show that *Plasmopara*-specific lipids may be used to monitor the development of downy mildew throughout the infection process, in both susceptible and resistant grapevine varieties.

## CONCLUSION

In this work, we have used a non-targeted metabolomic approach to characterize unusual *P. viticola*-specific lipids, which are not present in healthy grapevine leaves. Although AA, EPA and shingophospholipids had been found in Oomycetes before (Bostock *et al.*, 1981; Lhomme *et al.*, 1990), the major triglycerides TAG and TEPG and the ceramide family characterized in this work had not been unambiguously identified in Oomycetes. Beyond the identification of new lipids from *P. viticola*, we show that some of these compounds can be used to efficiently monitor the infection process of downy mildew, long before the appearance of any external symptom of the disease. The availability of reliable methods for the analysis of pathogen development contributes to a better understanding of plant–pathogen interactions. This is especially true for pathogens, which develop inside plant tissues and are, therefore, not directly accessible to visual or imaging-based methods.

Genetic analysis of quantitative resistance to plant pathogens require methods allowing a precise quantification of pathogen development for a reliable detection of the genomic regions involved in resistance. Assessment of resistance to grapevine downy mildew has been traditionally performed by means of visual scoring of disease symptoms or by measuring sporulation using a cell counter (Bellin *et al.*, 2009). More recently, a high-throughput imaging-

based method to quantify downy mildew sporulation has been developed (Peressotti *et al.*, 2011). However, these methods are all based on end-point quantification of sporulation. Although such high-throughput methods are very useful to screen breeding populations, they do not allow a fine and continuous monitoring of disease progression. To this end, quantitative PCR-based methods allowing the quantification of pathogen growth have been developed (Brouwer *et al.*, 2003; Anderson and McDowell, 2015). These methods are sensitive, however, they require costly reagents and rather complicated sample preparation.

Through the characterization of lipid markers of *P. viticola*, we provide targets for the development of LC-MS-based methods allowing a sensitive and continuous monitoring of downy mildew progression inside infected leaves. Optimization of chromatographic conditions will allow the development of fast (5 min or less) separation methods targeting the most relevant compounds, compatible with medium to high throughput quantification. Finally, the same strategy could be applied to other important Oomycete or fungi plant pathogens, in order to develop sensitive metabolite-based quantification of pathogen growth and disease progression.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and standards

LC-MS grade methanol and chloroform were from Roth Sochiel (Lauterbourg, France), water was provided by a Millipore water purification system. Arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and N-Arachidoyl-D-sphingosine Cer(d18:1/20:0) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). N-Hexadecanoyl-D-erythro-C16-sphingosine Cer(d16:1/16:0) was from Abcam (Paris, France). Triarachidonoyl-glycerol and trieicosapentaenoyl-glycerol were purchased from Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sweden). AG, DAG, EPG, and DEPG were obtained from AA and EPA by ZnCl<sub>2</sub>-catalyzed esterification of glycerol (Mostafa *et al.*, 2013).

### Inoculation of grapevine leaves with *P. viticola*

The isolate SC of *Plasmopara viticola* used in this work was collected from a natural infection in Colmar (France). It was characterized and maintained as described previously (Peressotti *et al.*, 2010). Inoculum (sporangia) was prepared from infected leaves of *V. vinifera* cv Muscat Ottonel, which is highly susceptible to *P. viticola*. Green cuttings of the selected grapevine varieties (*V. vinifera* cv Syrah, *V. vinifera* cv Bianca, *V. riparia*) were grown in a greenhouse. The sixth leaf, counted from the apex of 3.5 months old plants, were harvested and washed with demineralized water. These leaves were infected by flotation of their abaxial surface on a suspension of sporangia ( $10^5$  sporangia.mL<sup>-1</sup>) of *P. viticola* during 5 h. Control leaves were floated on demineralized water. Three leaves were used for each treatment. The leaves were then transferred to wet paper with the abaxial surface up in trays closed by transparent plastic bags. Leaves were stored in a growth chamber at 21 °C, with 16 h of light per day. At different times after infection, discs (diameter 1.5 cm) from infected and control leaves were punched, weighed, placed in a 2 mL tube and directly frozen into liquid nitrogen. Discs were then stored at -80°C until analysis.

### Preparation of sporangia from *P. viticola*

The abaxial faces of the leaves of two month-old Muscat Ottonel plants were sprayed with a suspension of sporangia ( $10^5$  sporangia.mL<sup>-1</sup> in water). Sprayed plants were then placed in a growth chamber at 21 °C, with 16 h of light per day. Seven days after inoculation, sporulating leaves were carefully cut and shaken in ultrapure water to recover sporangia.

Sporangia were collected by centrifuged at 30,000g for 20 minutes. Sporangia pellet was extracted with MeOH/CHCl<sub>3</sub> as described below.

### **Metabolite extraction from healthy or infected grapevine leaves**

The leaf discs were freeze-dried and weighed. After grinding the discs using a bead mill (TissueLyser II, Qiagen, Courtaboeuf, France), metabolites were extracted with MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1/1, v/v) using 15µL per mg dry weight. The suspension of leaf powder in MeOH/CHCl<sub>3</sub> was then sonicated for 15 min in an ultrasound bath. The same volume of ultrapure water was added to allow phase separation. After centrifugation at 15000g for 10 min, 100 µL of the chloroform phase was recovered, diluted with the 100 µL of MeOH and analyzed by UHPLC-MS.

### **UHPLC-HRMS**

Analyses were performed using a Dionex UHPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). The chromatographic separation was performed on a Nucleodur C18 HTec column (50 x 2 mm, 1.8 µm particle size; Macherey-Nagel, Düren, Germany) maintained at 20°C. The mobile phase consisted of methanol with formic acid (0.1%, v/v) in isocratic elution at a flow rate of 0.30 mL/min. The sample volume injected was 1 µL. The UHPLC system was coupled to an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, San Jose, USA) equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source operating in positive mode. Parameters were set at 300°C for ion transfer capillary temperature and the corona discharge current was set at 5 µA. Nebulization with nitrogen sheath gas and auxiliary gas were maintained at 15 and 10 arbitrary units respectively, and the nebulizer temperature was maintained at 400 °C. The spectra were acquired within the *m/z* mass range of 100 to 1200 atomic mass units (a.m.u.), using a resolution of 50,000 at *m/z* 200 a.m.u.. The system was calibrated internally using dibutylphthalate as lock mass at *m/z* 279.1591, giving a mass accuracy lower than 1 ppm. The instruments were controlled using the Xcalibur software and data was processed using the XCMS software package functioning under R.

Raw data were converted in the mzXML format using MS converter before analysis. The settings of the `xcmsSet` function of the XCMS package were fixed as follow: `method="centWave"`, `ppm=2`, `noise=50000`, `mzdiff=0.001`, `prefilter=c(5,15000)`, `snthresh=6`, `peakwidth=c(6,35)`). Peaks were aligned using the `obiwarp` function and using the followings settings of the function `group.density`: `bw =10`, `mzwid=0.0025`. This allowed the alignment of 2,156 peaks in the positive mode. Major differential ions (peak area > 10<sup>6</sup>, fold > 15) between sporangia and leaf extracts were selected. This has led to the selection of a final set of 123

major ions. The integration of each peak was manually checked before validation. The exact  $m/z$  and retention time of each metabolite were used for targeted metabolomic analyses using the Excalibur software.

### Acknowledgments

We thank Guillaume Denis-Semblat, Vincent Dumas, Denise Hartmann, Charlotte Knichel, Christian Vivant and Jacky Misbach (INRA, Colmar) for assistance with plant material. We are grateful to Marie-Annick Dorne and Marie-Céline Lacombe (INRA, Colmar) for help with downy mildew infections.

### References

- Ali K, Maltese F, Zyprian E, Rex M, Choi YH, Verpoorte R** (2009) NMR Metabolic Fingerprinting Based Identification of Grapevine Metabolites Associated with Downy Mildew Resistance. *J Agric Food Chem* **57**: 9599–9606
- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring J-L, Gindro K** (2011) The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiol Biochem* **49**: 265–274
- Anderson RG, McDowell JM** (2015) A PCR assay for the quantification of growth of the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* **16**: 893–898
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon A-F, Cipriani G, Morgante M, Testolin R, Di Gaspero G** (2009) Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine “Bianca” is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor Appl Genet* **120**: 163–176
- Bostock RM, Kuc JA, Laine RA** (1981) Eicosapentaenoic and Arachidonic Acids from *Phytophthora infestans* Elicit Fungitoxic Sesquiterpenes in the Potato. *Science* **212**: 67–69
- Bostock RM, Savchenko T, Lazarus C, Dehesh K** (2011) Eicosapolyenoic acids: novel MAMPs with reciprocal effect on oomycete-plant defense signaling networks. *Plant Signal Behav* **6**: 531–533
- Brouwer M, Lievens B, Van Hemelrijck W, van den Ackerveken G, Cammue BPA, Thomma BPHJ** (2003) Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiol Lett* **228**: 241–248
- Díez-Navajas AM, Wiedemann-Merdinoglu S, Greif C, Merdinoglu D** (2008) Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* **98**: 776–780
- Duan D, Halter D, Baltenweck R, Tisch C, Tröster V, Kortekamp A, Hugueney P, Nick P** (2015) Genetic diversity of



## CHAPITRE I : Identification de marqueurs lipidiques de *Plasmopara viticola*

stilbene metabolism in *Vitis sylvestris*. *J Exp Bot* **66**: 3243–3257

**Figueiredo A, Fortes AM, Ferreira S, Sebastiana M, Choi YH, Sousa L, Acioli-Santos B, Pessoa F, Verpoorte R, Pais MS** (2008) Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *J Exp Bot* **59**: 3371–3381

**Gandhi SR, Weete JD** (1991) Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. *J Gen Microbiol* **137**: 1825–1830

**Gessler C, Pertot I, Perazzolli M** (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* 1–42

**Hsu F-F, Turk J** (2002) Characterization of ceramides by low energy collisional-activated dissociation tandem mass spectrometry with negative-ion electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* **13**: 558–570

**Kim H, Gandhi SR, Moreau RA, Weete JD** (1998) Lipids of *Haliphthoros philippinensis*: An oomycetous marine microbe. *J Am Oil Chem Soc* **75**: 1657–1665

**Kinoshita K, Takahashi K, Zama K** (1986) Triarachidonin and Diarachidonylphosphatidylcholine in “Ogonori” *Gracilaria verrucosa*. *Bull Japan Soc Sci Fish* **52**: 757

**Kortekamp A** (2006) Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Biochem* **44**: 58–67

**Legay G, Marouf E, Berger D, Neuhaus JM** (2011) Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with through suppression subtractive hybridization (SSH). *Eur J Plant Pathol* **129**: 281–301

**Lenzi L, Caruso C, Bianchedi PL, Pertot I, Perazzolli M** (2016) Laser Microdissection of Grapevine Leaves Reveals Site-Specific Regulation of Transcriptional Response to *Plasmopara viticola*. *Plant and Cell Physiology* **57**: 69–81

**Leverly SB, Toledo MS, Doong RL, Straus AH, Takahashi HK** (2000) Comparative analysis of ceramide structural modification found in fungal cerebroside by electrospray tandem mass spectrometry with low energy collision-induced dissociation of Li<sup>+</sup> adduct ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**: 551–563

**Lhomme O, Bruneteau M, Costello CE, Más P, Molot PM, Dell A, Tiller PR, Michel G** (1990) Structural investigations and biological activity of inositol sphingophospholipids from *Phytophthora capsici*. *Eur J Biochem* **191**: 203–209

**Malacarne G, Vrhovsek U, Zulini L, Cestaro A, Stefanini M, Mattivi F, Delledonne M, Velasco R, Moser C** (2011) Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol* **11**: 114

**Moreau RA, Young DH, Danis PO, Powell MJ** (1998) Identification of ceramide-phosphorylethanolamine in oomycete plant pathogens: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora capsici*. *Lipids* **33**: 307–317

**Mostafa NA, Maher A, Abdelmoez W** (2013) Production of mono-, di-, and triglycerides from waste fatty acids through esterification with glycerol. *Adv Biosci Biotechnol*. doi: 10.4236/abb.2013.49118

**Murphy RC** (2015) Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids. 194–232

## CHAPITRE I : Identification de marqueurs lipidiques de *Plasmopara viticola*

- Mutemberezi V, Masquelier J, Guillemot-Legris O, Muccioli GG** (2016) Development and validation of an HPLC-MS method for the simultaneous quantification of key oxysterols, endocannabinoids, and ceramides: variations in metabolic syndrome. *Anal Bioanal Chem* **408**: 733–745
- O'Brien DJ, Kurantz MJ, Kwoczak R** (1993) Production of eicosapentaenoic acid by the filamentous fungus *Pythium irregulare*. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**: 211–214
- Pang K-L, Lin H-J, Lin H-Y, Huang Y-F, Chen Y-M** (2015) Production of arachidonic and eicosapentaenoic acids by the marine oomycete *Halophytophthora*. *Mar Biotechnol* **17**: 121–129
- Peressotti E, Duchêne E, Merdinoglu D, Mestre P** (2011) A semi-automatic non-destructive method to quantify grapevine downy mildew sporulation. *J Microbiol Meth* **84**: 265–271
- Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, Testolin R, Merdinoglu D, Mestre P** (2010) Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol* **10**: 147
- Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O** (2003)  $\delta$ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *J Agric Food Chem* **51**: 5488–5492
- Pivot V, Bruneteau M, Más P, Bompeix G, Michel G** (1994) Isolation, Characterization and Biological Activity of Inositol Sphingophospholipids From *Phytophthora capsici*. *Lipids* **29**: 21–25
- Polesani M, Bortesi L, Ferrarini A, Zamboni A, Fasoli M, Zadra C, Lovato A, Pezzotti M, Delledonne M, Polverari A** (2010) General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC genomics* **11**: 117
- Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A** (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC genomics* **9**: 142
- Savchenko T, Walley JW, Chehab EW, Xiao Y, Kaspi R, Pye MF, Mohamed ME, Lazarus CM, Bostock RM, Dehesh K** (2010) Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *Plant Cell* **22**: 3193–3205
- Shimizu S, Shinmen Y, Kawashima H, Akimoto K, Yamada H** (1988) Fungal mycelia as a novel source of eicosapentaenoic acid. Activation of enzyme(s) involved in eicosapentaenoic acid production at low temperature. *Biochem Biophys Res Commun* **150**: 335–341
- Shirasaka N, Shimizu S** (1995) Production of eicosapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28YTF-1. *J Am Oil Chem Soc* **72**: 1545–1549
- Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, Custodio DE, Abagyan R, Siuzdak G** (2005) METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit* **27**: 747–751

- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G** (2006) XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal Chem* **78**: 779–787
- Spring O, Haas K** (2004) Eicosapentaenoic acid, a possible marker for downy mildew contamination in sunflower seeds. *Advances in Downy Mildew Research—Volume 2*
- Spring O, Haas K** (2002) The fatty acid composition of *Plasmopara halstedii* and its taxonomic significance. *Eur J Plant Pathol* **108**: 263–267
- Unger S, Büche C, Boso S, Kassemeyer H-H** (2007) The Course of Colonization of Two Different *Vitis* Genotypes by *Plasmopara viticola* Indicates Compatible and Incompatible Host-Pathogen Interactions. *Phytopathology* **97**: 780–786
- Wu J, Zhang Y, Zhang H, Huang H, Folta KM, Lu J** (2010) Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biol* **10**: 234

CHAPITRE I : Identification de marqueurs lipidiques de *Plasmopara viticola*

SUPPLEMENTARY DATA

N°	name	fold	pvalue	mzmed	rtmed	Healthy_leaves1	Healthy_leaves2	Healthy_leaves3	Sporangia1	Sporangia2	Sporangia3
1	M337T33	Inf	0,060	337,1213	33,17	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,85E+06	1,86E+07	1,53E+07
2	M338T33	Inf	0,061	338,1246	33,17	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,37E+06	3,76E+06	3,10E+06
3	M339T33	1527	0,061	339,1184	33,17	2,30E+03	2,47E+03	3,79E+03	2,20E+06	6,03E+06	4,82E+06
4	M359T39	53	0,045	359,2577	38,81	5,11E+04	6,47E+04	9,75E+04	2,24E+06	5,00E+06	4,01E+06
5	M377T39	220	0,058	377,2683	38,81	6,48E+04	7,96E+04	1,11E+05	1,02E+07	2,64E+07	1,95E+07
6	M378T39	86	0,058	378,2717	38,81	5,96E+04	4,28E+04	5,67E+04	2,49E+06	6,41E+06	4,76E+06
7	M380T41	29	0,067	380,2873	41,13	8,26E+04	5,52E+04	7,52E+04	1,04E+06	2,88E+06	2,20E+06
8	M379T42	29	0,061	379,2839	41,59	3,36E+05	2,45E+05	3,06E+05	4,62E+06	1,19E+07	8,97E+06
9	M356T43	35	0,059	356,2873	42,51	4,71E+04	5,54E+04	8,44E+04	1,19E+06	3,03E+06	2,29E+06
10	M303T44	347	0,059	303,2316	43,87	1,35E+05	1,55E+05	1,80E+05	2,81E+07	7,46E+07	6,04E+07
11	M304T44	436	0,059	304,2350	43,87	2,50E+04	1,97E+04	3,46E+04	5,93E+06	1,58E+07	1,28E+07
12	M305T48	68	0,059	305,2474	47,97	1,95E+05	1,59E+05	2,37E+05	7,02E+06	1,83E+07	1,48E+07
13	M381T50	16	0,064	281,2473	50,26	3,30E+05	3,09E+05	4,05E+05	2,91E+06	7,60E+06	6,07E+06
14	M307T53	25	0,060	307,2629	52,64	1,06E+05	9,28E+04	1,06E+05	1,35E+06	3,46E+06	2,88E+06
15	M806T79	403	0,063	806,4726	79,16	5,90E+03	0,00E+00	1,29E+04	1,21E+06	3,29E+06	3,10E+06
16	M661T85	38	0,054	661,4825	84,66	2,32E+05	2,99E+05	9,52E+05	9,83E+06	2,35E+07	2,24E+07
17	M482T90	256	0,121	482,2666	90,11	9,53E+03	9,27E+03	2,45E+04	2,41E+06	2,36E+06	6,83E+06
18	M662T92	42	0,054	662,4856	91,67	8,81E+04	1,29E+05	3,97E+05	4,56E+06	1,09E+07	1,04E+07
19	M492T96	Inf	0,047	492,4773	96,14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,63E+06	1,08E+07	9,30E+06
20	M493T96	380	0,049	493,4807	96,14	9,68E+03	6,47E+03	6,18E+03	1,56E+06	3,71E+06	3,20E+06
21	M617T103	Inf	0,058	616,5662	103,49	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,10E+06	2,92E+06	2,44E+06
22	M587T108	16	0,044	587,4670	107,85	7,93E+04	6,94E+04	7,95E+05	2,90E+06	6,29E+06	6,22E+06
23	M588T108	17	0,046	588,4705	107,85	3,00E+04	1,54E+04	3,09E+05	1,15E+06	2,54E+06	2,47E+06
24	M621T115	110	0,032	621,4876	115,10	2,17E+04	2,73E+04	4,92E+04	2,30E+06	4,14E+06	4,37E+06
25	M622T115	587	0,031	622,4909	115,17	9,50E+02	2,91E+03	4,26E+03	1,02E+06	1,80E+06	1,94E+06
26	M639T115	1519	0,048	639,4981	115,17	1,25E+04	1,08E+04	1,95E+04	1,18E+07	2,72E+07	2,58E+07
27	M642T115	17	0,055	641,5042	115,48	1,15E+05	9,56E+04	1,17E+05	1,06E+06	2,53E+06	2,14E+06
28	M641T116	3900	0,048	640,5015	115,66	2,67E+03	1,05E+03	3,71E+03	5,27E+06	1,22E+07	1,15E+07
29	M363T123	20	0,056	363,2890	122,92	1,01E+05	8,92E+04	9,82E+04	1,02E+06	2,39E+06	2,36E+06
30	M666T124	48	0,055	665,5134	123,80	1,41E+05	1,31E+05	1,47E+05	3,48E+06	8,49E+06	8,10E+06
31	M667T124	245	0,055	666,5168	123,80	1,06E+04	1,92E+04	8,34E+03	1,61E+06	3,96E+06	3,76E+06
32	M565T125	23	0,014	564,5150	125,15	6,85E+04	5,63E+04	7,77E+05	5,02E+06	7,89E+06	7,44E+06
33	M236T125	173	0,049	236,2371	125,15	4,41E+04	4,94E+04	4,06E+04	4,25E+06	1,01E+07	8,93E+06
34	M254T125	29	0,052	254,2477	125,15	6,91E+04	6,66E+04	5,81E+04	1,02E+06	2,41E+06	2,15E+06
35	M502T125	Inf	0,046	502,4980	125,15	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,56E+06	8,12E+06	7,40E+06
36	M504T125	141	0,051	503,5013	125,15	1,14E+04	1,19E+04	2,53E+04	1,24E+06	2,95E+06	2,66E+06
37	M521T125	14665	0,047	520,5084	125,15	6,60E+03	7,29E+03	1,38E+04	7,51E+07	1,74E+08	1,57E+08
38	M522T125	200	0,048	521,5117	125,15	2,99E+05	2,09E+05	2,47E+05	2,80E+07	6,47E+07	5,85E+07
39	M523T125	109	0,050	522,5150	125,15	1,01E+05	7,25E+04	8,24E+04	5,05E+06	1,20E+07	1,08E+07
40	M539T125	16	0,050	538,5189	125,15	9,86E+04	9,00E+04	7,88E+05	2,85E+06	6,68E+06	5,97E+06
41	M540T125	35	0,053	539,5223	125,15	1,39E+04	1,04E+04	1,37E+05	1,00E+06	2,44E+06	2,22E+06
42	M356T126	128	0,041	356,3156	125,61	2,02E+04	2,36E+04	2,10E+04	1,64E+06	3,53E+06	3,12E+06
43	M284T126	22	0,037	284,2945	126,06	9,81E+04	1,08E+05	9,02E+04	1,35E+06	2,69E+06	2,36E+06
44	M541T140	714	0,046	540,5348	140,45	5,86E+03	1,70E+03	1,69E+04	3,23E+06	7,29E+06	6,92E+06
45	M542T140	2354	0,050	541,5381	140,45	5,68E+02	2,15E+03	0,00E+00	1,15E+06	2,69E+06	2,57E+06
46	M642T142	144	0,044	641,5134	141,81	9,67E+04	8,82E+04	9,69E+04	7,67E+06	1,65E+07	1,63E+07
47	M643T142	153	0,042	642,5168	141,81	4,19E+04	3,70E+04	3,92E+04	3,48E+06	7,36E+06	7,22E+06
48	M359T142	91	0,031	359,2577	142,26	3,63E+04	4,55E+04	5,05E+04	2,56E+06	4,63E+06	4,79E+06
49	M624T146	97	0,038	623,5586	145,89	3,59E+04	1,74E+04	5,00E+04	2,05E+06	4,21E+06	3,81E+06
50	M623T146	49	0,035	622,5551	146,34	1,85E+05	1,05E+05	1,62E+05	4,59E+06	9,02E+06	8,44E+06
51	M668T147	8522	0,043	667,5290	147,24	0,00E+00	6,42E+02	0,00E+00	1,04E+06	2,18E+06	2,25E+06
52	M547T150	123	0,255	547,4718	149,51	7,17E+05	5,14E+05	4,78E+05	1,57E+08	1,35E+07	4,01E+07
53	M548T150	122	0,256	548,4753	149,51	2,73E+05	1,99E+05	1,80E+05	5,92E+07	5,19E+06	1,48E+07
54	M527T153	2379	0,035	526,5192	152,67	0,00E+00	7,29E+02	3,74E+03	2,36E+06	4,71E+06	3,56E+06
55	M644T160	66	0,053	643,5292	159,58	4,10E+04	3,85E+04	5,39E+04	1,55E+06	3,68E+06	3,59E+06
56	M619T164	216	0,020	618,5617	163,55	9,69E+03	1,93E+04	7,23E+04	5,38E+06	8,99E+06	7,50E+06
57	M618T164	26	0,018	617,5659	163,97	1,11E+04	5,78E+03	2,01E+05	1,44E+06	2,39E+06	1,89E+06
58	M557T164	Inf	0,043	556,5449	164,41	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,80E+06	8,46E+06	6,91E+06
59	M576T164	Inf	0,043	575,5585	164,41	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,81E+07	8,45E+07	6,99E+07
60	M577T164	12373	0,043	576,5620	164,41	0,00E+00	3,22E+03	0,00E+00	7,86E+06	1,75E+07	1,44E+07
61	M558T164	2909	0,043	557,5483	164,46	0,00E+00	1,96E+03	6,98E+02	1,52E+06	3,38E+06	2,84E+06
62	M575T164	277242	0,041	574,5553	164,46	0,00E+00	1,66E+03	0,00E+00	9,28E+07	2,02E+08	1,67E+08
63	M578T164	108	0,046	577,5652	164,46	2,19E+04	9,66E+03	1,80E+04	1,04E+06	2,36E+06	1,98E+06
64	M593T164	977	0,040	592,5657	164,46	1,41E+04	1,29E+03	4,82E+03	4,01E+06	8,57E+06	7,16E+06
65	M378T165	362	0,033	378,3364	164,51	1,70E+04	6,40E+03	3,86E+03	2,12E+06	4,16E+06	3,59E+06
66	M236T165	272	0,044	236,2371	164,83	3,31E+04	3,91E+04	2,50E+04	5,17E+06	1,16E+07	9,66E+06
67	M254T165	42	0,045	254,2476	164,83	6,08E+04	5,44E+04	3,38E+04	1,23E+06	2,73E+06	2,32E+06
68	M633T165	74	0,012	632,5775	164,90	1,71E+04	1,16E+04	1,53E+05	3,54E+06	5,27E+06	4,58E+06
69	M550T165	32	0,052	549,5432	165,39	5,54E+05	6,46E+05	1,11E+06	1,35E+07	3,21E+07	2,83E+07
70	M531T166	4670	0,055	530,5294	165,69	0,00E+00	1,74E+03	0,00E+00	1,42E+06	3,60E+06	3,09E+06
71	M549T166	1134	0,049	548,5399	165,69	6,94E+04	5,85E+04	3,77E+04	3,44E+07	8,13E+07	7,22E+07
72	M551T166	16	0,055	550,5466	165,69	2,09E+05	2,40E+05	4,22E+05	2,57E+06	6,16E+06	5,44E+06
73	M567T166	386	0,047	566,5502	165,80	5,65E+03	2,13E+03	9,88E+03	1,27E+06	2,93E+06	2,61E+06
74	M549T171	18	0,009	549,4876	171,48	6,65E+05	7,49E+05	1,25E+06	1,86E+07	1,41E+07	1,45E+07
75	M550T172	15	0,037	550,4909	171,84	3,34E+05	3,68E+05	6,39E+05	9,38E+06	5,47E+06	5,46E+06
76	M583T182	Inf	0,044	582,5606	182,37	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,25E+06	2,81E+06	2,25E+06
77	M602T182	Inf	0,042	601,5743	182,37	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,36E+07	3,01E+07	2,45E+07

CHAPITRE I : Identification de marqueurs lipidiques de *Plasmopara viticola*

78	M603T182	Inf	0,045	602,5779	182,37	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,85E+06	6,50E+06	5,20E+06
79	M619T182	56	0,043	618,5815	182,37	1,73E+04	2,95E+04	7,95E+04	1,43E+06	3,13E+06	2,55E+06
80	M601T183	73375	0,042	600,5710	182,52	4,65E+02	7,35E+02	9,43E+02	3,18E+07	6,95E+07	5,60E+07
81	M646T183	56	0,036	645,5811	182,70	2,12E+04	2,13E+03	9,64E+04	1,44E+06	2,92E+06	2,29E+06
82	M645T183	Inf	0,032	644,5777	182,80	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,18E+06	6,18E+06	5,31E+06
83	M563T192	573	0,054	562,5557	191,72	5,21E+03	4,00E+03	4,00E+03	1,32E+06	3,31E+06	2,94E+06
84	M659T193	326	0,031	658,5934	192,70	1,09E+03	4,76E+02	2,07E+04	1,60E+06	3,09E+06	2,56E+06
85	M589T198	574	0,025	588,5712	197,64	8,65E+03	0,00E+00	0,00E+00	1,17E+06	2,09E+06	1,70E+06
86	M616T202	1352	0,038	615,5901	202,01	4,19E+03	1,15E+03	7,37E+02	1,72E+06	3,60E+06	2,89E+06
87	M615T202	3739	0,036	614,5866	202,19	0,00E+00	2,86E+03	2,10E+03	3,96E+06	8,09E+06	6,50E+06
88	M633T202	468	0,034	632,5972	202,19	2,78E+04	1,82E+04	1,49E+05	1,97E+07	3,92E+07	3,23E+07
89	M634T202	27	0,036	633,6004	202,19	5,76E+05	4,23E+05	5,52E+05	8,89E+06	1,77E+07	1,46E+07
90	M674T202	25	0,022	673,6124	202,44	1,05E+05	5,68E+04	9,05E+04	1,53E+06	2,57E+06	2,09E+06
91	M673T202	1598	0,018	672,6090	202,50	5,78E+02	1,23E+03	6,63E+03	3,42E+06	5,53E+06	4,53E+06
92	M621T223	72	0,023	620,5781	223,16	5,04E+04	2,97E+04	1,81E+05	4,40E+06	7,53E+06	6,79E+06
93	M236T223	81	0,049	236,2372	223,18	5,81E+04	5,70E+04	4,76E+04	2,42E+06	5,64E+06	5,08E+06
94	M412T223	38	0,041	412,3784	223,18	4,50E+04	4,34E+04	7,29E+04	1,22E+06	2,56E+06	2,32E+06
95	M577T223	54288	0,048	576,5713	223,18	2,59E+03	3,58E+03	0,00E+00	6,09E+07	1,42E+08	1,32E+08
96	M579T223	1557	0,048	578,5779	223,18	8,17E+03	4,01E+03	5,96E+03	5,15E+06	1,20E+07	1,11E+07
97	M595T223	26	0,048	594,5818	223,18	7,58E+04	2,32E+04	4,29E+05	2,51E+06	5,72E+06	5,33E+06
98	M559T224	Inf	0,044	558,5609	223,62	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,63E+06	5,83E+06	5,43E+06
99	M578T224	1660	0,049	577,5747	223,68	4,39E+04	3,31E+04	7,10E+03	2,53E+07	5,93E+07	5,51E+07
100	M603T230	Inf	0,033	602,5871	230,05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,25E+07	1,04E+08	8,64E+07
101	M585T230	Inf	0,035	584,5765	230,10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,03E+06	4,08E+06	3,53E+06
102	M605T230	Inf	0,034	604,5936	230,10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+06	1,00E+07	8,27E+06
103	M621T231	47	0,043	620,5971	230,57	3,67E+04	7,48E+03	1,37E+05	1,82E+06	3,92E+06	2,84E+06
104	M604T231	9463	0,034	603,5903	230,70	6,18E+03	5,12E+03	0,00E+00	2,30E+07	4,59E+07	3,80E+07
105	M646T231	30	0,016	645,5970	230,90	3,78E+04	5,83E+03	1,17E+05	1,21E+06	1,94E+06	1,62E+06
106	M647T231	228	0,018	646,5934	230,90	2,15E+04	1,68E+04	4,42E+04	4,70E+06	7,55E+06	6,60E+06
107	M661T231	48	0,010	660,6092	231,03	5,87E+04	3,78E+04	1,18E+05	2,99E+06	4,12E+06	3,25E+06
108	M615T238	333	0,106	614,5867	238,07	4,34E+04	8,17E+04	0,00E+00	4,09E+06	1,92E+07	1,84E+07
109	M629T248	226	0,039	628,6025	247,79	4,29E+03	1,27E+04	1,55E+04	1,47E+06	3,09E+06	2,77E+06
110	M597T255	1777	0,047	596,5977	255,47	5,75E+02	0,00E+00	3,15E+03	1,21E+06	2,76E+06	2,64E+06
111	M631T314	132	0,038	630,6182	314,47	1,09E+04	7,44E+03	5,99E+04	2,15E+06	4,47E+06	3,75E+06
112	M949T473	Inf	0,053	948,7059	472,85	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,69E+06	3,88E+06	4,11E+06
113	M359T473	105	0,060	359,2580	473,32	5,06E+04	4,53E+04	4,47E+04	2,43E+06	5,98E+06	6,29E+06
114	M644T473	6105	0,055	644,4754	473,32	6,10E+03	2,70E+03	4,74E+03	1,41E+07	3,52E+07	3,34E+07
115	M645T473	111	0,054	645,4759	473,32	4,22E+04	3,52E+04	5,26E+04	2,49E+06	5,95E+06	5,99E+06
116	M643T474	1799	0,057	643,4721	473,78	3,84E+04	2,42E+04	3,92E+04	3,09E+07	7,98E+07	7,24E+07
117	M946T474	Inf	0,057	945,6964	473,78	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,92E+07	7,49E+07	6,95E+07
118	M947T474	Inf	0,057	946,6995	473,78	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+07	5,16E+07	4,75E+07
119	M948T474	11923	0,057	947,7031	473,78	0,00E+00	1,48E+03	2,01E+03	6,99E+06	1,80E+07	1,67E+07
120	M620T519	159	0,100	620,4748	519,47	1,85E+04	2,17E+04	1,87E+04	1,00E+06	4,05E+06	4,32E+06
121	M619T520	75	0,051	619,4715	519,94	1,19E+05	9,66E+04	1,16E+05	4,46E+06	1,01E+07	1,03E+07
122	M923T520	Inf	0,051	922,6989	519,94	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,61E+06	8,36E+06	8,43E+06
123	M922T520	Inf	0,101	921,6957	519,95	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,92E+06	1,24E+07	1,29E+07

**Table S1:** Characteristics of the 123 major ions (peak area > 10<sup>6</sup>), which are at least 15 times more abundant in sporangia extracts than in healthy leaf extracts, based on XCMS automated integration. Both sporangia and leaf extracts were analyzed in triplicate. Ions are numbered according to their retention time.

CHAPITRE I : Identification de marqueurs lipidiques de *Plasmopara viticola*

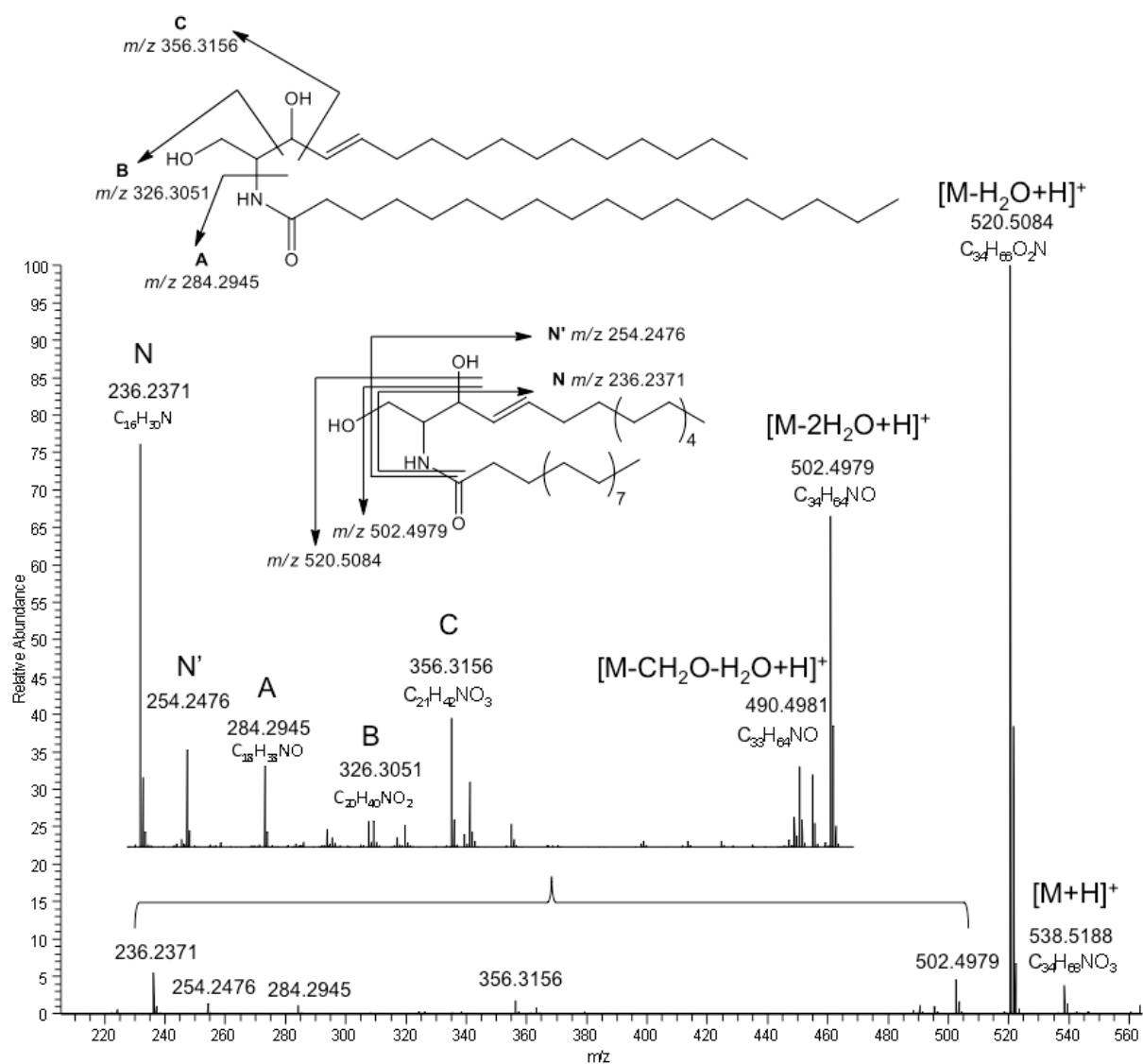
Ion n°	name	fold	mzmed	rtmed	Ion formula	(Putative) identification
4	M359T39	53	359,2577	38,81		fragment EPA [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
5	<b>M377T39</b>	<b>220</b>	<b>377,2683</b>	<b>38,81</b>	<b>C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>eicosapentaenoyl-glycerol</b>
6	M378T39	86	378,2717	38,81		isotope of M377T39
7	M380T41	29	380,2873	41,13		isotope of M379T42
8	<b>M379T42</b>	<b>29</b>	<b>379,2839</b>	<b>41,59</b>	<b>C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>arachidonoyl-glycerol</b>
10	<b>M303T44</b>	<b>347</b>	<b>303,2316</b>	<b>43,87</b>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>EPA</b>
11	M304T44	436	304,2350	43,87		isotope of M303T44
12	<b>M305T48</b>	<b>68</b>	<b>305,2474</b>	<b>47,97</b>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>AA</b>
13	M281T50	16	281,2473	50,26	<b>C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></b>	<i>C<sub>18:2</sub> acid</i>
16	<b>M661T85</b>	<b>38</b>	<b>661,4825</b>	<b>84,66</b>		<b>dieicosapentaenoyl-glycerol</b>
18	M662T92	42	662,4856	91,67		isotope of M662T92
19	<b>M492T96</b>	<b>Inf</b>	<b>492,4773</b>	<b>96,14</b>	<b>C<sub>32</sub>H<sub>64</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>Cer(d16:1/16:0)</b>
20	M493T96	380	493,4807	96,14		isotope of M492T96
30	<b>M666T124</b>	<b>48</b>	<b>665,5134</b>	<b>123,80</b>	<b>C<sub>43</sub>H<sub>69</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>diarachidonoyl-glycerol</b>
31	M667T124	245	666,5168	123,80		isotope of M666T124
33	M236T125	173	236,2371	125,15		<i>fragment N</i>
34	M254T125	29	254,2477	125,15		<i>fragment N'</i>
35	M502T125	Inf	502,4980	125,15		<i>fragment [M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
36	M504T125	141	503,5013	125,15		<i>isotope of M502T125</i>
37	M521T125	14665	520,5084	125,15		<i>fragment [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
38	M522T125	200	521,5117	125,15		<i>isotope of M521T125</i>
39	M523T125	109	522,5150	125,15		<i>isotope of M521T125</i>
40	<b>M539T125</b>	<b>16</b>	<b>538,5189</b>	<b>125,15</b>	<b>C<sub>34</sub>H<sub>68</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>Cer(d16:1/18:0)</b>
41	M540T125	35	539,5223	125,15		<i>isotope of M539T125</i>
42	M356T126	128	356,3156	125,61		<i>fragment C</i>
43	M284T126	22	284,2945	126,06		<i>fragment A</i>
46	<b>M642T142</b>	<b>144</b>	<b>641,51342</b>	<b>141,805</b>	<b>C<sub>41</sub>H<sub>69</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>diglyceride 20:5/18:1</b>
47	M643T142	153	642,516768	141,805		<i>fragment of M642T142</i>
48	M359T142	91	359,257695	142,260		<i>fragment EPA [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
66	M236T165	272	236,2371	164,83		<i>fragment N</i>
67	M254T165	42	254,2476	164,83		<i>fragment N'</i>
69	M550T165	32	549,5432	165,39		<i>fragment of M549T166</i>
70	M531T166	4670	530,5294	165,69		<i>fragment [M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
71	M549T166	1134	548,5399	165,69		<i>fragment [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
72	M551T166	16	550,5466	165,69		<i>fragment of M549T166</i>
73	<b>M567T166</b>	<b>386</b>	<b>566,5502</b>	<b>165,80</b>	<b>C<sub>36</sub>H<sub>72</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>Cer(d16:1/20:0)</b>
93	M236T223	81	236,2372	223,18		<i>fragment N</i>
94	M412T223	38	412,3784	223,18		<i>fragment C</i>
95	M577T223	54288	576,5713	223,18		<i>fragment [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
96	M579T223	1557	578,5779	223,18		<i>isotope of M577T223</i>
97	M595T223	26	594,5818	223,18	<b>C<sub>38</sub>H<sub>76</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>Cer(d16:1/22:0)</b>
98	M559T224	Inf	558,5609	223,62		<i>fragment [M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
99	M578T224	1660	577,5747	223,68		<i>isotope of M577T223</i>
112	M949T473	Inf	948,7059	472,85		<i>fragment of M946T474</i>
113	M359T473	105	359,2580	473,32		<i>fragment EPA [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup></i>
114	M644T473	6105	644,4754	473,32		<i>fragment of M643T473</i>
115	M645T473	111	645,4759	473,32		<i>fragment of M643T473</i>
116	M643T474	1799	643,4721	473,78		<i>fragment EPA-diglyceryl</i>
117	<b>M946T474</b>	<b>Inf</b>	<b>945,6964</b>	<b>473,78</b>	<b>C<sub>63</sub>H<sub>93</sub>O<sub>6</sub></b>	<b>trieicosapentaenoyl-glycerol</b>
118	M947T474	Inf	946,6995	473,78		<i>fragment of M946T474</i>
119	M948T474	11923	947,7031	473,78		<i>fragment of M946T474</i>

**Table S2:** List of the *Plasmopara*-specific ions identified by non-targeted metabolomics, which have been characterized in this work. Major compounds are indicated in bold. Identifications confirmed by the corresponding standards are marked by a grey background. Putative identifications are indicated with italics.

CHAPITRE I : Identification de marqueurs lipidiques de *Plasmopara viticola*

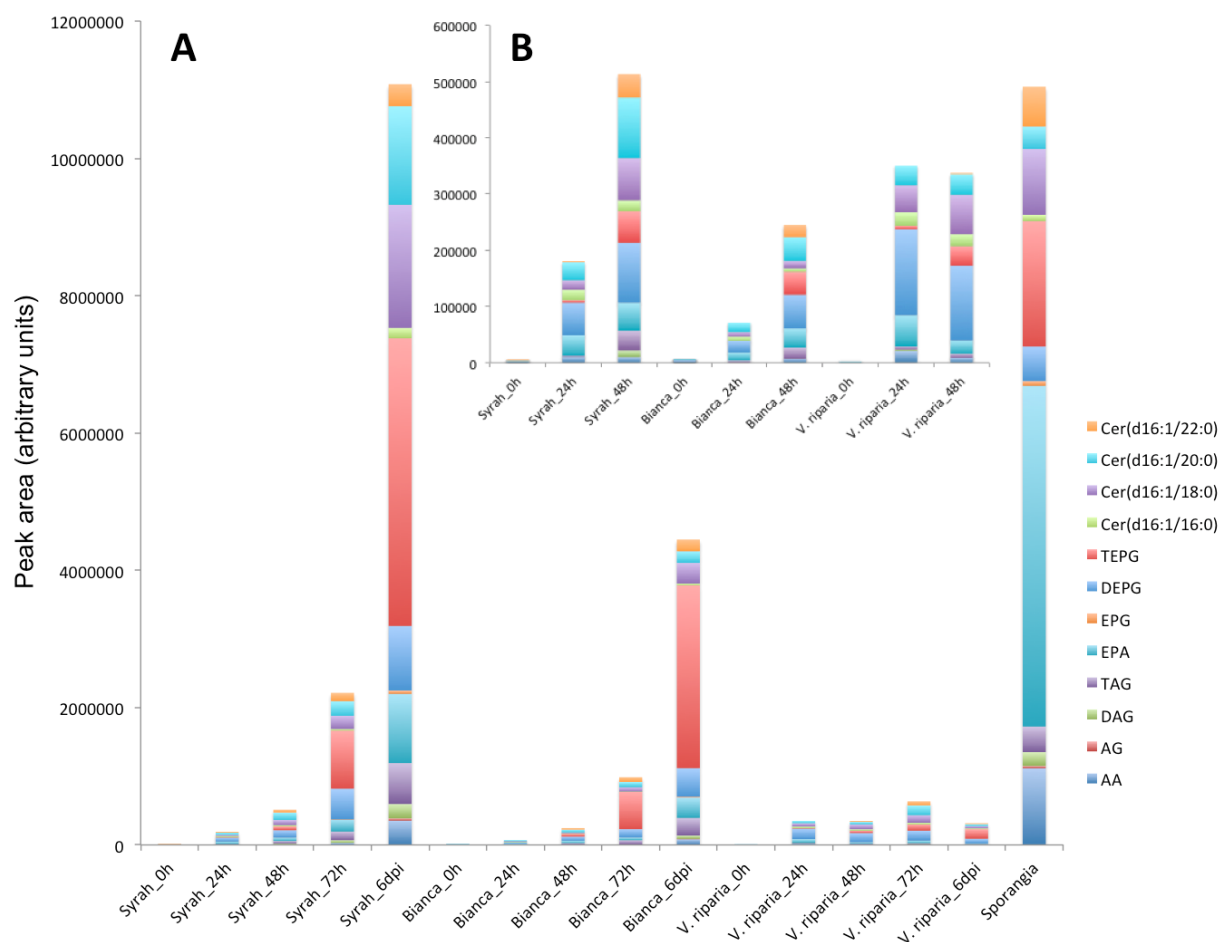
compound	19	40	73	97	<i>Cer(d16:1/16:0)</i>	<i>Cer(d18:1/20:0)</i>
structure	<i>Cer(d16:1/16:0)</i>	<i>Cer(d16:1/18:0)</i>	<i>Cer(d16:1/20:0)</i>	<i>Cer(d16:1/22:0)</i>		
RT (min)	1.6	2.08	2.74	3.72	1.6	4.20
Chemical formula	$C_{32}H_{63}O_3N$	$C_{34}H_{67}O_3N$	$C_{36}H_{71}O_3N$	$C_{38}H_{75}O_3N$	$C_{32}H_{63}O_3N$	$C_{38}H_{75}O_3N$
fragments						
[M + H] <sup>+</sup>	510.4877	<i>538.5189</i>	<i>566.5502</i>	<i>594.5818</i>	510.4877	594.5819
[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	<b>492.4773</b>	<b>520.5084</b>	<b>548.5399</b>	<b>576.5713</b>	<b>492.4772</b>	<b>576.5714</b>
[M-2H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	474.4667	<i>502.4979</i>	<i>530.5294</i>	<i>558.5609</i>	474.4667	558.561
[M-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> Sphingosine	462.4665	490.4981	518.5301	546.5604	462.4665	546.5615
fragment N	236.2371	<i>236.2371</i>	<i>236.2371</i>	<i>236.2372</i>	236.2372	264.2683
fragment N'	254.2476	<i>254.2476</i>	<i>254.2476</i>	<i>254.2476</i>	254.2476	282.2791
fatty acid						
fragment A	256.2635	<i>284.2945</i>	<i>312.3257</i>	<i>340.3574</i>	256.2631	312.326
fragment B	298.2754	<i>326.3051</i>	<i>354.3357</i>	<i>382.3681</i>	298.2751	354.3366
fragment C	328.2844	<i>356.3156</i>	<i>384.3467</i>	<i>412.3784</i>	328.2846	384.3474

**Table S3:** APCI(+)<sup>MS</sup> data for ceramides from *P. viticola* (n° 19, 40, 73, 97) and for the commercial ceramide standards Cer(d16:1/16:0) and Cer(d18:1/20:0). For fragments nomenclature, see Figure S1. The most abundant fragments in each spectrum is indicated in bold. Fragments listed in XCMS table are in italics. For all ions, error in mass accuracy is under 1 ppm.



**Fig. S1:** Mass spectrum of putative Cer(d16:1/18:0) (M521T125, n°37) from *P. viticola*. The fragmentation giving rise to the main fragments is indicated.





**Fig. S2:** Analysis of downy mildew infection in different grapevine cultivars

Grapevine cultivars with different susceptibility to downy mildew were used: *V. vinifera* cv Syrah (fully susceptible), *V. vinifera* cv Bianca (partially resistant) and *V. riparia* (resistant).

A. Leaf discs were analyzed for *Plasmopara*-specific lipids 0h, 24h, 48h, 72h and 6 days post inoculation (dpi) with *P. viticola*. As a comparison, a typical lipid profile of sporangia of *P. viticola* is indicated. B. Enlargement for early infection times (0h-48h). All samples were triplicates and means are presented.

*Chapitre II :*  
*Analyse qualitative et*  
*quantitative de l'infection de la*  
*vigne par *Plasmopara viticola**

---



# CHAPITRE II : Analyse qualitative et quantitative de l'infection de la vigne par *Plasmopara viticola*

---

## **1. Caractérisation histologique de l'interaction entre *V. vinifera* cv. Bianca et des souches compatibles ou incompatibles de *P. viticola***

### **1.1 Contexte**

L'apparition du contournement de résistance de la variété Bianca, et plus généralement, du facteur de résistance *Rpv3*, par l'isolat Lednice de *P. viticola* souligne la nécessité d'étudier les processus qui sous-tendent la résistance de la vigne au mildiou. L'acquisition de ces connaissances est un préalable à la création de nouvelles variétés de vignes dotées de résistances multigéniques combinant l'expression de différents mécanismes de défenses, et réduisant ainsi potentiellement le risque d'adaptation du pathogène. En général, l'étude des processus de résistance s'appuie sur la confrontation d'un isolat de mildiou à plusieurs génotypes de vigne différents tant par leur niveau de résistance que par leur fond génétique. L'inconvénient majeur de ce type d'analyse est la difficulté à distinguer les effets dus aux facteurs étudiés de ceux dus à des changements dans le fond génétique des variétés comparées. Le modèle Bianca présente l'avantage unique de permettre la comparaison d'une interaction compatible à une interaction incompatible avec *P. viticola* sur le même matériel végétal.

Dans l'objectif d'étudier les mécanismes impliqués dans la résistance de la variété Bianca au mildiou, une première approche microscopique a été nécessaire afin de déterminer la cinétique d'infection de l'isolat virulent Lednice, et de visualiser les conséquences de l'infection en comparaison à celle de l'isolat avirulent Colmar.

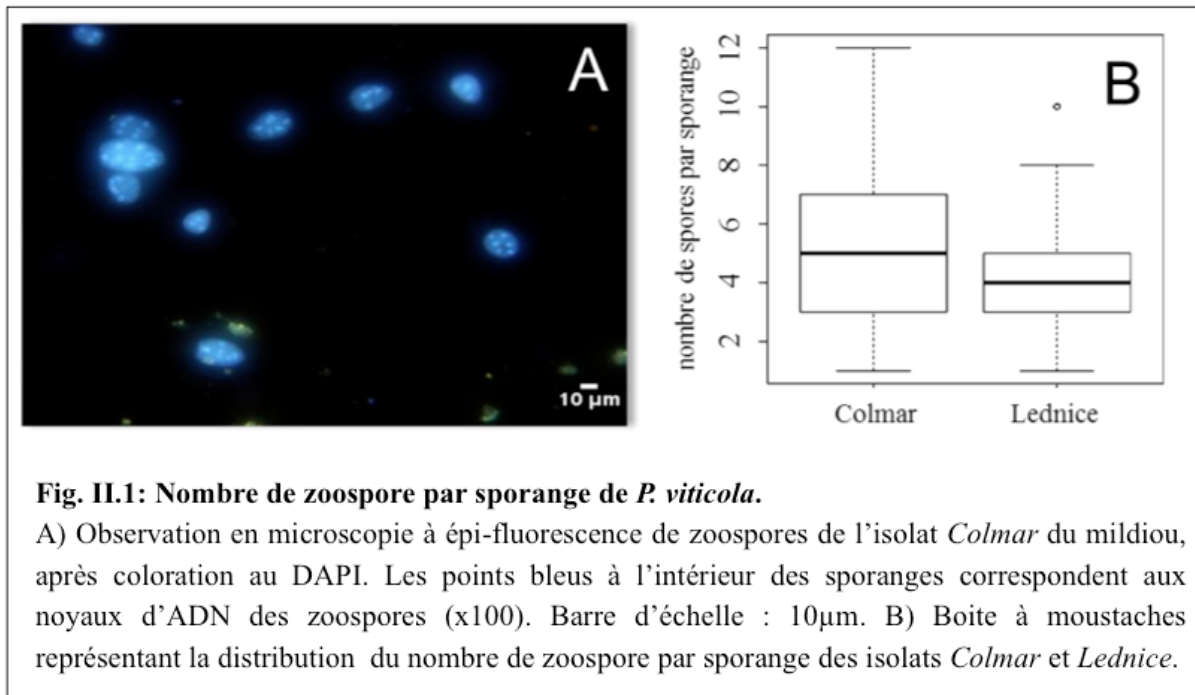
## *1.2 Efficacité d'infection de l'isolat Lednice*

La capacité infectieuse des Oomycètes peut être évaluée selon trois critères. En premier lieu, le nombre de zoospores émises par sporange est un aspect important de la virulence. Les sporanges sont essentiels pour la dissémination de la maladie, puisqu'elles protègent et permettent le transport des spores de mildiou sur de nouvelles feuilles à infecter. Un nombre élevé de zoospores par sporange accroît les probabilités de l'émergence d'une nouvelle infection. Par la suite, les zoospores libérées par les sporanges doivent s'accrocher de manière efficace au niveau d'un stomate. Un nombre important de zoospores autour d'un même stomate augmente l'efficacité d'infection. Enfin, la germination de la spore et la formation du premier haustoria autorise les premiers échanges avec la cellule végétale, et le début de la phase biotrophe du cycle du mildiou. Il s'agit donc d'une étape critique, où la nature de l'interaction hôte-pathogène et l'amplitude de l'invasion à venir se décident. Afin de déterminer le pouvoir infectieux de Lednice, ces trois étapes ont été observées en microscopie, et comparées aux résultats obtenus lors de l'infection par l'isolat ordinaire Colmar.

### *1.2.1 Evaluation de la quantité de zoospores par sporange*

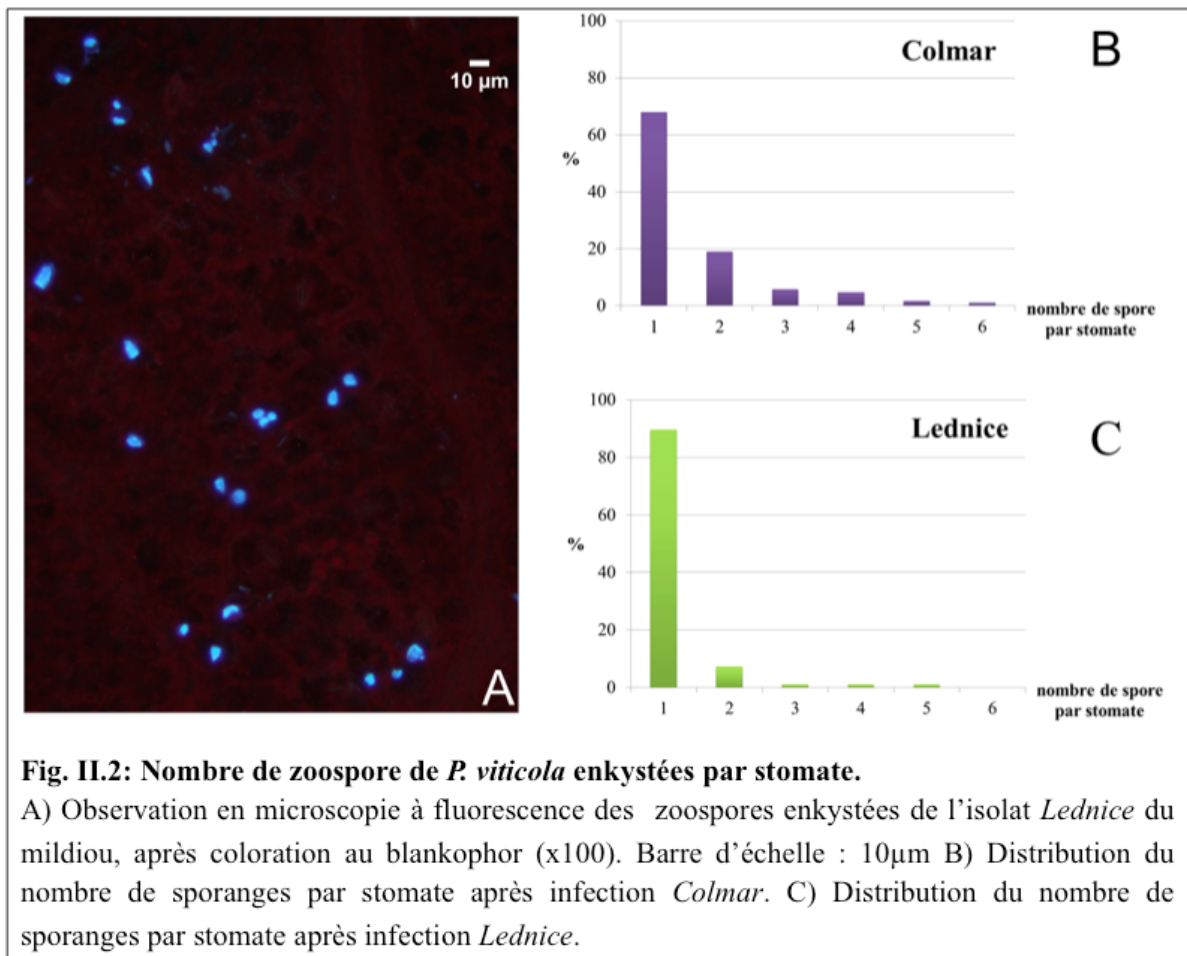
Le nombre de zoospores par sporanges a été déterminé à partir de suspensions de sporanges de Colmar et Lednice colorées au DAPI. Le DAPI est un fluorochrome capable de se lier fortement à l'ADN des zoospores, qui émettent alors une couleur bleue sous une source de lumière ultra-violette. Le nombre de zoospores contenues dans 300 sporanges de Colmar et Lednice a ensuite été quantifié.

Les sporanges de l'isolat Lednice contiennent moins de zoospores que celles de la souche Colmar (p-value :  $3,15 \cdot 10^{-5}$ ), avec respectivement une moyenne de 4,21 et 5,5 zoospores par sporanges. Par ailleurs, le nombre de spores observés dans les sporanges de Colmar présente plus de variation (écart type : 2.51) que dans les sporanges de Lednice (écart type : 1.68) (Fig. II.1).



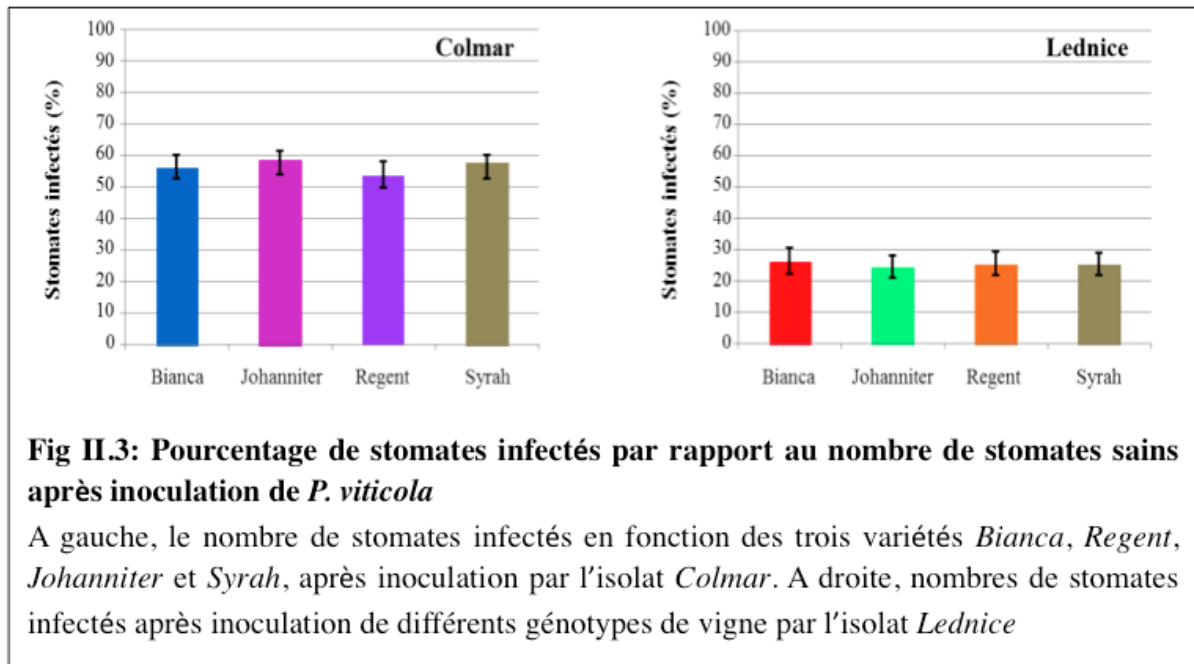
### 1.2.2 Nombre de zoospores enkystées par stomates

La capacité d'enkystement des zoospores des isolats Lednice et Colmar sur les feuilles de la variété Bianca a été observée au microscope à fluorescence 12 heures post-inoculation (hpi), après coloration au Blankophor. Ce colorant se lie d'une manière non-covalente aux polysaccharides de la paroi des zoospores, qui prennent une couleur bleue en lumière ultraviolette (Fig. II.2A). Le nombre de zoospores enkystées par stomate est faible et très variable pour les deux isolats. Une moyenne de 1,56 spores par stomate a été calculée pour l'isolat Colmar, et 1,16 spores pour l'isolat Lednice ( $p$ -value  $8,26 \cdot 10^{-9}$ ). Un maximum de 6 spores de Colmar, et de 5 spores pour l'isolat Lednice ont été observées autour d'un stomate (Fig. II.2B).



### 1.2.3 Nombre de stomates infectés 12 hpi

L'étude de la germination des zoospores des souches *Lednice* et *Colmar* a été effectuée sur des disques foliaires de Bianca, Johanniter et Regent prélevés 12 hpi. Les variétés Regent et Johanniter possèdent eux aussi le QTL de résistance Rpv3, associés à des QTL mineurs de résistance. La coloration des prélèvements au bleu d'aniline met en évidence les  $\beta$ -glucanes qui constituent, d'une part, la callose synthétisée par la plante en réponse à l'infection et, d'autre part, la paroi du mycélium du mildiou. Sous lumière ultra-violette, ces structures émettent une fluorescence bleue. L'efficacité d'infection est relativement homogène, et ne dépend que de l'isolat inoculé (Fig. II.3). En effet, le nombre de stomates infectés est moins important lors de l'inoculation par l'isolat *Lednice*, soit de 23 à 28% selon les variétés contre 53 à 59 % avec l'isolat *Colmar*.



#### 1.2.4 Propagation du mycélium et symptômes de résistance

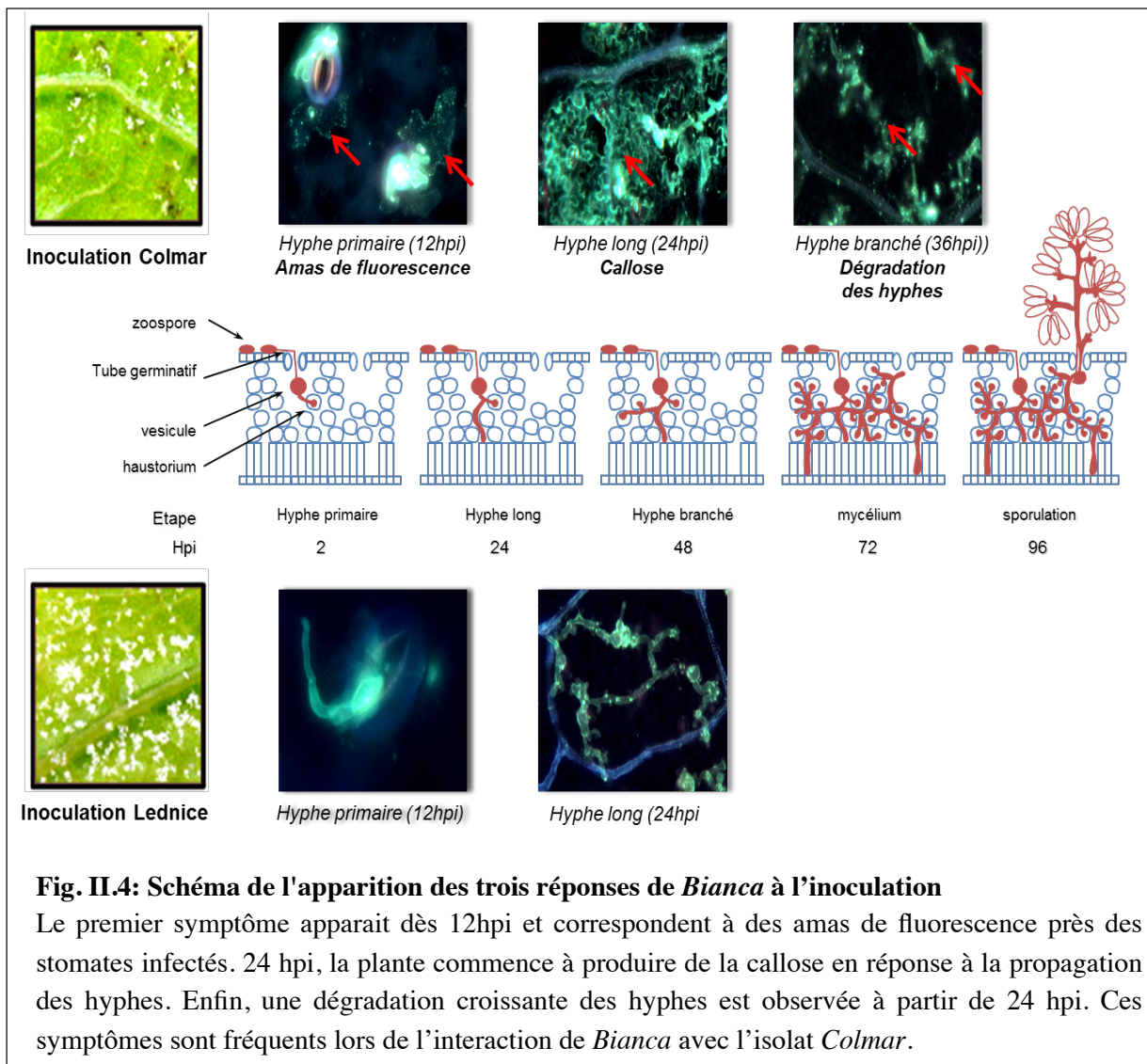
Le développement des isolats *Lednice* et *Colmar* a été suivi dans la variété *Bianca*, *Johanniter*, *Regent* et la variété sensible *Syrah*. Des disques foliaires ont été prélevés sur chaque feuille au temps 12, 24, 36 et 48 hpi, puis colorés au bleu d'aniline. Cette coloration a permis d'identifier trois événements successifs de réponses de la plante à l'infection par le mildiou (Fig. II.4), qui se caractérisent par l'un des types de symptômes suivants :

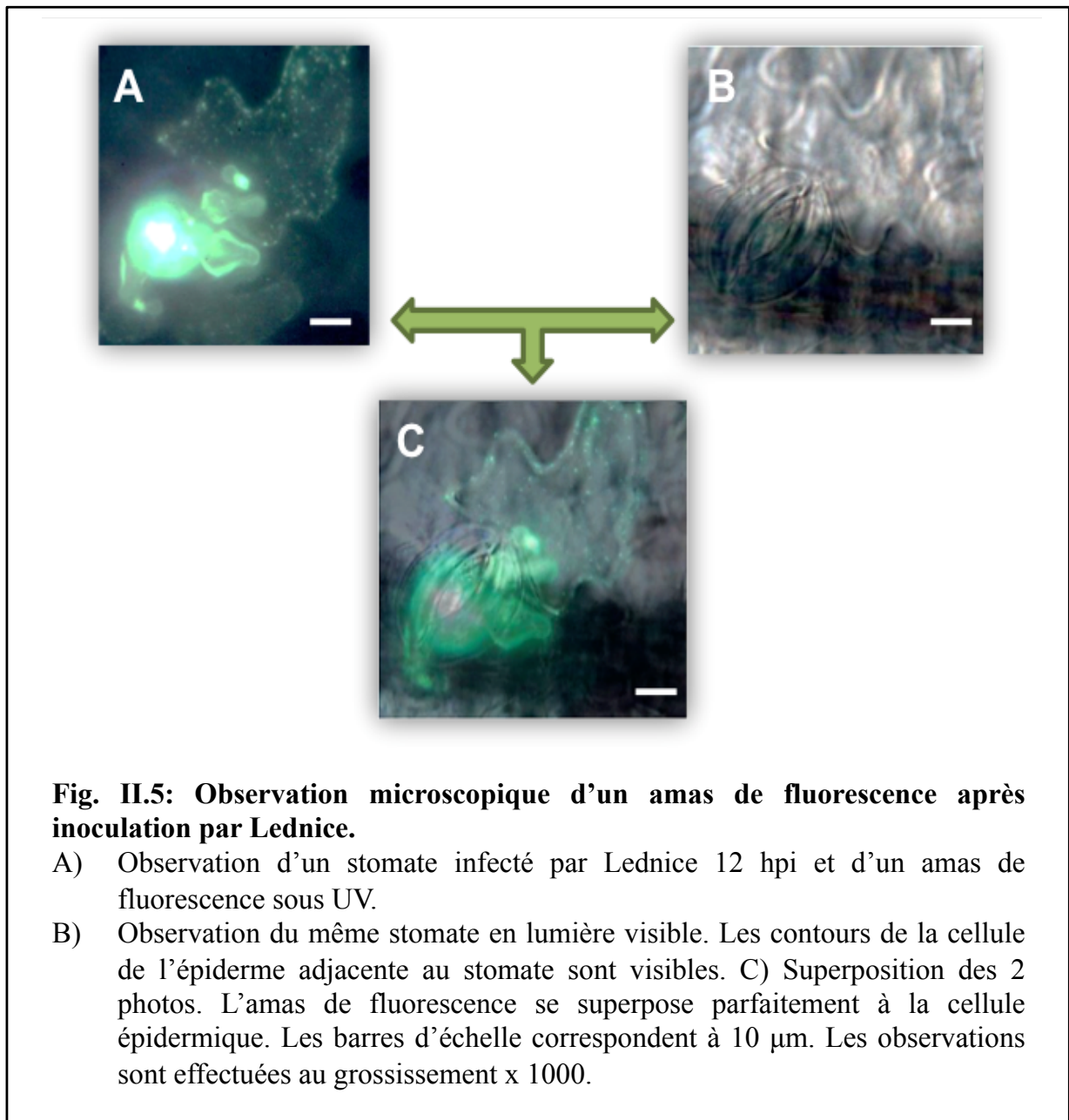
L'inoculation de *Bianca* induit une réponse précoce de la feuille dès 12 hpi durant l'interaction incompatible. Elle se manifeste par l'apparition d'amas diffus de points de fluorescence au niveau de l'épiderme, à proximité du point d'entrée du pathogène. En superposant les photos de fluorescence avec des photos prises en lumière visible, il apparaît que cet amas correspond à la réaction d'une cellule de l'épiderme (Fig. II.5).

A partir de 24 hpi, une importante fluorescence que nous supposons due à la production de callose est observée.

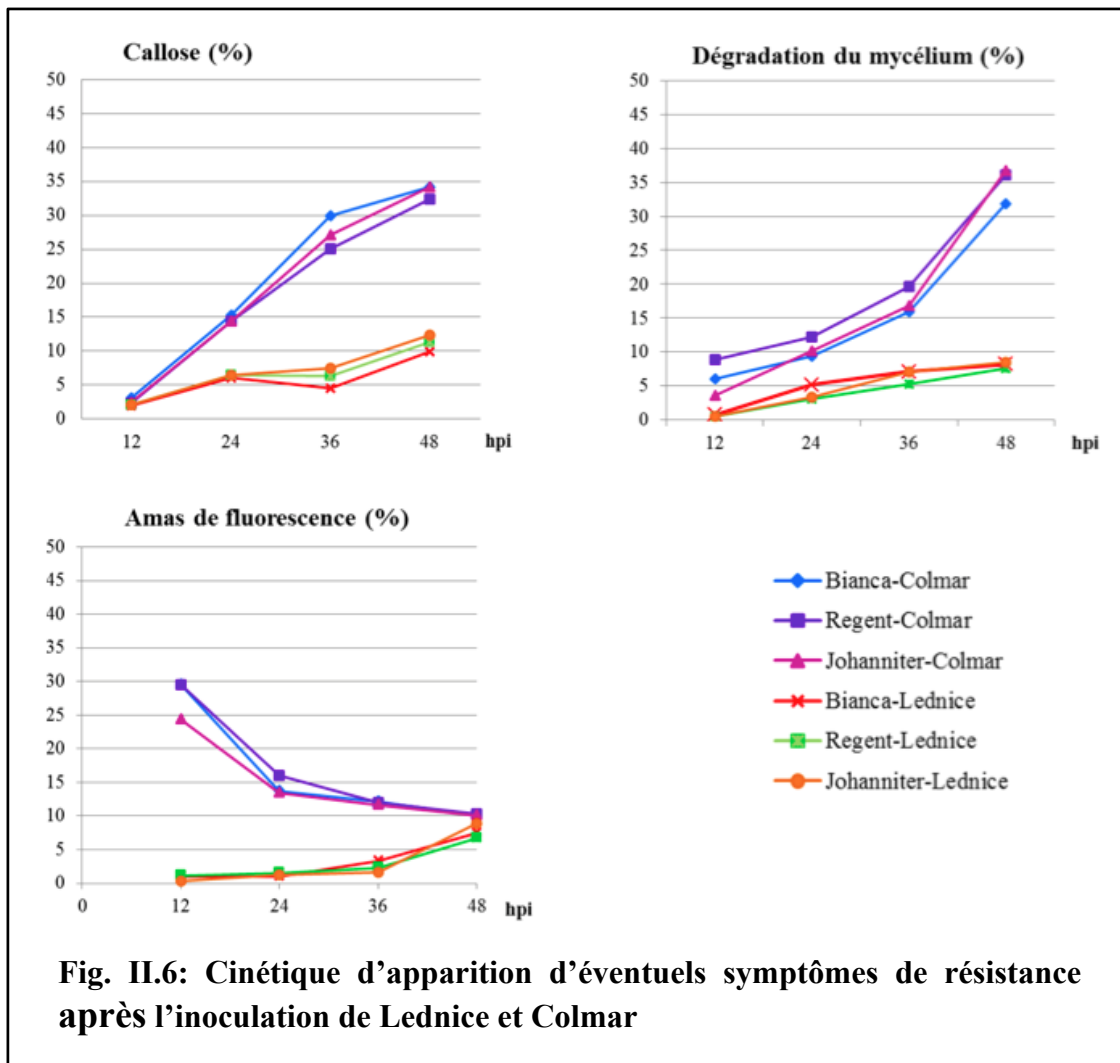
Puis à 36 hpi, le mycélium du pathogène commence à se dégrader (Fig. II.4).







La cinétique d'apparition de ces trois phénomènes diffère fortement selon l'isolat inoculé (Fig. II.6). La quantité de callose formée est faible après infection par la souche Lednice, et n'excède pas 10% 36 hpi. Les amas de fluorescence diminuent avec le temps lors de l'infection par l'isolat Colmar, tandis qu'ils augmentent lentement après l'inoculation par Lednice, mais restent très peu fréquents. Enfin, la dégradation du mycélium augmente rapidement lors de l'interaction incompatible, jusqu'à plus de 40% 36 hpi, tandis qu'elle reste très faible après l'infection par Lednice.



### 1.2.5 Conclusion

La capacité d'infection de l'isolat Lednice a été estimée sur trois critères, en comparaison à l'isolat commun Colmar : le nombre de zoospores par sporange, le nombre de spores enkystées par stomates, et le nombre de stomates infectés à 12 hpi. L'observation en microscopie a mis en évidence un pouvoir infectieux général de Lednice plus faible que celui observé pour l'isolat Colmar.

L'analyse cinétique de la propagation de l'isolat Colmar dans trois variétés de vigne exprimant le QTL de résistance Rpv3 a permis d'identifier et de localiser trois phénomènes consécutifs à l'expression de la résistance au cours du temps. Dans l'ordre d'apparition, il s'agit de la formation d'amas de fluorescence, de la production de callose, et enfin de la dégradation du mycélium du pathogène.

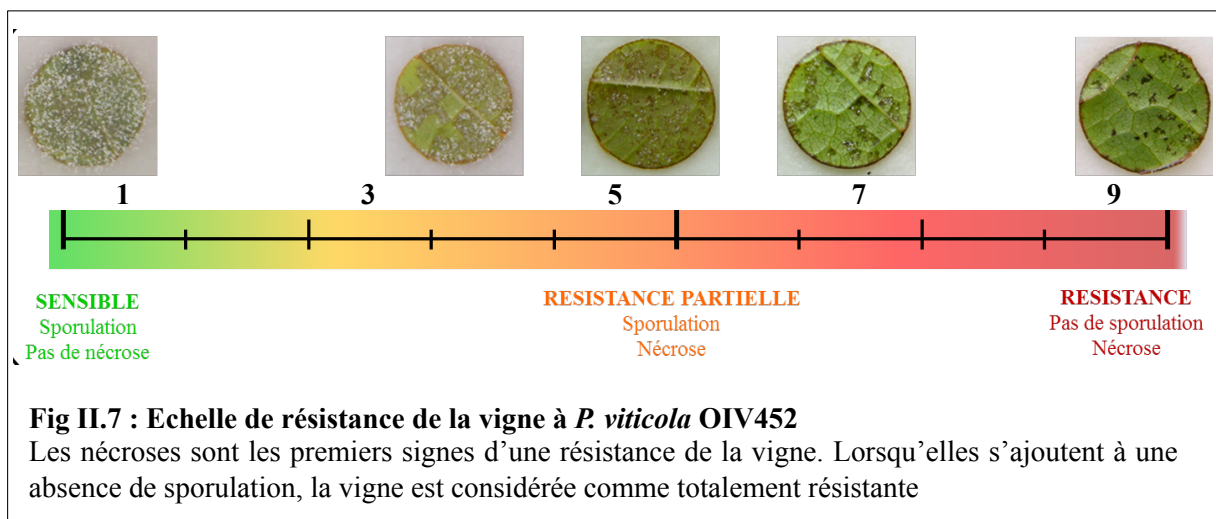
## 2. Analyse quantitative de l'infection par *P. viticola*

### 2.1 Contexte

La quantification précise du développement de l'infection est une étape importante dans l'étude de l'interaction hôte-pathogène, et différentes approches et outils sont disponibles pour l'évaluer dans le cas de l'interaction vigne-mildiou.

#### 2.1.1 Notation visuelle

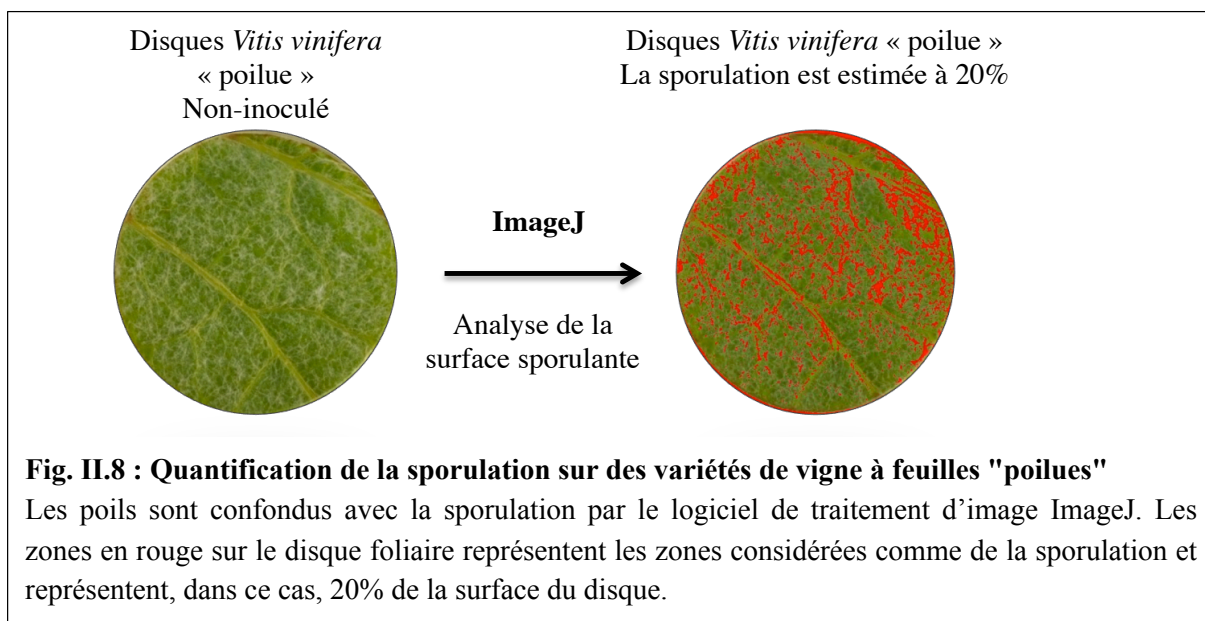
La notation visuelle des symptômes visibles à l'extérieur de la feuille permet d'estimer le développement de la maladie au cours du temps. Elle prend en compte l'évaluation de la sporulation du pathogène et l'apparition éventuelle de nécroses, signes de l'invasion mycélienne du mésophylle ou de l'induction des mécanismes de défense de la plante. Les génotypes de vignes analysés sont ensuite classés en cinq catégories de résistance, d'après une échelle semi-quantitative de résistance au mildiou allant de 1 (très sensible) à 9 (totalement résistant), suivant les critères de l'Office International de la Vigne et du Vin (OIV ; Anonymous 1983), appelée OIV 452 (Fig. II.7).



Cette méthode semi-quantitative permet d'estimer de façon non-destructive le développement de la maladie au cours du temps. Mais, se limitant aux symptômes tardifs, elle ne permet pas de rendre compte des stades précoces de l'infection. Par ailleurs, ce type d'évaluation de l'infection possédant une part de subjectivité, les résultats peuvent varier en fonction de l'observateur.

### 2.1.2 Quantification de la sporulation

Une quantification de la sporulation peut être effectuée par l'utilisation d'un compteur à cellules. Les disques foliaires sont alors lavés afin d'obtenir une suspension de spore à analyser. Bien que précise, cette technique a le défaut de détruire les échantillons lors des lavages. L'analyse d'image des disques foliaires est une alternative non-destructive et à haut débit au compteur de cellules (Peressotti *et al.*, 2011). Cependant, la présence de poils sur les feuilles, fréquente parmi les variétés de *V. vinifera*, peut biaiser les résultats puisqu'ils ne sont pas différenciables des sporangiophores (Fig. II.8).



### 2.1.3 L'observation microscopique.

L'observation microscopique est une technique classique lors d'études de l'interaction entre *V. vinifera* et *P. viticola*. Elle autorise un suivi en cinétique de la croissance du mildiou dans la feuille ainsi que des réponses histologiques de la plante. Cependant, il s'agit d'une technique destructive et chronophage, qui requiert plusieurs jours de préparation lors de la coloration des échantillons et du traitement des clichés obtenus. De plus, la fixation du bleu d'aniline sur le mycélium et la callose empêche la quantification du pathogène sur les plantes résistantes. Au cours de cette thèse plusieurs protocoles ont été testés afin de diminuer le temps de préparation et de permettre la quantification du mycélium (analyse d'images, diminution des temps d'incubation dans le méthanol). Cependant, aucun n'a permis d'amélioration

significative. Dans ce contexte, l'élaboration de nouveaux outils permettant l'évaluation quantitative et qualitative et cinétique du développement du pathogène semble une étape indispensable à l'étude de l'interaction du mildiou dans la vigne.

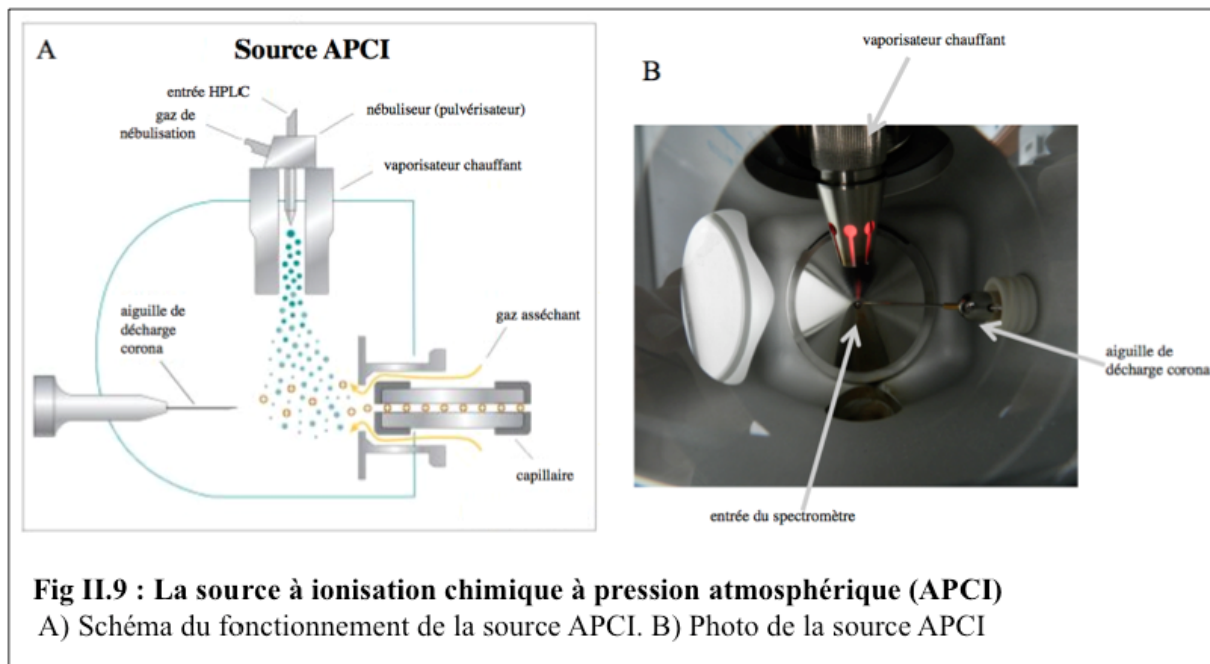
## ***2.2 Identification de lipides spécifiques au mildiou et quantification de biomasse du pathogène par une approche lipidomique***

### ***2.2.1 Présentation de l'outil d'analyse***

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est une technique d'analyse chimique qualitative et quantitative. Elle combine la séparation physique des composés entraînés par un solvant à travers une colonne (chromatographie liquide, LC) et la différenciation des molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (spectrométrie de masse, MS). L'extrait à analyser est injecté au niveau de la LC, et les molécules sont séparées au cours de leur élution selon leurs propriétés physico-chimique (polarité, en particulier). Dans notre cas, la colonne utilisée est constituée de microbilles de silices recouvertes de chaîne d'alkyle en C18. Plus les molécules sont apolaires, plus elles tendent à s'accrocher à la colonne. Elles sont ensuite transmises vers la source du spectromètre de masse. Les molécules sont ionisées et vaporisées au niveau de la source. Chaque ion détecté est donc reconnu par son temps de rétention sur la colonne (RT), son rapport masse/charge ( $m/z$ ) et son intensité de détection.

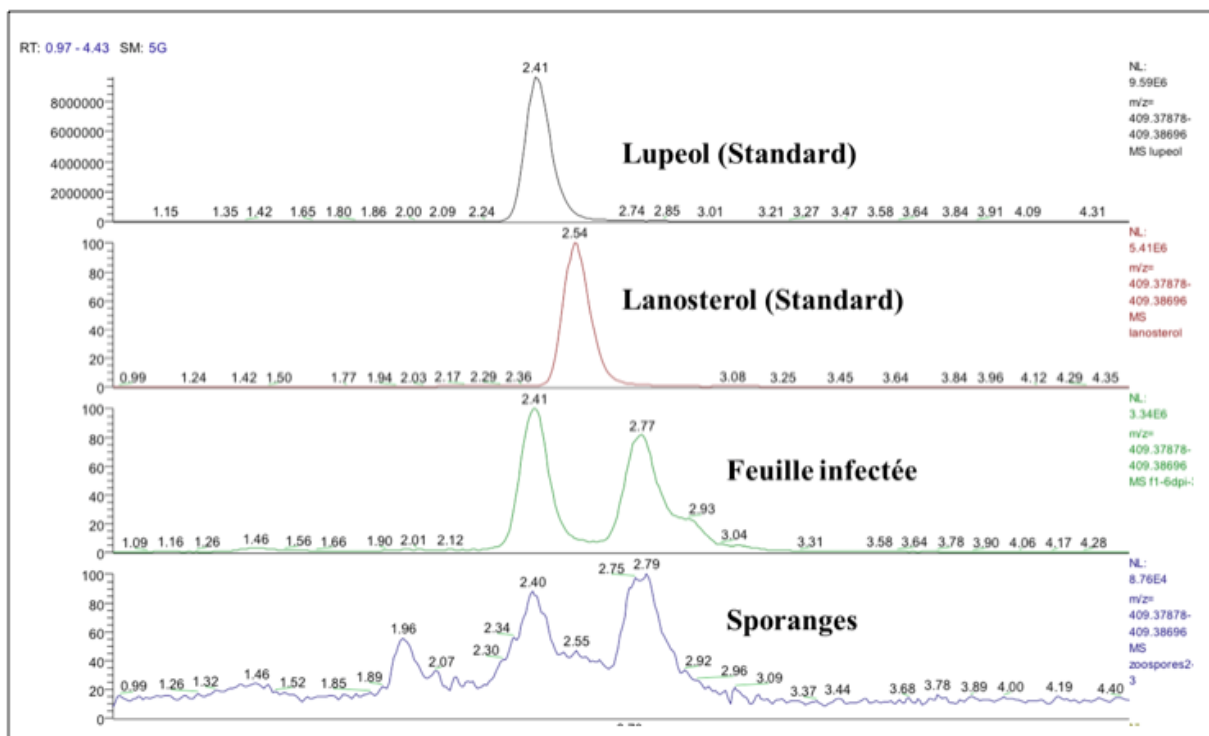
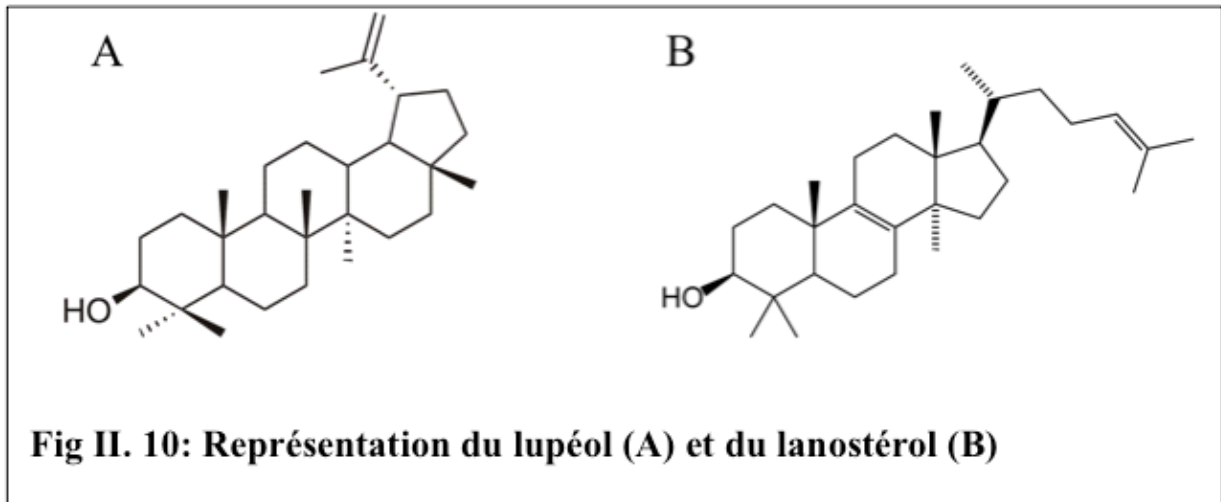
L'analyse des lipides a été effectuée à l'aide d'une source à ionisation chimique à pression atmosphérique ou APCI (Fig. II.9). Cette source est adaptée à l'ionisation des composés peu polaires et qui ne peuvent pas être ionisés par la source couramment utilisée (electrospray ou ESI). En entrant dans la source APCI les composés élués, ainsi que l'éluant, sont chauffés à 400°C, provoquant leur passage à l'état gazeux. L'éluant, à l'aide d'un nébulliseur à azote, passe à l'état d'aérosol. Il est ensuite ionisé grâce à une aiguille qui produit une décharge corona. L'ionisation des molécules s'effectue par le transfert d'espèces chargées produites au niveau de l'éluant ionisé. La tension appliquée et la différence de pression entre la source et l'entrée du spectromètre de masse permettent l'introduction des ions formés vers l'analyseur.





### 2.2.2 Caractérisation de nouveaux lipides chez *P. viticola*

L'étude des lipides de *P. viticola* dans le cadre de la recherche de nouveaux outils de quantification a débutée par la recherche d'un stérol caractérisé chez *P. viticola*, et généralement absent dans les tissus végétaux: le lanostérol (Hoehn-Thierry, 1992) (Fig. II.10). Cette molécule est propre au règne animal et n'est pas synthétisée par les plantes. Une première analyse a été effectuée par LC-MS sur des échantillons de feuilles infectées et de suspension de sporanges. L'identification formelle du lupéol, un stérol de plante, et du lanostérol, est réalisée par comparaison aux standards commerciaux correspondants. Comme prévu, le lanostérol, est détecté dans la suspension de sporanges et dans les tissus infectés. Cependant, il est présent en quantité insuffisante pour l'utiliser comme outils de quantification du mildiou. Le signal apparait noyé dans un ensemble de molécules possédant une formule brute identique (Fig. II.11), si bien que l'idée d'utiliser cette molécule pour la quantification de *P. viticola* a été abandonnée.



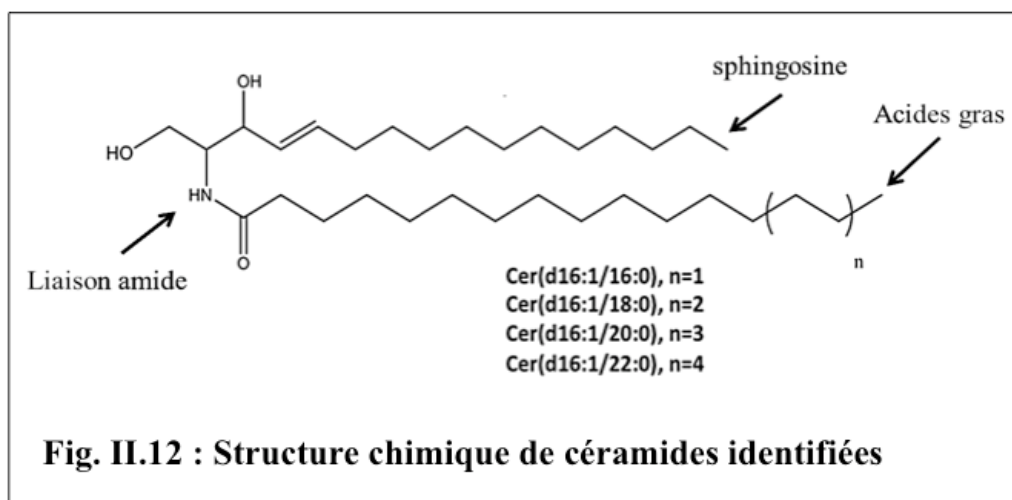
**Fig II. 11 : Courant d'ion extrait (EIC) du lanostérol et du lupéol.**

Le lupéol et le lanostérol sont identifiés à partir des standards à 2.41 min et 2.54 min, respectivement. Leur rapport  $m/z$  409,37838 est identique. Le lupéol est détecté au niveau des feuilles infectées, et dans la suspension de sporanges à 2.40 min. Dans la suspension de sporange, le pic correspondant au lanostérol est à peine détectable.

Une analyse non-ciblée a donc été entreprise (voir Chapitre I). La comparaison d'extrait de feuilles de vignes inoculées, non inoculées et de suspensions de sporanges, a permis la mise en évidence d'un pool de lipides spécifiquement produits par le mildiou. Ces lipides ont été identifiés comme étant l'acide arachidonique (AA) et eicosapentaénoïque (EPA), leurs dérivés mono, di, et triglycérides (AG, DAG, TAG pour les dérivés de l'AA, et EPG, DEPG, TEPG

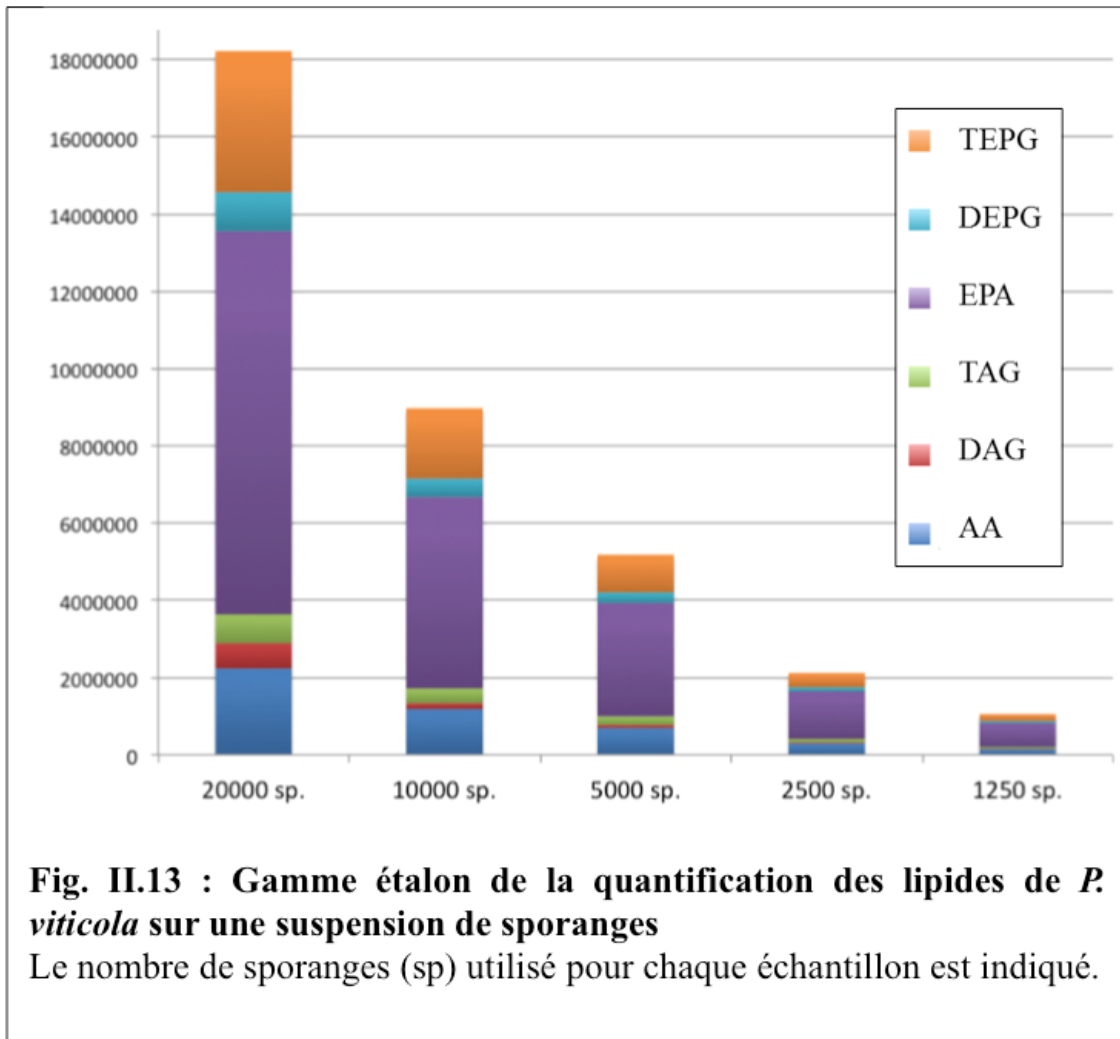


pour les dérivés de l'EPA), ainsi qu'une famille de céramides. Les céramides sont des molécules résultant de la combinaison d'un acide gras avec la sphingosine via une liaison amide. Des sphingolipides contenant une sphingosine en C16:1 ont déjà été détectés chez différents oomycètes (Lhomme *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1998). Cependant, les céramides Cer(d16:1/16:0), Cer(d16:1/18:0), Cer(d16:1/20:0) et Cer(d16:1/22:0) identifiés ici chez *P. viticola* (Fig. II.12) n'avaient jamais été caractérisés chez des oomycètes.

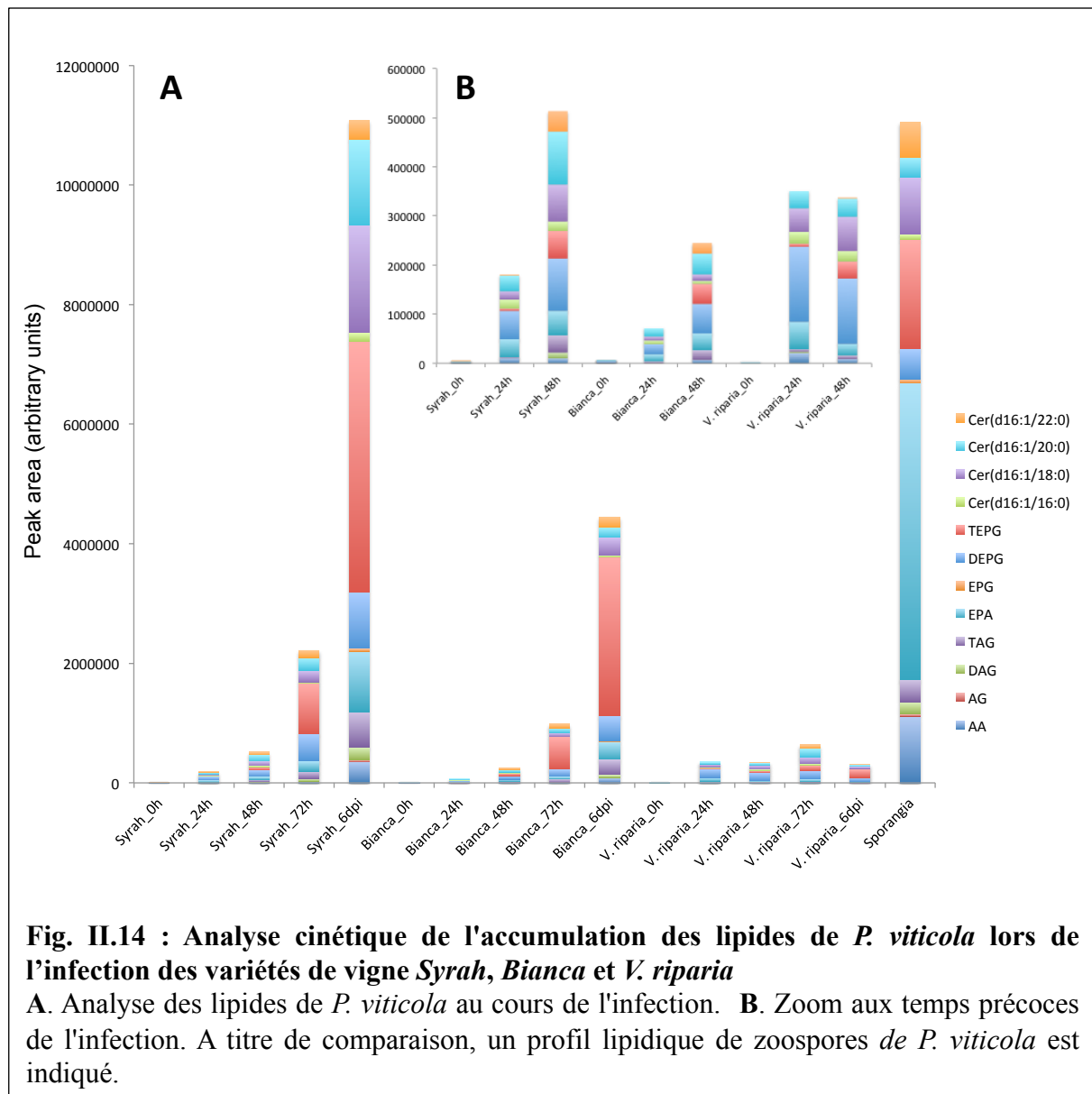


### 2.2.3 Utilisation des lipides caractérisés pour la quantification du développement de *P. viticola*

L'identification de lipides spécifiques au mildiou offre de nouvelles perspectives pour le suivi des infections par ce pathogène. Afin d'estimer la limite et la linéarité de leur détection, une gamme étalon de sporanges a été analysée par LC-MS. Les résultats obtenus témoignent d'une bonne linéarité et d'une excellente sensibilité dans la détection des lipides (Fig. II.13). Une analyse cinétique des lipides a été effectuée à partir de disques de disques foliaires issus de trois feuilles de la variété Syrah (sensible), Bianca (partiellement résistante), et *V. riparia* cv *Gloire de Montpellier* (résistante). Des disques foliaires des feuilles infectées par un inoculum de l'isolat Colmar ont été prélevés à 0 (avant inoculation), 24, 48, 72 hpi, et 6 jours post-inoculation (jpi).

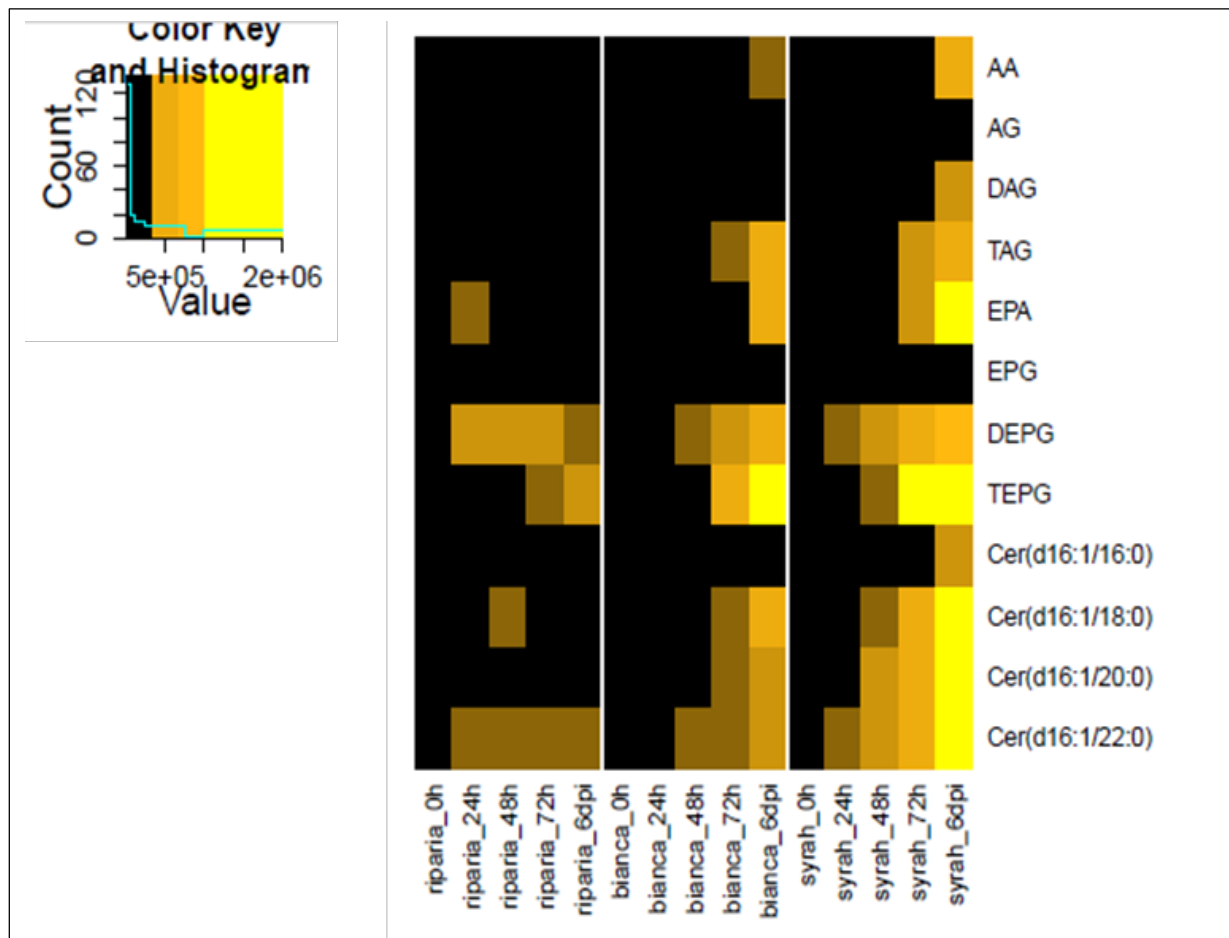


Les résultats obtenus (Fig. II.14) montrent que la LC-MS est une technique suffisamment sensible pour détecter les lipides à un temps précoce d'infection (24 hpi), et cela même sur la variété résistante *V. riparia* cv *Gloire de Montpellier*. Les lipides de *P. viticola* ne sont pas détectés dans les échantillons de feuilles non-inoculées. Les quantités et les cinétiques d'accumulation des lipides sont cohérentes avec le niveau de résistance des variétés de vignes utilisées. L'accumulation des lipides augmente de manière exponentielle durant l'infection de la variété Syrah. Une augmentation d'amplitude moins importante est observée au cours de l'infection de Bianca. Enfin, la détection des lipides de *P. viticola* est stable au cours de l'infection de *V. riparia*.



#### 2.2.4 Evolution de la composition lipidique de *P. viticola* au cours de l'infection

Une modification du profil lipidique de *P. viticola* au cours de l'infection est observée. Dans la variété sensible Syrah, les dérivés glycérides de plus en plus complexes de l'AA et de l'EPA apparaissent au cours de l'infection. Aux stades précoces, l'AA et l'EPA sont les lipides majeurs tandis que plus tard, les glycérides DEPG et TEPG sont détectés avec le plus d'intensité. Les céramides à plus courtes chaînes d'acides gras sont détectés plus tardivement que le céramide Cer(d16:1/22:0) qui est présent dans les échantillons dès 24 hpi.



**Fig. II.15: Heatmap représentant la répartition des lipides de *P. viticola* au cours de l'infection des variétés Bianca, Syrah et *V. riparia***

Des feuilles des variétés de vigne *Syrah*, *Bianca*, *V. riparia* ont été inoculées par l'isolat *Colmar* de *P. viticola*. L'infection est été analysée en 5 temps : 0h (pré-inoculation), 24, 48, 72 hpi et 6jpi. Les molécules quantifiées sont l'acide arachidonique (AA) et ses dérivés mono- (AG), di- (DAG), et triglycéride (TAG), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) mono- (EPG), di- (DEPG), et triglycéride (TEPG), ainsi que les céramides Cer(d16:1/16:0), Cer(d16:1/18:0), Cer(d16:1/20:0) et Cer(d16:1/22:0). Le seuil de détection significative a été fixé à  $10^4$ .

Dans la variété Bianca, l'AA et ses dérivés, ainsi que les céramides, sont peu détectés. Le DEPG et la céramide Cer(d16:1/22:0) sont observés dès 24 hpi, le TEPG n'étant détecté qu'à partir de 48 hpi. Enfin, en accord avec son haut niveau de résistance, peu de lipides de *P. viticola* sont détectés au cours de l'infection de *V. riparia* (Fig. II.14; Fig. II.15). En fin d'infection du génotype sensible, au moment de la sporulation, la composition des lipides détectés diffère significativement de la composition des zoospores (Fig. II.14). Ceci suggère que, malgré l'abondance de la sporulation qui recouvre les disques, la majorité des lipides

détectés ne provient pas des spores mais des hyphes, dont la majeure partie n'est pas visible car distribuée au sein des tissus foliaires.

### **2.2.5 Conclusions et perspectives**

L'analyse par LC-MS semble être une technique très prometteuse pour quantifier le développement du mildiou. En raison de sa sensibilité elle autorise une estimation du développement du mildiou dès 24 hpi. L'intensité des lipides détectés est cohérente avec le niveau de résistance connu des variétés de vigne analysées et le niveau de développement de l'infection. Cette technique pourra sans doute être adaptée à la détection et à l'analyse dynamique du développement d'autres oomycètes. La même stratégie pourra être appliquée à d'autres pathogènes fongiques.

Une modification de la teneur en lipides de *P. viticola* est observée au cours de l'infection, et trois profils lipidiques ont été caractérisés selon le niveau de résistance des plantes inoculées. L'analyse fine du profil lipidique pourra sans doute permettre de mieux suivre les stades du développement du pathogène, y compris aux stades précoces de l'infection où celui-ci n'est pas visible.

## **2.3 Développement d'une méthode de quantification de la biomasse de mildiou par PCR quantitative**

En complément de l'approche lipidomique, nous avons développé une méthode de quantification de l'ADN du pathogène par PCR quantitative. Les performances de ces deux méthodes ont ensuite été évaluées et comparées sur les mêmes feuilles inoculées.

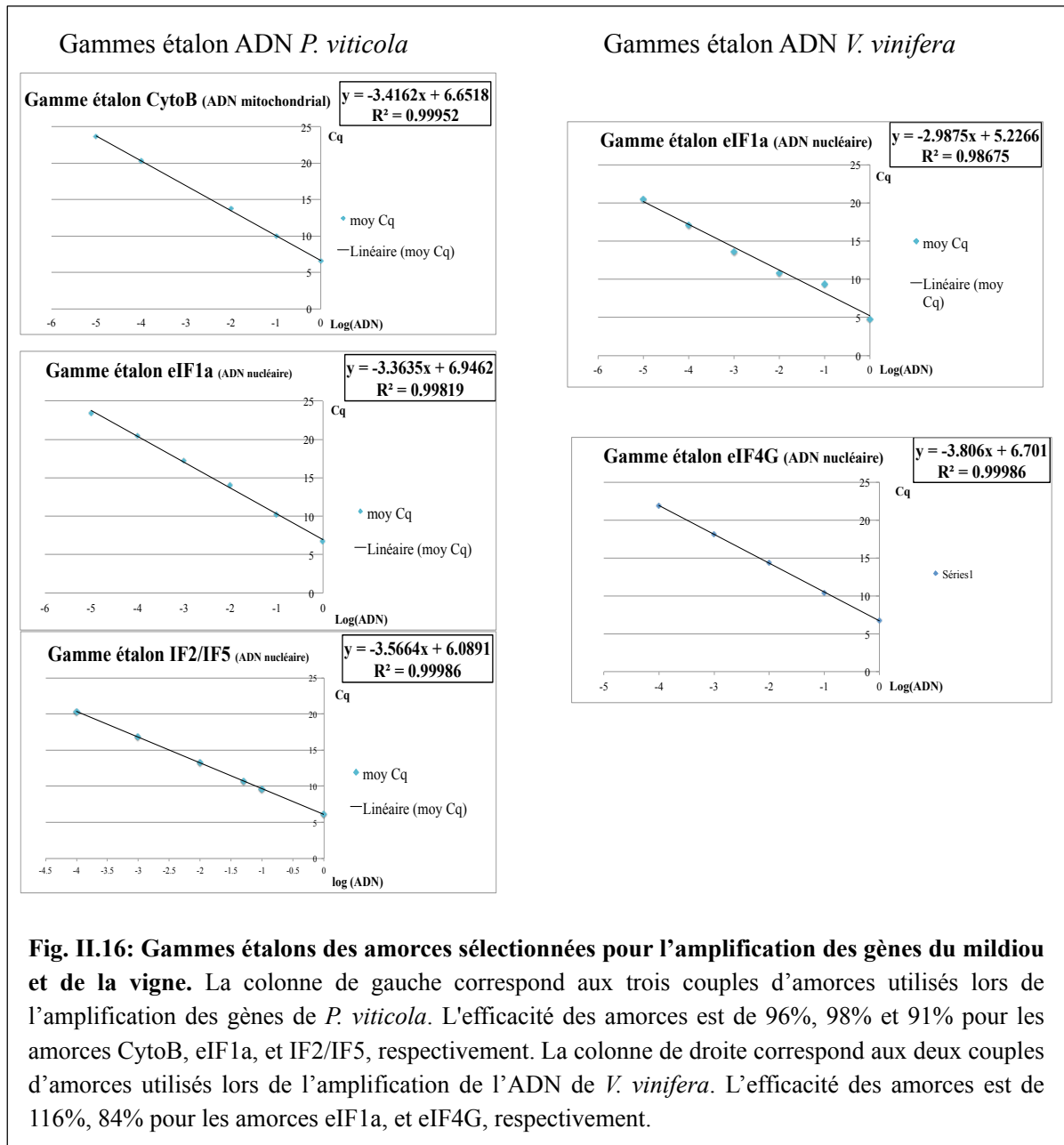
### **2.3.1 Sélection des amorces pour analyse en PCR en temps réel (qPCR)**

Grâce à un programme de séquençage d'EST et du génome de *P. viticola* mené dans l'unité par Pere Mestre, les séquences d'un certain nombre de gènes mitochondriaux et nucléaires sont disponibles. La population et l'activité mitochondriale étant potentiellement corrélée à l'accroissement et l'activité physiologique du mycélium, deux couples d'amorces ciblant les gènes mitochondriaux CoX-2 (amorces Cox2) et Cytochrome B (amorces et gène CytoB) ont été sélectionnés. Parallèlement, trois paires d'amorces pour l'amplification des gènes nucléaires du facteur de traduction eIF1a, de l'actine et du facteur IF2/IF5 du mildiou ont

également été définies. Enfin, des paires d'amorces permettant d'amplifier des fragments des gènes nucléaires du facteur eIF4G, de l'actine, et de eIF1a de la plante ont été conçues, pour suivre la quantité d'ADN de la plante durant l'infection.

Les cinq paires d'amorces Cox2, cytoB, IF2/IF5, eiF4G et eIF1a ont été testées avec succès en PCR conventionnelle, sur l'ADN extrait de suspension de sporanges, de feuilles de vignes saines et inoculées par l'isolat Colmar de *P. viticola*. Cependant, la PCR classique n'étant pas une technique suffisamment quantitative, ces mêmes amorces ont été testées pour une approche de qPCR.

Le mildiou étant un parasite biotrophe stricte, les gammes étalons en qPCR des amplicons des gènes du mildiou ont été effectués à partir des produits correspondants amplifiés par PCR sur l'ADN de suspension de sporanges. Par souci d'homogénéité, la même technique a été adoptée pour les gammes étalon des gènes de *V. vinifera*. La paire d'amorces Cox2 a été abandonnée, la courbe d'amplification en qPCR n'étant pas satisfaisante. L'efficacité des qPCR a été estimée à partir des gammes étalons (Fig. II.16).

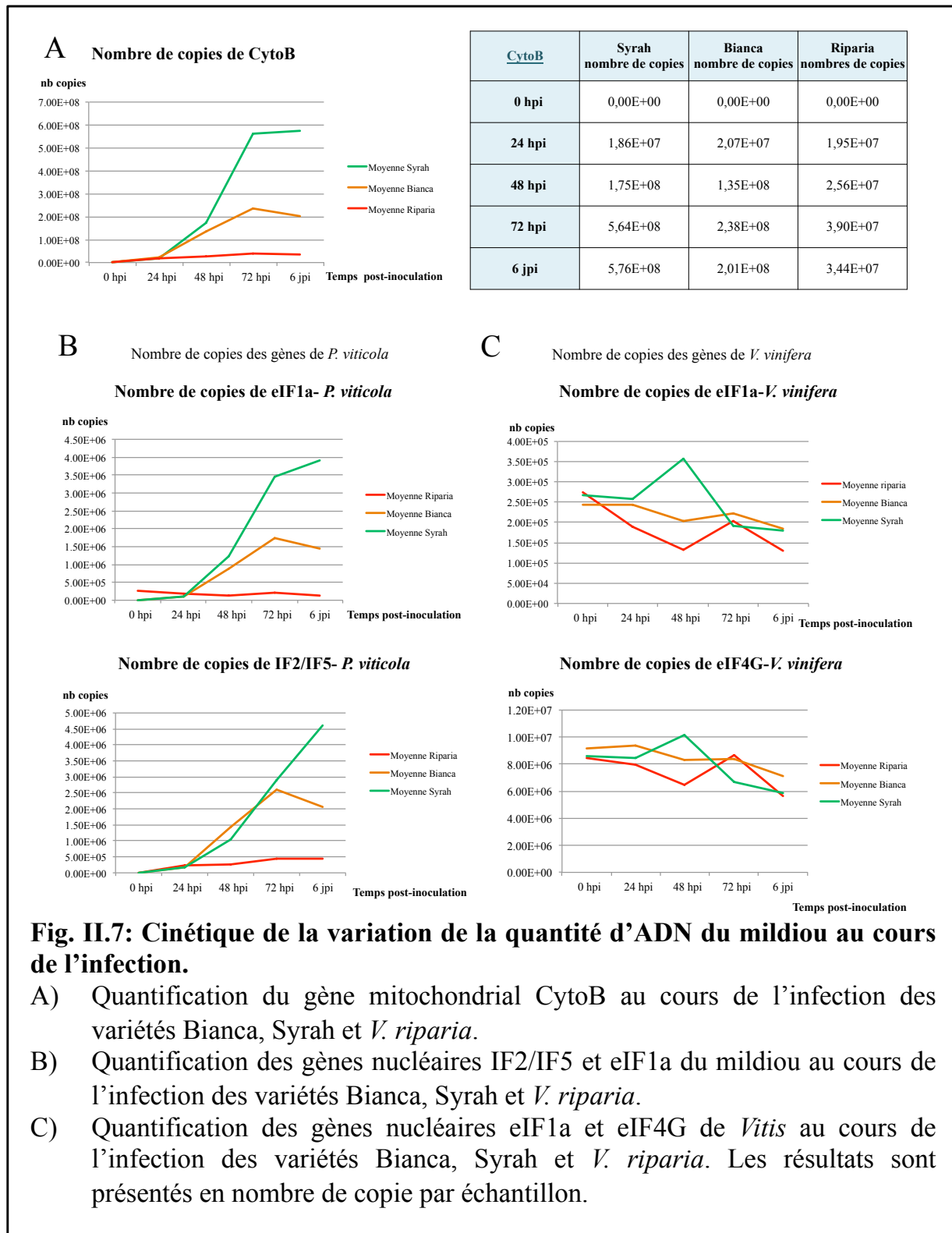


### 2.3.2 Quantification du développement de *P. viticola* par qPCR

L'ADN nucléaire du pathogène est très peu concentré dans les échantillons analysés (le nombre de copies des gènes IF2/IF5 et eIF1a est de l'ordre de  $1.10^6$ ), ce qui n'a pas empêché une bonne reproductibilité des résultats. Le nombre de copies du gène mitochondrial CytoB est évalué entre  $1,5.10^7$  et  $5,7.10^8$ , selon le type d'interaction et le temps de cinétique analysé. Le nombre de copies évalué avec les amorces eIF1A et eIF4G des gènes de *V. vinifera* est stable durant toute la cinétique d'infection (écart-types de eIF1a à 0,001 pour la variété Syrah, et 0,002 pour les variétés Bianca et Riparia ; écart-type de eIF4G à 0,07 pour la variété Syrah et

## CHAPITRE II : Analyse qualitative et quantitative de l'infection

Riparia, 0,03 pour la variété Bianca), signifiant que les concentrations de départ des échantillons analysés par qPCR étaient identiques.





D'après les résultats obtenus, la quantification de *P. viticola* par qPCR entre le moment de l'inoculation et 24 hpi est de faible intensité. Le nombre de copies du gène mitochondrial CytoB à 24 hpi est évalué à  $1,96.10^7$  en moyenne dans les trois variétés de vignes (Fig. II.17). Le nombre de CytoB augmente ensuite rapidement entre 24 hpi et 48 hpi dans les échantillons de feuilles Bianca et Syrah, atteignant respectivement  $1,75.10^8$  et  $1,35.10^8$  copies, tandis qu'elle se stabilise à  $2,56.10^7$  copies dans les échantillons de *V. riparia*. Entre 48 hpi et 72 hpi, l'accroissement du nombre de copies de génome mitochondrial ralentit légèrement dans les échantillons Bianca, tandis que ce nombre triple chez Syrah. En fin de cycle, la concentration du gène cytoB diminue chez Bianca, et se stabilise dans les échantillons Syrah. Le nombre de copie de génome mitochondrial augmente très légèrement durant l'infection de *V. riparia* et atteint  $3,44.10^7$  à 72 hpi. Ces résultats sont cohérents avec le niveau de résistance des plantes. Les résultats obtenus avec le couple d'amorce pour l'amplification du gène nucléaire eIF1a est cohérent avec ceux obtenus par l'amplification du gène CytoB. Par contre, le nombre de copies du gène IF2/IF5 détecté dans les échantillons Bianca et Syrah, ne suit pas la cinétique observée après amplification par les autres couples d'amorces. En effet, d'après ces résultats la quantité d'ADN nucléaire du pathogène semble augmenter plus rapidement dans les échantillons Bianca que dans les échantillons Syrah entre 24 hpi et 48 hpi.

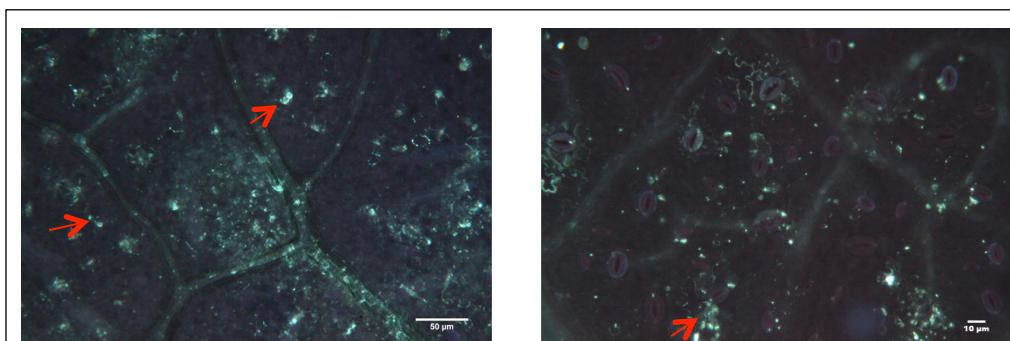
L'amplification du gène mitochondrial CytoB permet de travailler sur des concentrations plus élevées d'ADN, et donc moins sensible aux biais introduits lors de la préparation de la qPCR. Globalement, les cinétiques obtenues après amplification du gène mitochondrial CytoB et du gène nucléaire eIF1a sont très similaires.

### 2.3.3 Analyse visuelle de l'infection en microscopie

Les feuilles infectées et analysées en LC-MS et qPCR ont également été prélevées pour un suivi visuel de la cinétique en microscopie après coloration au bleu d'aniline (cf planches). Bien que ces données ne soient pas quantitatives, les variations dans le développement du mildiou entre les variétés de vignes semblent en accord avec les données obtenues en qPCR et LC-MS. Ces différences sont visualisables jusqu'à 48 hpi. La quantité de callose formée et l'état dégradé de la feuille et des structures de *P. viticola* rendent difficile l'observation du mycélium dans les variétés résistante.

Les trois réplicats biologiques des variétés Syrah, Bianca et Riparia ont été prélevés à 24, 48, 72 hpi, colorées au bleu d'aniline et examinées avec un microscope à épi-fluorescence. Bien que ces données ne soient pas quantitatives, les variations dans le développement du mildiou entre les variétés de vignes semblent en accord avec les données obtenues en qPCR et LC-MS. Néanmoins, des différences sont observées dans le développement de l'infection au sein des 3 réplicats biologiques effectués pour chaque variétés de vigne. Ces différences sont normales, car, bien que de même rang, différentes feuilles sont utilisées, ce qui conduit à un développement de la maladie globalement similaire, mais non identique.

A 24 hpi, le nombre de stomates infectés semble similaire entre les trois réplicats biologiques des variétés Bianca et Syrah, et *V. riparia*. A 48 hpi, le mycélium dans le réplicat n°1 des variétés Bianca et Syrah semble plus dense. Dans le réplicats n°3 de Bianca, le mildiou présente un léger retard de croissance. La propagation du pathogène dans la variété Riparia est très ralentie par rapport à Bianca et Syrah. A 72 hpi, le mildiou a complètement envahi la feuille n°1 de Syrah, les deux autres montrent une forte invasion du parenchyme. Au niveau des feuilles de la variété *V. riparia*, le mycélium ne se propage pas dans les feuilles. Les zones où *P. viticola* s'est développé au-delà du stade hyphe primaire sont rare, et le bleu d'aniline met en évidence de la callose et des débris de mycélium (Fig. II.18). En raison des mécanisme de défense de la plante, le mildiou croît péniblement jusqu'au stade d'hyphes long, mais est détruit avant le stade hyphes branchés.



**Fig. II.18: Destruction de *P. viticola* lors de son développement sur *V. riparia***

Disques foliaires de *V. riparia* observés après coloration au bleu d'aniline 24 hpi et 72 hpi. A) Prélèvement 24hpi. La barre d'échelle représente 50µm. B) Prélèvement 72hpi. La barre d'échelle représente 10µm. Les flèches rouges indiquent des structures de *P. viticola* encore identifiables

Durant cette cinétique d'infection, la variété Syrah ne présente pas de symptômes de résistance. Les deux autres variétés réagissent à l'infection dès 24 hpi et une grande majorité des hyphes du mildiou sont attaqués dans les feuilles de la variété *V. riparia*. La feuille n°3 de Bianca produit plus de callose que les deux autres réplicats, entraînant un ralentissement de la croissance du mildiou à 48 hpi. A 72 hpi, la croissance du pathogène dans la feuille n°1 de Bianca semble plus importante. Cependant, la quantité de mycélium, de callose et d'hyphe dégradés du mycélium créés trop de colorations parasites pour estimer l'évolution de la maladie de façon certaine. Les réactions de défenses de *V. riparia* sont tellement intenses que très peu d'hyphes restent intacts 72 hpi. Les réponses de défense sont très précoces dans cette variété et sont visibles dès 24 hpi.

### 2.3.4 Quantification de la sporulation 7 jpi

Un prélèvement à 7jpi a été effectué sur les feuilles étudiées afin quantifier la sporulation produite en fin d'infection (Tableau II.1). Les sporanges ont été mis en suspension par lavages des disques foliaires, puis la concentration des sporanges a été estimée à l'aide d'une lame de Malassez. L'intensité finale de sporulation sur les feuilles étudiées est cohérente avec leur niveau de résistance.

Génotypes	Inoculation Colmar sporange/mL
Bianca feuille 1	2,80.10 <sup>3</sup>
Bianca feuille 2	4,80.10 <sup>3</sup>
Bianca feuille 3	2,80.10 <sup>3</sup>
<i>V. riparia</i> feuille 1	8,52.10 <sup>2</sup>
<i>V. riparia</i> feuille 2	8,89.10 <sup>2</sup>
<i>V. riparia</i> feuille 3	9,37.10 <sup>2</sup>
Syrah feuille 1	9,60.10 <sup>4</sup>
Syrah feuille 2	8,54 .10 <sup>4</sup>
Syrah feuille 3	7,99.10 <sup>5</sup>

**Tableau II.1: Quantification de la sporulation des feuilles utilisées pour les analyses en qPCR et en LC-MS**

### **2.3.5 Analyse comparative des méthodes de quantification de la biomasse de *P. viticola***

#### **2.3.5.1 Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété Syrah (voir Planche 1, à la fin du chapitre)**

D'après les observations microscopiques, le mildiou semble se développer plus rapidement dans le réplicat 1 de Syrah jusqu'à 72 hpi où le mycélium envahi totalement le parenchyme. Les données obtenues en LC-MS et par qPCR sont en accord avec ces observations. A 72 hpi le nombre de copie du génome mitochondrial dans le réplicat n°3 augmente brusquement pour atteindre celui du réplicat n°1. En revanche le nombre de copie du gène nucléaire EIF1a rejoint les résultats obtenus en microscopie et LC-MS. Les données acquises à 6jpi en LC-MS et qPCR sont cohérentes avec les niveaux de la sporulation mesurée. La feuille n°3 est celle qui présente les résultats les plus élevés en LC-MS et qPCR, est le niveau de sporulations du réplicat n°3 est dix fois plus élevé que celui de réplicat n°1 et 2. Cette forte sporulation sur la feuille n°3 n'entraîne pas une augmentation du nombre de copies de EIF1a. Ce résultat est étonnant puisque la formation de spores induit une augmentation de la quantité d'ADN, et donc une augmentation attendue du nombre de copies du gène EIF1a. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les spores ne représentent finalement qu'une faible proportion de la biomasse de *P. viticola* en fin d'infection. Cette hypothèse est renforcée par les analyses de lipides, qui montrent que le profil lipidique de *P. viticola* en fin d'infection est très différent de celui des zoospores, suggérant une faible participation des spores au profil lipidique total.

#### **2.3.5.2 Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété Bianca (voir Planche 2, à la fin du chapitre)**

Le mildiou dans le réplicat n°1 de la variété Bianca montre un meilleur développement jusqu'à 48 hpi. Les résultats LC-MS vont dans le même sens, tandis que les analyses qPCR ne détectent pas de différences significatives entre les réplicats n°1 et 2 (p-value EIF1a : 0,9 ; p-value cytoB : 0,89). A l'inverse, le réplicat n°3 est celui qui présente en microscopie la propagation de mycélium la plus faible. Ce retard de croissance du mycélium est clairement détecté lors de la quantification des génomes mitochondriaux et nucléaires, mais pas lors de l'analyse de lipides (intensité des lipides détectés dans la feuille n°1 :  $5,19 \cdot 10^5$ ; feuille n°2 :  $1,43 \cdot 10^5$ ; feuille n°3 :  $1,99 \cdot 10^5$ ). A 6 jpi, les résultats d'analyse par LC-MS présentent une plus forte augmentation des lipides du pathogène dans la feuille n°1, tandis que les lipides des deux autres réplicats sont détectés avec la même intensité. Les données qPCR démontrent une plus

faible concentration d'ADN dans la feuille n°3 par rapport aux réplicats n°1 et 2. La croissance du mildiou à 6jpi dans la feuille n°2 est difficile à déterminer à partir des résultats de cette expérience. L'analyse LC-MS suggère une croissance faible du pathogène dans la feuille 2 par rapport à la feuille n°1. A l'inverse, d'après les résultats de quantification d'ADN, le niveau d'infection de la feuille n°2 est similaire à la feuille n°1. Enfin, la concentration de sporanges produites par la feuille n°2 est deux fois plus élevée que pour les feuilles n°1 et 3. L'analyse de la feuille n°2 montre les limites de la comparaison d'outils évaluant des composants différents d'un pathogène.

### 2.3.5.3 Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété *V. riparia* (voir Planche 3, à la fin du chapitre)

Le développement de *P. viticola* sur *V. riparia* est extrêmement limité. Au niveau d'un disque foliaire, on peut trouver de rares zones où des structures de *P. viticola* sont visibles (Planche 3). Les résultats de quantification d'ADN par qPCR et de lipides par LC-MS ont été analysés par un t.test qui montre qu'au-delà de 24 hpi, les variations observées ne sont plus significatives. Cependant, les résultats obtenus en qPCR et LC-MS à 24 hpi sont significativement supérieurs au bruit de fond (Cq contrôle négatif de eIF1a : 38 ; seuil de détection en LC-MS :  $3,8 \cdot 10^3$ ) et correspondent à un début de développement du pathogène.

### 2.3.5.4 Corrélations entre les analyses LC-MS et qPCR

La corrélation entre les quantifications des différents lipides en LC-MS et des gènes CytoB et eIF1a en qPCR a été analysée par un test de Pearson qui indique que tous les lipides sont très significativement corrélés aux deux gènes CytoB et eIF1a. Les meilleurs coefficients de corrélation pour les deux gènes (0,85) sont obtenus avec la quantification du DEPG (Fig. 11.19).

Correlation Lipides/ CytoB	cor_Pearson	p_value_Pearson	Correlation Lipides/ Eif1a	cor_Pearson	p_value_Pearson
Cerd_16.1_16.0	0,669310269	4,99E-07	Cerd_16.1_16.0	0,690807612	1,50E-07
Cerd_16.1_18.0	0,710722149	4,50E-08	Cerd_16.1_18.0	0,74545678	4,24E-09
Cerd_16.1_20.0	0,764166458	1,01E-09	Cerd_16.1_20.0	0,761067555	1,29E-09
Cerd_16.1_22.0	0,770163339	6,20E-10	Cerd_16.1_22.0	0,783009221	2,07E-10
DAG	0,72887985	1,37E-08	DAG	0,735338362	8,77E-09
DEPG	0,858213688	4,93E-14	DEPG	0,848186872	1,92E-13
EPA	0,732158075	1,09E-08	EPA	0,726740933	1,58E-08
EPG	0,662097675	7,30E-07	EPG	0,685411604	2,05E-07
TAG	0,76112067	1,29E-09	TAG	0,823556169	3,75E-12
TEPG	0,720169557	2,45E-08	TEPG	0,77532016	4,03E-10

**Fig. II.19: Corrélations entre les dosages par LC-MS et qPCR.**

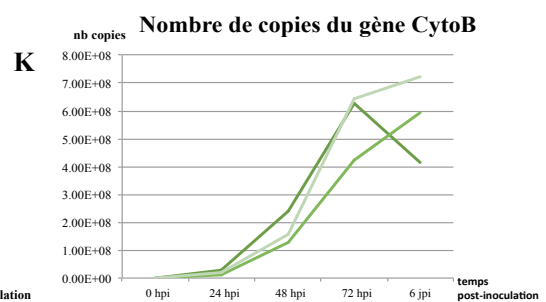
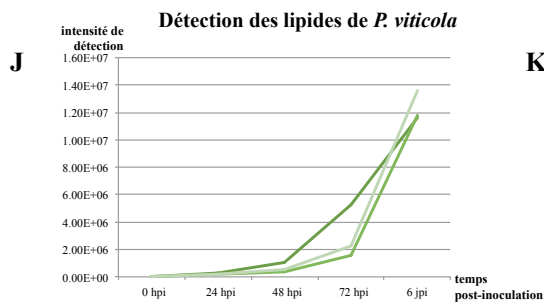
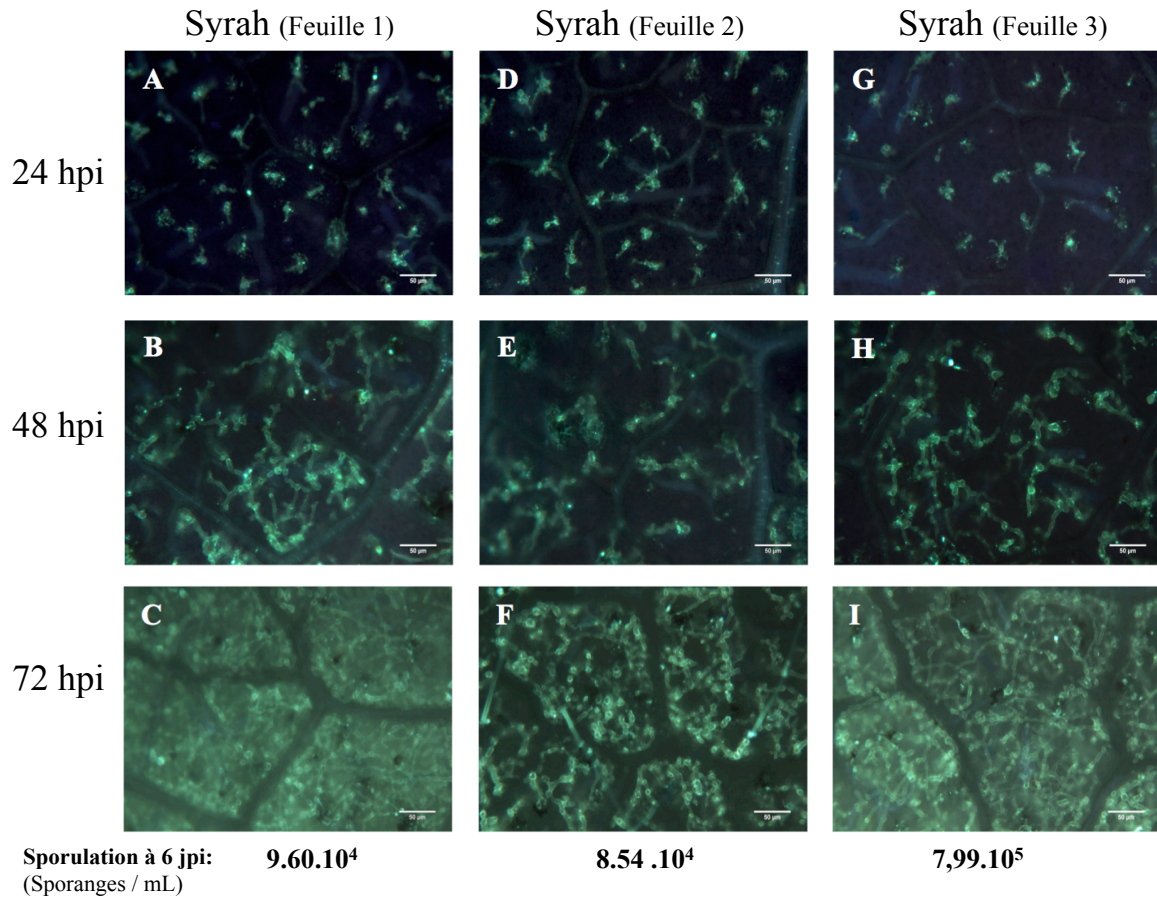
Les corrélations entre les quantifications des différents lipides en LC-MS et des gènes CytoB et eIF1a en qPCR a été analysée par un test de Pearson

### 2.3.6 Conclusions et perspectives

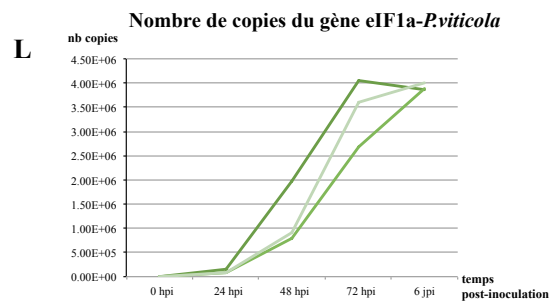
La comparaison des différentes techniques de quantification du développement de *P. viticola* au cours de l'infection permet de tirer les conclusions suivantes:

- La qPCR est une technique sensible et reproductible, mais la préparation des échantillons et l'analyse des résultats sont relativement longues et délicates. Elle offre la possibilité de suivre le développement du mildiou de manière quantitative dès 24 hpi.
- La quantification des lipides par LC-MS est une technique fiable et sensible qui, comme la qPCR, permet la détection du pathogène dès 24 hpi. La corrélation avec les résultats obtenus en qPCR est très bonne. La préparation des échantillons est plus simple et plus rapide que pour la qPCR. En plus de l'aspect quantitatif, la LC-MS apporte un aspect qualitatif à travers l'analyse de la constitution lipidique de l'échantillon, ce qui peut apporter des renseignements sur le développement de *P. viticola*. La quantification de la biomasse de *P. viticola* en LC-MS apparaît donc comme une approche prometteuse et très complémentaire des autres techniques utilisées au laboratoire (analyse de la sporulation par comptage des spores et analyse d'image).

CHAPITRE II : Analyse qualitative et quantitative de l'infection



— Syrah 1F6  
— Syrah 2F6  
— Syrah 3F6

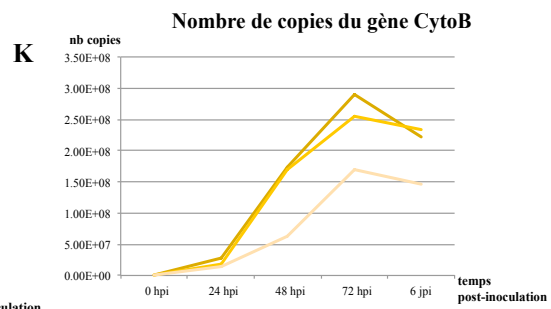
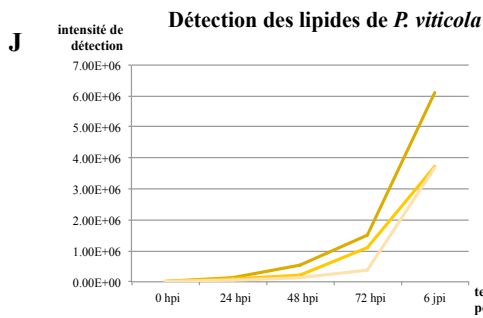
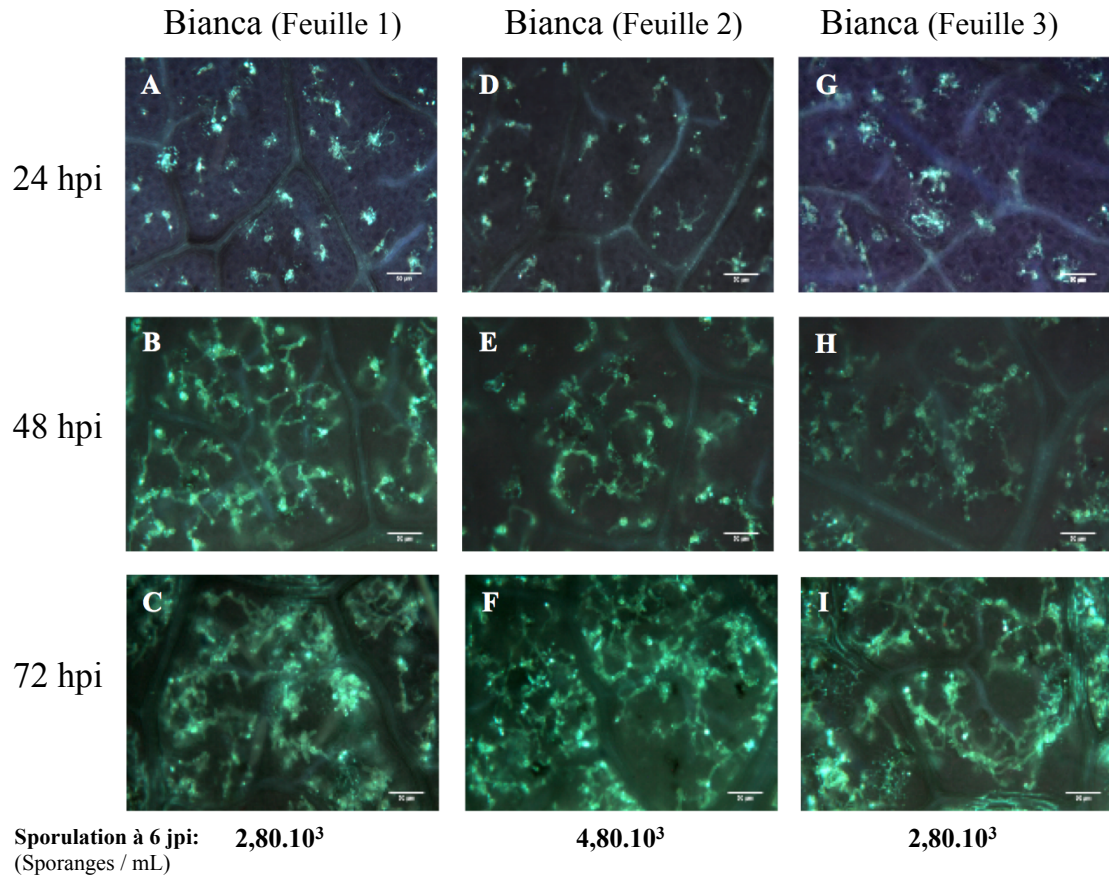


**Planche 1: Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété Syrah**

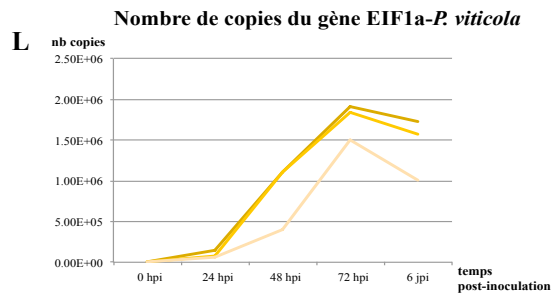
Les 3 feuilles de Syrah infectées par *P. viticola* ont été observées 24 hpi (A, D, G), 48 hpi (B, E, H) et 72 hpi (C, F, I) après coloration au bleu d'aniline. La quantification de la sporulation 6 jpi est indiquée pour chaque feuille. Aux différents temps de la cinétique, la quantification relative des lipides de *P. viticola* et la quantification des nombres de copie des gènes CytoB et eIF1a sont représentées en J, K et L, respectivement.



CHAPITRE II : Analyse qualitative et quantitative de l'infection



— Bianca feuille 1  
— Bianca feuille 2  
— Bianca feuille 3

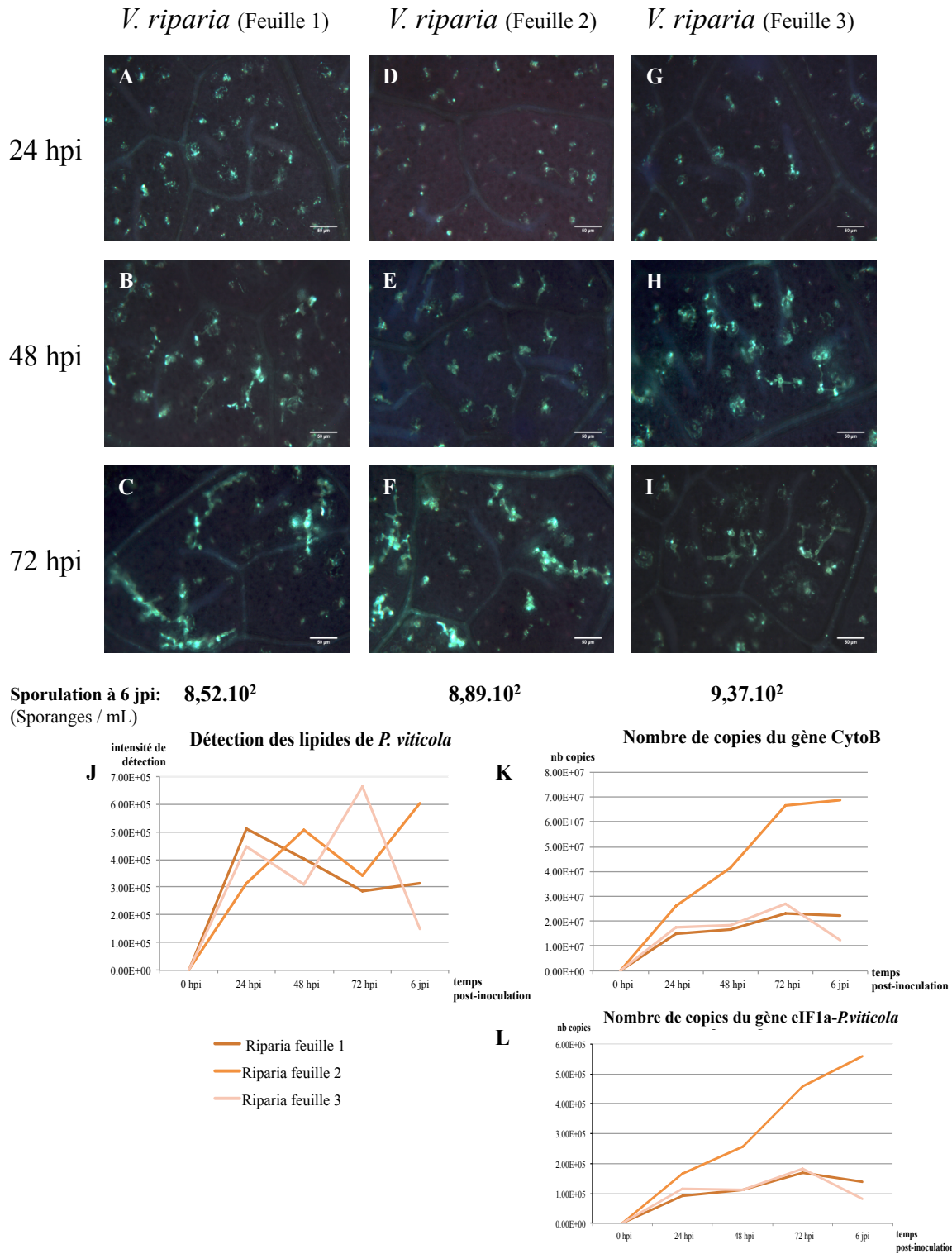


**Planche 2: Analyse comparée des résultats obtenus après infection de la variété Bianca**

Les 3 feuilles de Bianca infectées par *P. viticola* ont été observées 24 hpi (A, D, G), 48 hpi (B, E, H) et 72 hpi (C, F, I) après coloration au bleu d'aniline. La quantification de la sporulation 6 jpi est indiquée pour chaque feuille. Aux différents temps de la cinétique, la quantification relative des lipides de *P. viticola* et la quantification des nombres de copie des gènes CytoB et eIF1a sont représentées en J, K et L, respectivement.



CHAPITRE II : Analyse qualitative et quantitative de l'infection



**Planche 3: Analyse comparée des résultats obtenus après infection de *V. riparia***

Les 3 feuilles de *V. riparia* infectées par *P. viticola* ont été observées 24 hpi (A, D, G), 48 hpi (B, E, H) et 72 hpi (C, F, I) après coloration au bleu d'aniline. La quantification de la sporulation 6 jpi est indiquée pour chaque feuille. Aux différents temps de la cinétique, la quantification relative des lipides de *P. viticola* et la quantification des nombres de copie des gènes CytoB et eIF1a sont représentées en J, K et L, respectivement.

*Chapitre III :*  
*Analyse métabolomique de*  
*l'interaction entre la vigne et*  
*Plasmopara viticola en*  
*conditions compatible et*  
*incompatible*

---

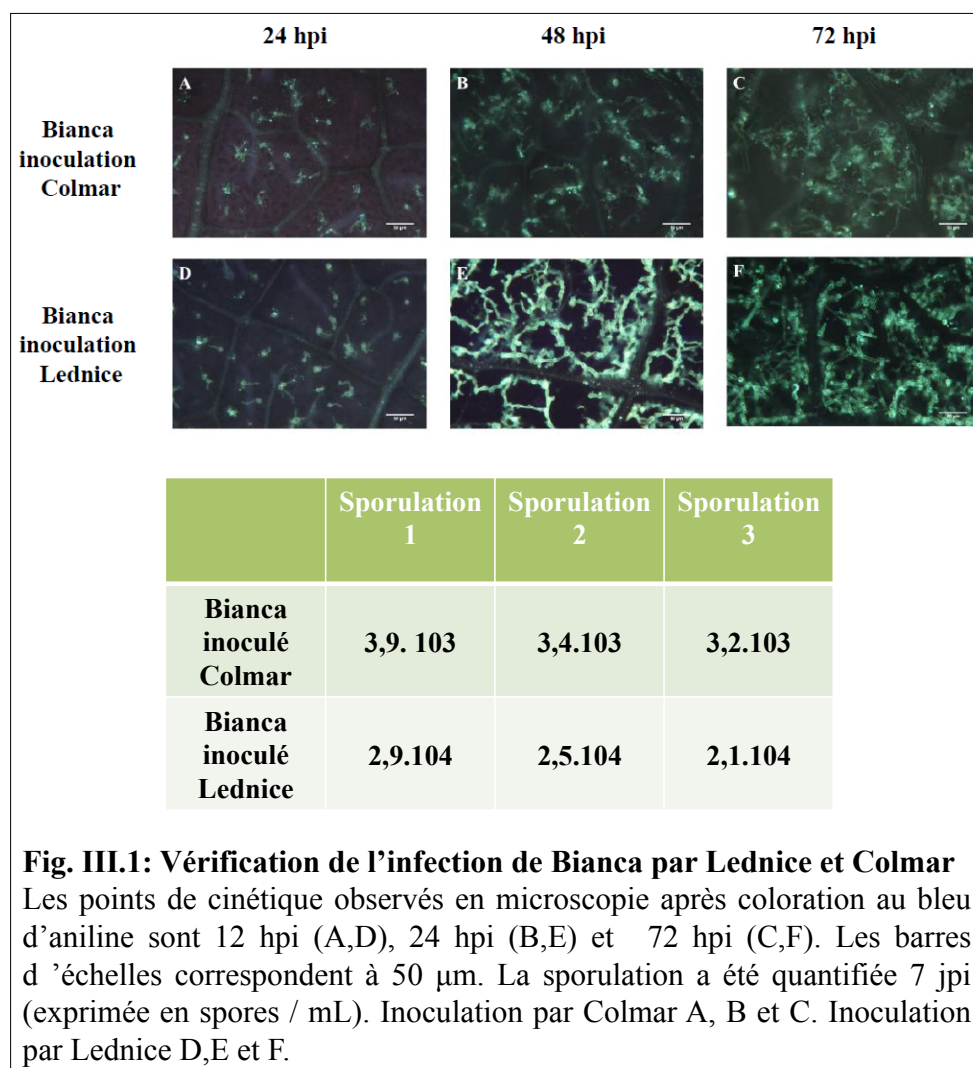


# *Chapitre III : Analyse métabolomique de l'interaction entre la vigne et *Plasmopara viticola* en conditions compatible et incompatible*

---

## **1. Contexte et stratégie**

L'apparition du nouvel isolat Lednice de *P. viticola*, capable de contourner les mécanismes de défense de la vigne Bianca, est le premier cas identifié d'adaptation du mildiou aux mécanismes de résistance de la vigne. En parallèle de la mise au point d'un nouvel outil de quantification du mildiou, ce pathosystème original a été utilisé afin d'étudier les processus liés à l'expression de la résistance Rpv3 dans la vigne. La stratégie employée vise à comparer les modifications métaboliques induites par l'infection de la variété Bianca par l'isolat Colmar (interaction incompatible) à celles induites par Lednice (interaction compatible). Sur des lots de trois feuilles inoculées par l'isolat Colmar, Lednice ou simplement baignée dans de l'eau (feuilles témoins non-inoculées), des disques ont été prélevés à 12, 24, 48 et 72 hpi. Les disques foliaires ont été analysés par LC-MS, RMN et enzymologie à haut débit. L'efficacité de l'inoculation a été vérifiée par observations microscopiques et quantification de la sporulation en fin d'infection (Fig. III.1).

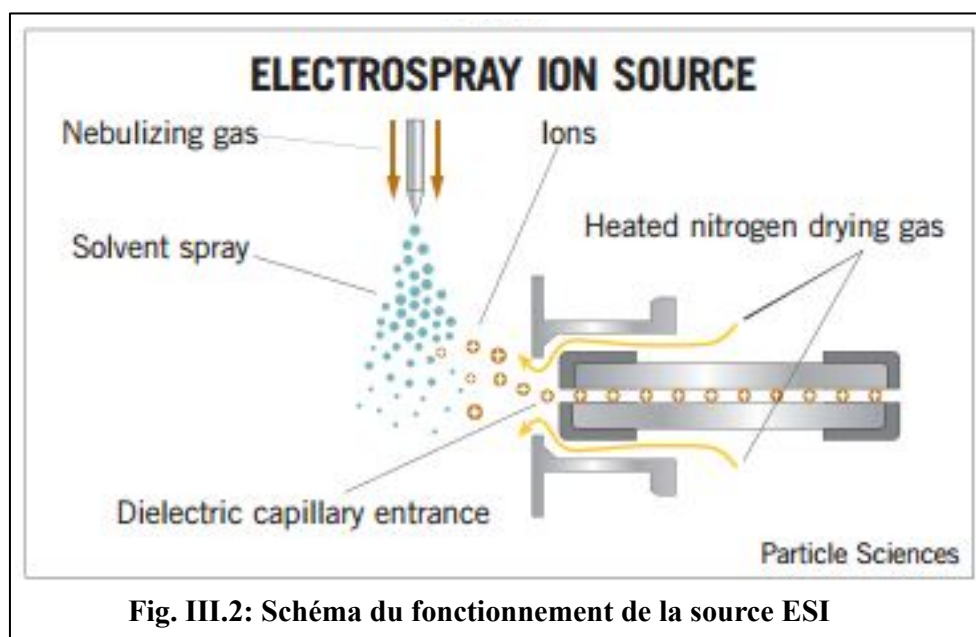


**Fig. III.1: Vérification de l'infection de Bianca par Lednice et Colmar**  
 Les points de cinétique observés en microscopie après coloration au bleu d'aniline sont 12 hpi (A,D), 24 hpi (B,E) et 72 hpi (C,F). Les barres d'échelles correspondent à 50 µm. La sporulation a été quantifiée 72 hpi (exprimée en spores / mL). Inoculation par Colmar A, B et C. Inoculation par Lednice D,E et F.

## 2. Analyses métabolomiques en LC-MS

Les métabolites contenus dans les feuilles de vignes ont été extraits par du méthanol et séparés en chromatographie liquide sur une colonne de type C18, qui retient mieux les molécules peu polaires. Cette colonne est adaptée à l'étude des molécules du métabolisme secondaire. Les molécules polaires telles que les sucres et les acides aminés ne sont pas retenus (ou alors très peu) par la colonne, si bien qu'ils sortent avec le pic du solvant. Au niveau du spectromètre de masse, les molécules sont ionisées par une source à électro-nébulisation (ou ESI pour ElectroSpray Ionization). L'ionisation des métabolites dans la source ESI est obtenue par la combinaison de 3 processus : la nébulisation du mélange solvant/échantillon sous forme de petites gouttelettes (à l'aide du gaz de nébulisation, l'azote), la désolvatation de ces gouttelettes (à l'aide d'un courant d'azote chaud) jusqu'à la désolvatation des ions par application d'une différence de potentiel élevée (de 3 à 5 kV) entre

l'aiguille de nébulisation et l'entrée du spectromètre. Les ions ainsi formés pénètrent dans le spectromètre de masse grâce à la différence de potentiel appliquée ainsi que par la différence de pression existant entre la source ESI (à pression atmosphérique) et l'entrée du spectromètre de masse (pression =  $10^{-3}$  bar). Le signal enregistré par le spectromètre de masse pour chaque ion est exprimé en unités arbitraires.



## 2.1 Analyse ciblée

Cette analyse est basée sur la quantification d'une sélection de métabolites disponibles sous forme de standards commerciaux purs. L'injection en LC-MS de ces molécules pures permet de connaître précisément leur temps de rétention ainsi que leur spectre de masse et l'ion majeur (ion pseudo-moléculaire) caractérisé par son rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Elles sont ensuite facilement recherchées et identifiées dans les échantillons. Un ensemble de vingt-huit molécules dont les standards sont disponibles a été sélectionné et quantifié dans les extraits de feuilles de vignes. Ces molécules comprennent des métabolites primaires (sucres et acide aminés), des phytohormones (acide salicylique et acide jasmonique) et des molécules potentiellement impliquées dans les défenses de la vigne contre le mildiou (stilbènes et flavonoïdes). La variation relative des intensités de ces métabolites entre les conditions expérimentales a été évaluée à l'aide d'un test de Student. Une première analyse statistique a consisté à comparer les variations d'intensité des métabolites entre les échantillons inoculés

par Colmar (Col) et les échantillons inoculés par Lednice (Led). Un second test a été effectué afin d'examiner les variations entre échantillons inoculés (I) et échantillons non-inoculés (NI).

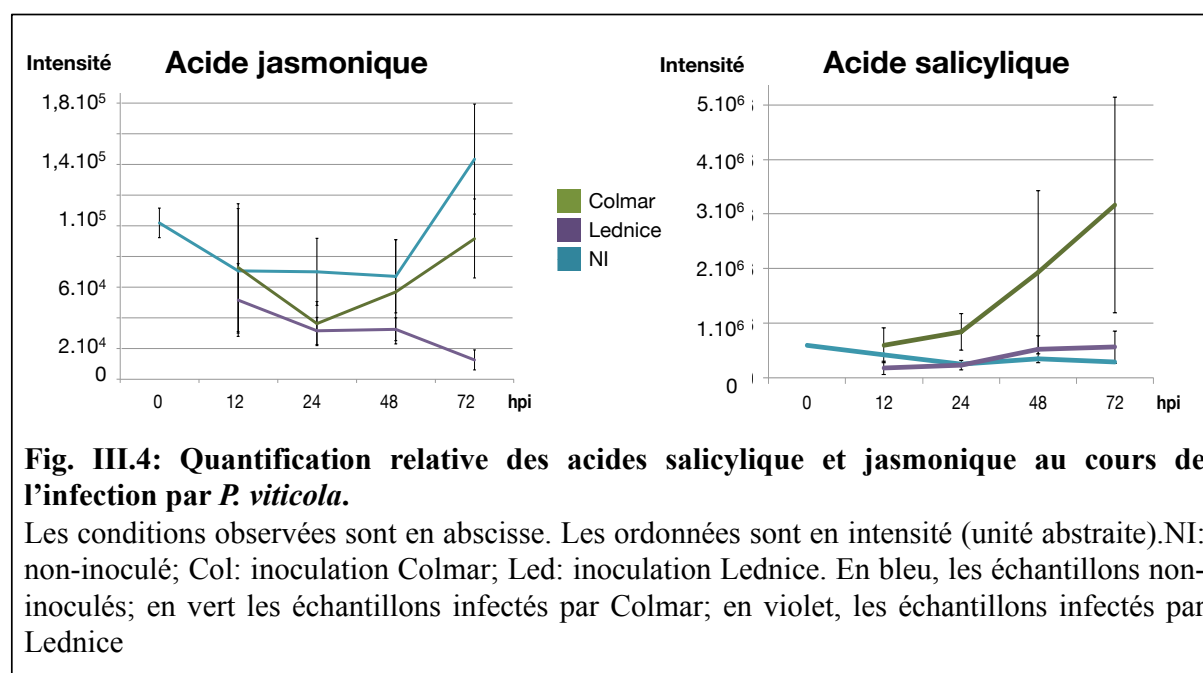
Sur les 28 molécules sélectionnées, 11 présentent une différence d'intensité significative ( $p\text{-value} < 5.10^{-2}$ ) dans au moins une des conditions analysées (Fig III.3). Les variations entre les feuilles infectées par Colmar et par Lednice apparaissent à partir de 48 hpi ( $p\text{-value}$  Col/Led), tandis que les inoculations de mildiou impactent le métabolisme des feuilles dès 12 hpi ( $p\text{-value}$  NI/I). Parmi les standards injectés, seulement trois molécules du métabolisme primaire sont détectées de manières significativement différentes dans les échantillons de la variété Bianca. D'après les analyses statistiques, le glutamate est significativement différent à 48 hpi dans les échantillons Colmar et Lednice, tandis que la phénylalanine, la glutamine et le glutamate varient de façon significative entre échantillons inoculés et non-inoculés. Ces éventuelles différences dans les teneurs en acides aminés demandent à être confirmées par les analyses RMN.

Molécules	Nature	p.value Col/Led	Point de cinétique	p.value NI/I	Point cinétique
Glutamine	acides-aminés			$1,54.10^{-2}$	72 hpi
Glutamate	acides-aminés	$3,64.10^{-2}$	48 hpi	$1,77.10^{-4}$	dès 48 hpi
Phénylalanine	acides-aminés			$8,35.10^{-4}$	72 hpi
Acide salicylique	acide phénolique	$3,75.10^{-2}$	24 hpi		
Cis-resvératrol	stilbène	$9,99.10^{-4}$	dès 48 hpi	$4,60.10^{-2}$	dès 48 hpi
Trans-resvératrol	stilbène	$1,17.10^{-3}$	48 hpi		
Cis-picéide	stilbène			$1,82.10^{-2}$	dès 48 hpi
Trans-picéide	stilbène			$1,79.10^{-2}$	dès 24 hpi
Delta-viniférine	stilbène	$1,59.10^{-3}$	72 hpi		
Epsilon viniferine	stilbène	$2,62.10^{-3}$	72 hpi	$4,38.10^{-3}$	24 hpi
Acide jasmonique	dérivé d'acides gras	$6,64.10^{-3}$	72 hpi		

**Fig. III.3: Analyse de la quantification des molécules sélectionnées par un test de Student.** Les cases où le test n'est pas significatif sont grisées.

L'acide salicylique et l'acide jasmonique, deux phytohormones impliquée dans les réponses aux stress biotiques, sont accumulés différemment lors de l'infection par Colmar et Lednice. Les plantes infectées par Lednice contiennent peu d'acide salicylique, et l'intensité du signal de l'acide jasmonique diminue au cours de l'infection. A l'inverse, l'acide

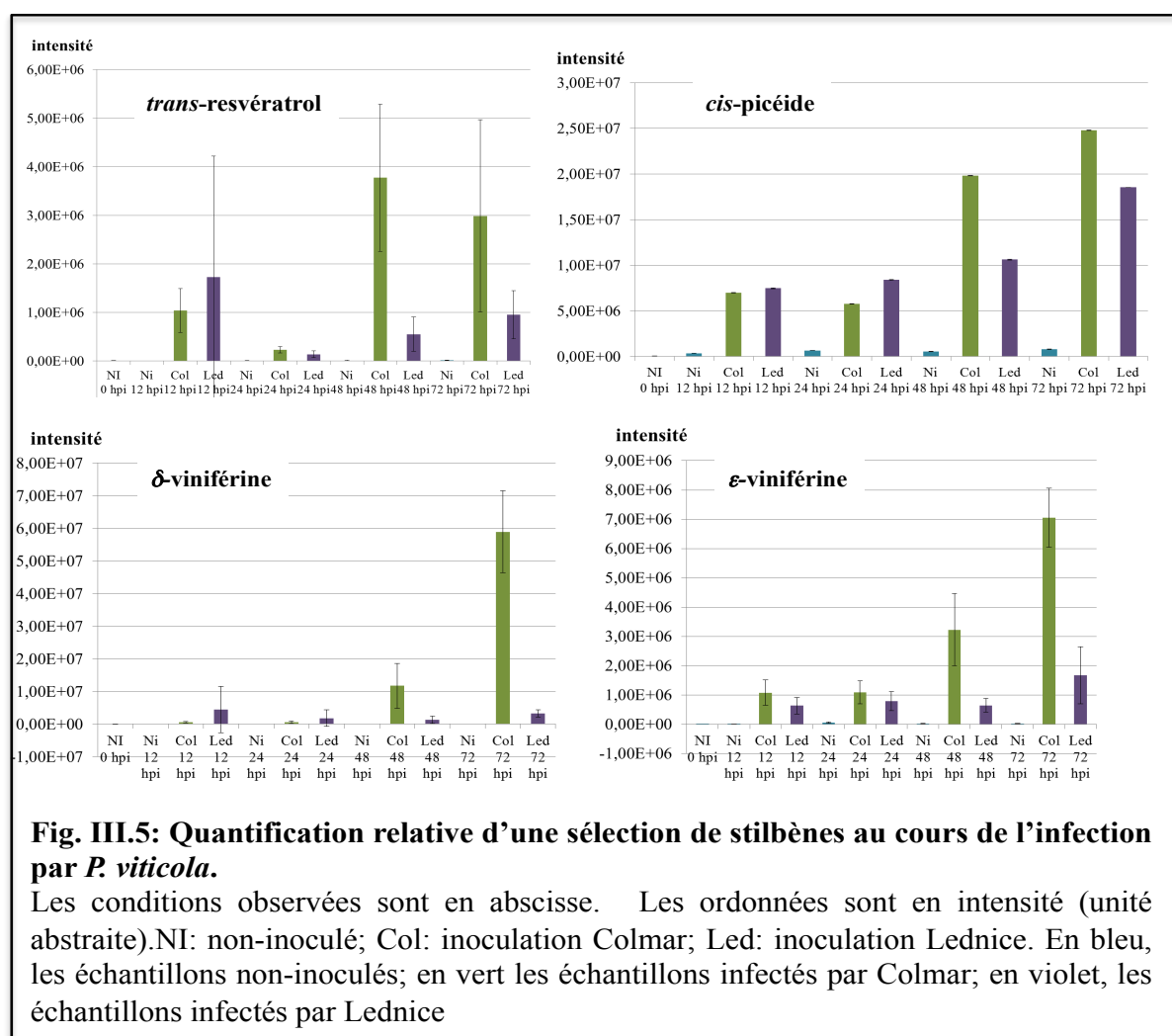
salicylique et l'acide jasmonique sont accumulés dans les feuilles inoculées par Colmar (Fig. III.4). La quantification de l'acide salicylique apparaît relativement variable mais les différences sont néanmoins statistiquement significatives. La quantification de l'acide jasmonique montre que celui-ci s'accumule au cours du temps dans les feuilles non-inoculées. Il est possible que l'acide jasmonique soit lié à une réponse de la feuille au stress infligés durant les prélèvements. Cependant, les feuilles Lednice, qui ont subi les mêmes types de stress, n'accumulent pas cette molécule. De même, les feuilles saines prélevées avant inoculation présente un niveau d'acide jasmonique supérieur à celui contenu dans les feuilles infectées par Lednice à 12 hpi. Deux hypothèses sont alors envisageables. L'acide jasmonique pourrait être accumulé en réponse à la blessure provoquée lors du prélèvement des disques foliaires. Ceci est néanmoins peu probable, puisque les disques foliaires ont été immédiatement plongés dans de l'azote liquide après prélèvement, ce qui suppose un arrêt brusque du métabolisme de la plante. Alternativement, l'infection par l'isolat Lednice pourrait provoquer une inhibition de l'accumulation d'acide jasmonique dans la feuille. Ce résultat intéressant demande à être confirmé par de nouvelles expériences.



De manière cohérente avec l'accumulation des phytohormones dans les feuilles infectées par Colmar, ces échantillons présentent également des taux de plus en plus élevés de stilbènes. Les stilbènes sont les principales phytoalexines de la vigne et ont un rôle majeur dans les mécanismes de défenses de la vigne (Pezet *et al.*, 2004). Au sein des stilbènes, les



viniférines sont connues pour leurs propriétés antifongiques (Pezet *et al.*, 2004). Ces molécules représentent une grande famille d'oligomères de resvératrol (Langcake and Pryce, 1977b). Les viniférines les mieux caractérisées sont la  $\delta$ -viniférine et l' $\varepsilon$ -viniférine (dimères de resvératrol) et l' $\alpha$ -viniférine (trimère cyclique de resvératrol) (Jeandet *et al.*, 2002). A l'inverse des feuilles infectées par Colmar, les feuilles inoculées par Lednice contiennent relativement peu de viniférines et de resvératrol (Fig. III.5). En raison du contournement du gène de résistance Rpv3 par Lednice, cette souche ne semble pas déclencher les défenses de la vigne de manière importante, ce qui se traduit par une faible accumulation de stilbènes.



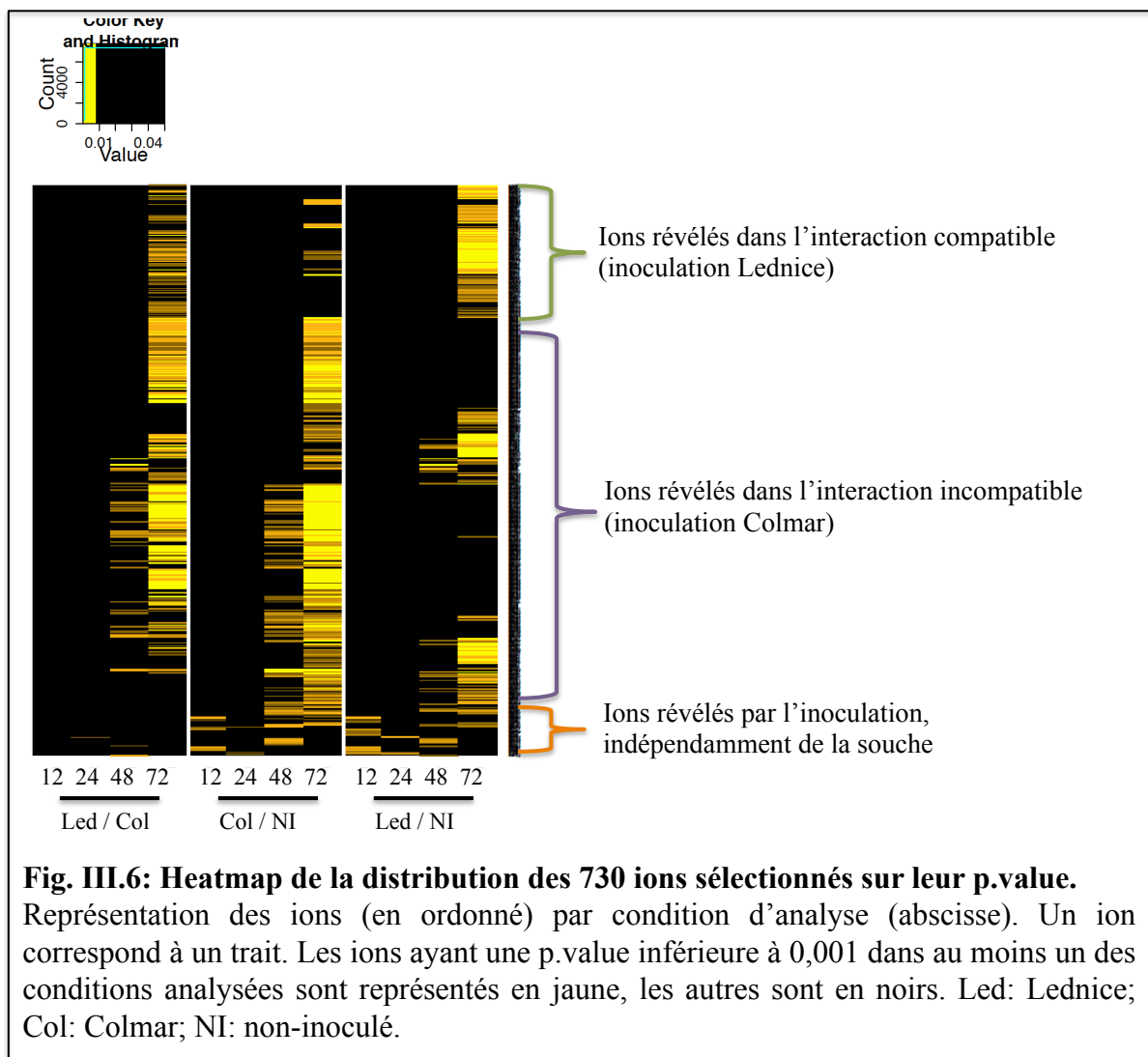
## 2.2 Analyse non-ciblée

En complément des résultats obtenus à partir de l'analyse ciblée, le métabolome de Bianca a été analysé lors de l'interaction compatible et incompatible avec *P. viticola* de manière non-ciblée. L'analyse non-ciblée permet de sélectionner des métabolites de manière

objective, sur la seule base de leur quantification différentielle en fonction des échantillons. Grâce à la précision en masse du spectromètre à technologie Orbitrap, des propositions d'identification des métabolites les plus intéressants pourront être formulées. Ces propositions pourront être validées si les standards correspondants sont disponibles.

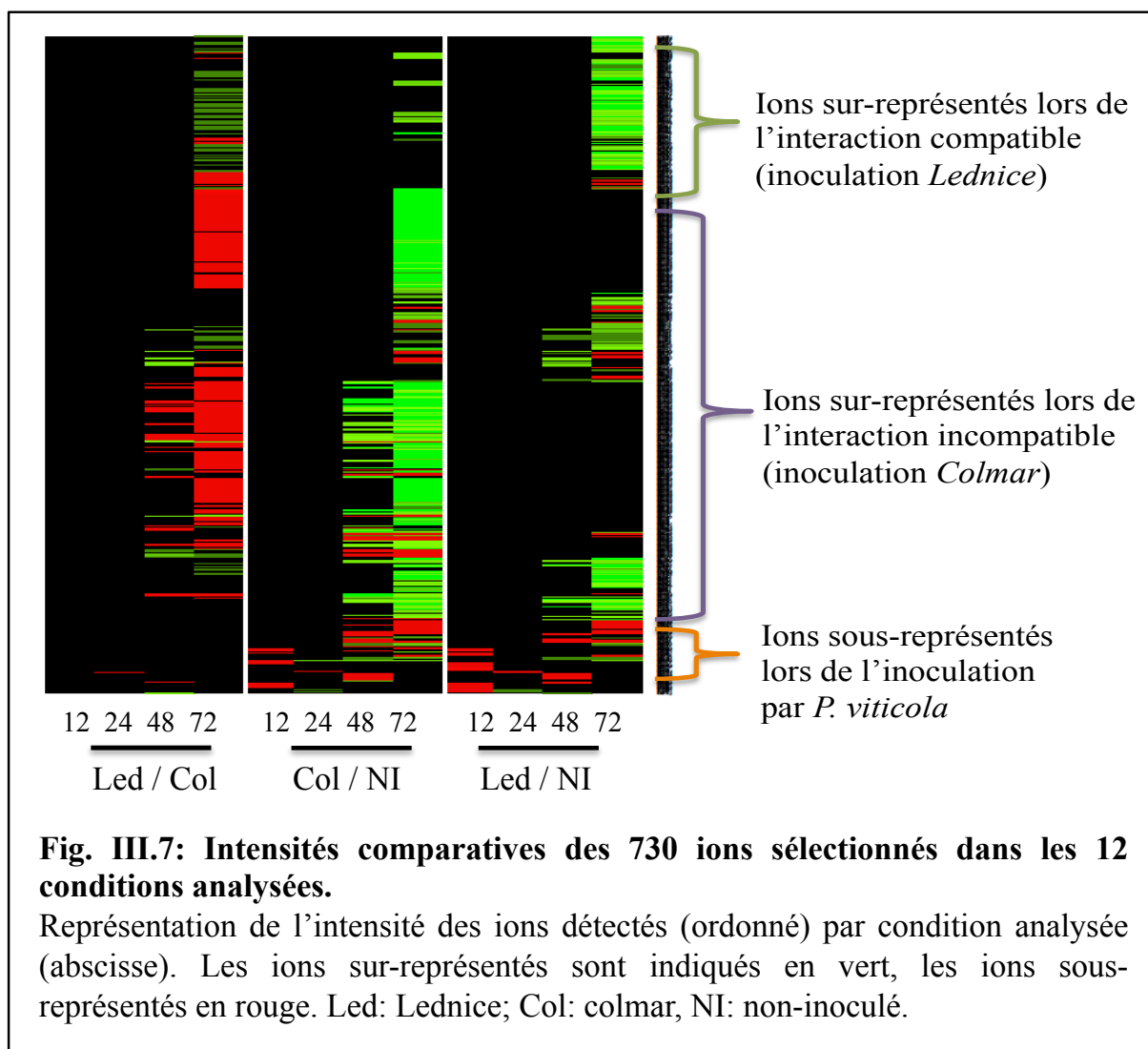
Les données obtenues par LC-MS ont été traitées par le logiciel R avec le package XCMS (Smith *et al.*, 2006). Après alignement de l'ensemble des chromatogrammes, 4477 ions ont été sélectionnés. Ces données ont été traitées par une analyse de variance prenant en compte l'effet temps (T12, T24, T48, T72) et l'effet inoculation (non-inoculé, Lednice, Colmar), suivie d'une analyse de Tukey pour déterminer précisément l'effet des variables. L'analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme anglais ANOVA : analysis of variance) est un test statistique permettant de tester si les différences de variation dans chaque groupe défini par les modalités des variables explicatives s'écartent de manière significative de la valeur 0. Dans notre cas, l'ANOVA est complétée par la méthode de Tukey qui permet de créer des intervalles de confiance pour toutes les différences deux à deux entre les moyennes des niveaux de facteurs, tout en contrôlant le taux d'erreur en tenant compte du nombre de tests effectués (dans notre cas, le niveau de confiance simultané est fixé à 95 %).

Ainsi, 12 modalités ont été analysées. Ces analyses ont été effectuées pour chacun des 4477 ions. Sept cent trente ions différentiellement accumulés dans au moins une des 12 conditions testées, avec une p-value inférieure à 0,001, ont été sélectionnés. Une première heatmap a été représentée à partir des 4477 ions de départ. Lorsque la p-value des ions est supérieure à 0,001, celle-ci a été remplacée par un 1 et apparaît en noir (Fig. III.6).



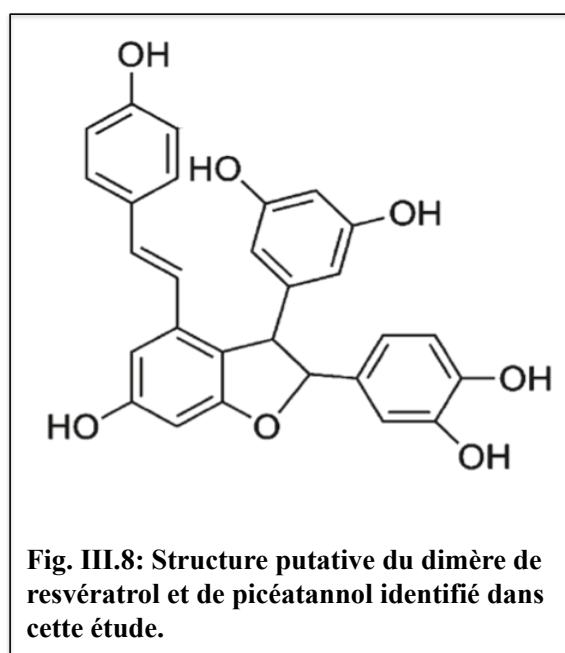
L'analyse comparative des conditions d'inoculations permet d'observer que les variations globales du métabolome provoquées par l'inoculation de *P. viticola* sont plus importantes à 48 et 72 hpi, ce qui était à priori attendu. De plus, deux groupes distincts d'ion se distinguent des autres. En haut, apparaissent les ions révélés lors de l'interaction compatible avec Lednice, dont les intensités sont significativement différentes dans les conditions « non-inoculé » et « inoculation Colmar ». De la même façon, certains ions sont identifiés comme significativement différents lors de l'inoculation par Colmar par rapport aux témoins non inoculés et à l'inoculation par Lednice. Ces ions sont donc considérés comme caractéristiques de l'interaction incompatible. Enfin, le dernier groupe identifié correspond aux ions dont l'intensité est significativement différente entre les conditions inoculé et non-inoculé, indépendamment de la souche de *P. viticola*.

Ensuite, les "fold changes" des 730 ions sélectionnés ont été calculés, afin de déterminer lesquels sont sur- ou sous-représentés dans les 12 conditions analysées. Deux groupes d'ions sur-représentés ont été identifiés, correspondant respectivement à des ions accumulés lors de l'interaction compatible et incompatible (Fig. III.7).



Sur la base de leur masse déterminée avec une erreur généralement inférieure à 1 ppm, une formule brute et une identification putative a pu être proposée pour certains métabolites d'intérêt. L'exploitation des résultats n'est pas encore complète, mais quelques molécules différenciellement accumulées en condition compatible ou incompatible ont néanmoins pu être identifiées. Une grande proportion des ions accumulés à 72 hpi durant l'infection par Lednice semble être constituée de polymères d'hexoses. Ces molécules n'ont pas pu être formellement identifiées, faute de standards disponibles. De nombreuses molécules fortement

accumulées 72 hpi dans les échantillons infectés par Colmar appartiennent à la famille des stilbènes ou aux flavonoïdes, confirmant les résultats obtenus par l'analyse ciblée. Par exemple, la  $\delta$ -viniférine, l' $\epsilon$ -viniférine et le kaempferol-3-O-rhamnoside, accumulés après inoculation par Colmar, ont été identifiés avec certitude. Par ailleurs, l'un des ions fortement accumulé dans ces conditions pourrait correspondre à un dimère de picéatannol et resvératrol (Fig. III.8). A notre connaissance, ce type viniférine n'avait jamais été identifié durant l'interaction vigne-mildiou, mais sa structure devra néanmoins être confirmée.



### 2.3 Conclusions et perspectives

L'analyse par LC-MS de l'interaction entre la variété Bianca et les isolats Colmar et Lednice a mis en évidence des perturbations notables du métabolisme de la vigne durant les stades tardifs de l'infection. Certaines de ces perturbations sont spécifiques du type d'interaction compatible ou incompatible. Lors de l'interaction compatible avec l'isolat Lednice, les mécanismes de défense de la vigne ne semblent pas activés, ce qui pourrait être en relation avec la répression de l'accumulation d'acide jasmonique observée dans ces conditions. La confirmation de ces résultats pourrait indiquer que lors de l'interaction compatible, *P. viticola* possède des mécanismes permettant de réprimer la synthèse d'acide jasmonique et d'affaiblir ainsi les défenses de l'hôte. L'identification des molécules correspondant à une sélection d'ions particulièrement sur- ou sous-représentés lors des interactions avec Lednice et Colmar est actuellement en cours. Ceci permettra d'obtenir une

meilleure image des modifications métaboliques liées à l'infection par *P. viticola* en situation compatible ou incompatible. Les premiers résultats montrent que les stilbènes s'accumulent plus fortement lors de l'interaction incompatible, confirmant l'association de ces phytoalexines avec la résistance au mildiou (Malacarne *et al.*, 2011).

### **3. Analyse du métabolisme primaire**

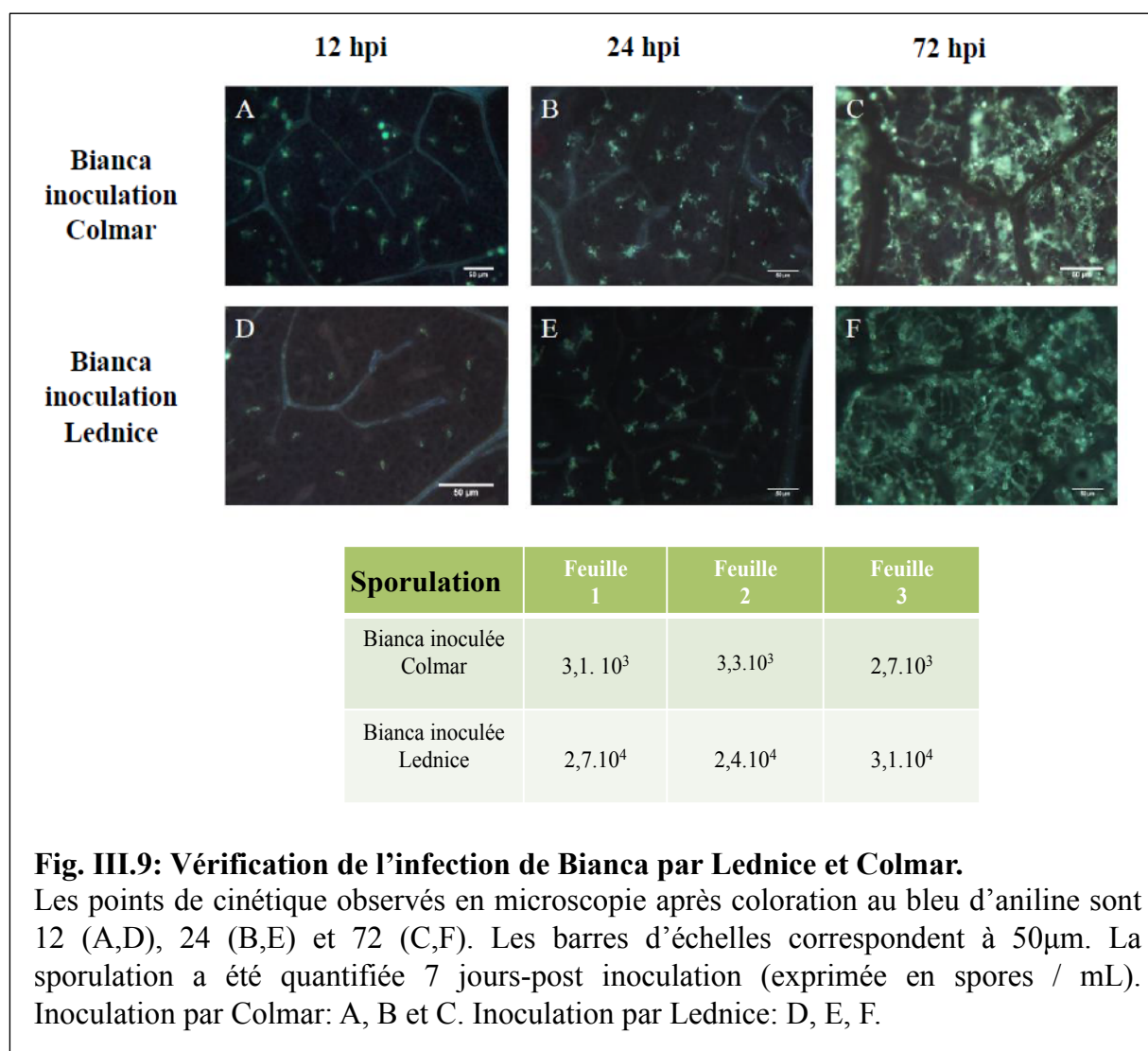
#### **3.1 Stratégie**

Les conditions chromatographiques couramment utilisées en LC-MS ne sont pas bien adaptées à l'analyse des petites molécules très polaires, comme les sucres, les acides organiques ou certains acides-aminés. De plus, certaines de ces molécules étant très abondantes, elles ont tendance à saturer le signal du spectromètre de masse, ce qui rend leur quantification difficile. La résonance magnétique nucléaire (RMN) ou l'enzymologie à haut débit (EHD) sont des techniques plus appropriées pour l'analyse des métabolites abondants et polaires, ce qui est souvent le cas des métabolites primaires. Le développement de *P. viticola* au sein des tissus des feuilles de vigne est susceptible d'entraîner des modifications du métabolisme primaire des cellules de hôte, comme cela a déjà été observé pour d'autres oomycètes (Scharte *et al.*, 2005). En complément des analyses LC-MS, le même type d'échantillons a donc été analysé par RMN. Des feuilles entières de Bianca ont été inoculées avec le même protocole que celui adopté pour l'étude par LC-MS et ont été analysées sur la Plateforme Métabolome de Bordeaux, située à l'INRA de Villenave-d'Ornon. Les analyses en RMN du proton ont été réalisées par le personnel de la plateforme et supervisées par Catherine Deborde et Annick Moing, responsables de la plateforme. Les analyses par enzymologie à haut débit ont été réalisées sur le plateau de Phénotypage Métabolique à Haut Débit de UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRA de Bordeaux, sous la supervision d'Yves Gibon.

#### **3.2 Evaluation du niveau d'infection**

Immédiatement après l'inoculation, deux disques foliaires ont été prélevés sur chaque feuille inoculée, puis conservés en chambre de culture pendant 7 jours. Ces disques ont été utilisés pour quantifier la sporulation du mildiou et vérifier le bon déroulement des infections (Fig. III.9). Comme pour la LC-MS, des séries de disques ont également été prélevées à 12,

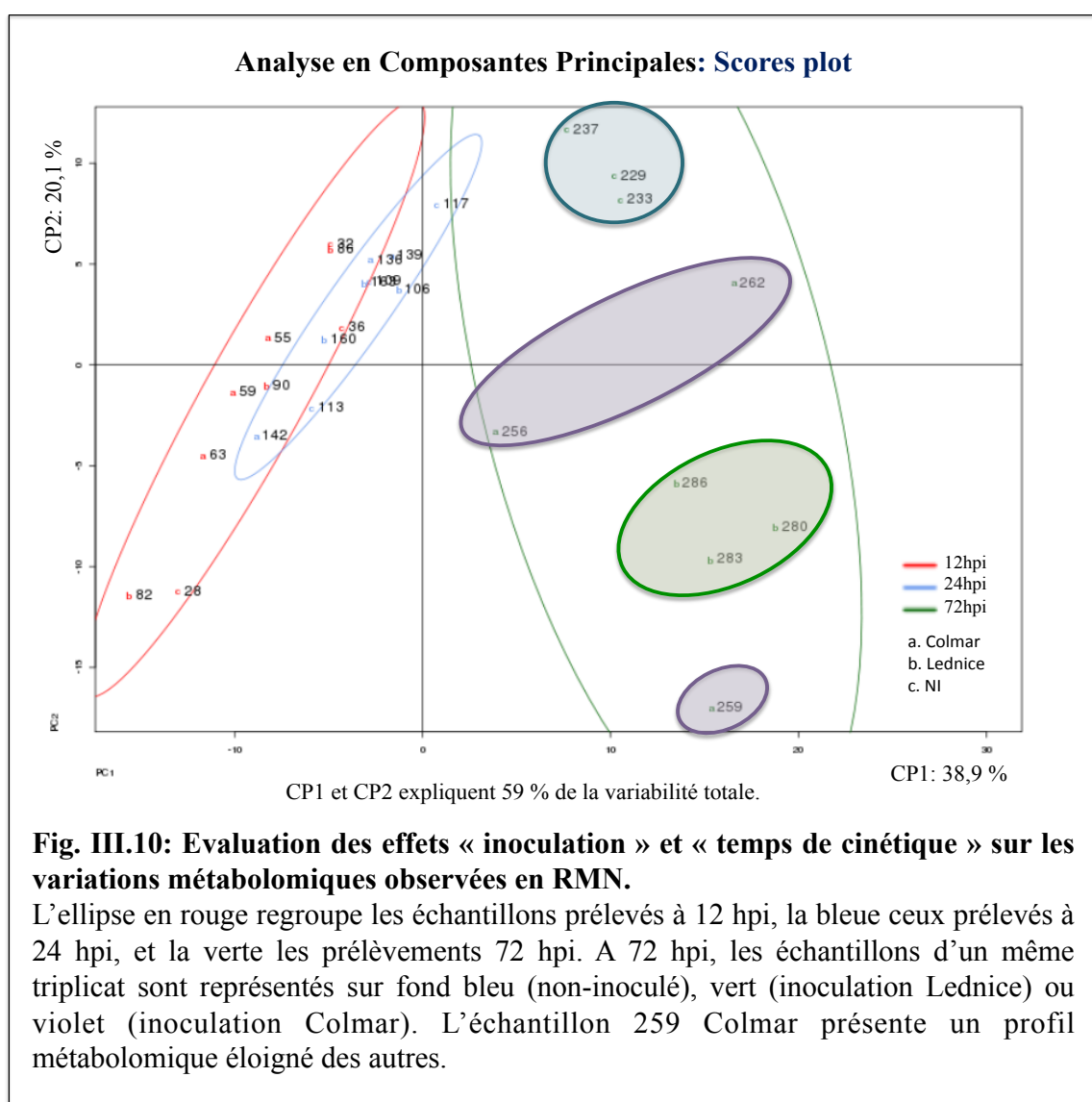
24, 72 hpi afin d'obtenir un suivi cinétique des infections de Bianca par des isolats Lednice et Colmar (Fig. III.9). Les feuilles Bianca inoculées par l'isolat Colmar montrent des signes de résistance dès 12 hpi. La propagation du mycélium des isolats Lednice et Colmar à 72 hpi, ainsi que les sporulations à 6 jpi sont conformes au niveau de résistance attendu, si bien que l'ensemble des disques prélevés a été retenu pour les analyses en RMN et EHD.



### 3.3 Analyse des données obtenues par RMN du proton

#### 3.3.1 Analyse des effets « inoculation » et « temps de cinétique » sur les variations métaboliques globales

Une analyse en composantes principales (ACP) a mis en évidence l'impact majeur de la phase d'infection (CP1) et de l'isolat inoculé (CP2) sur les données globales obtenues en RMN (Fig. III.10).



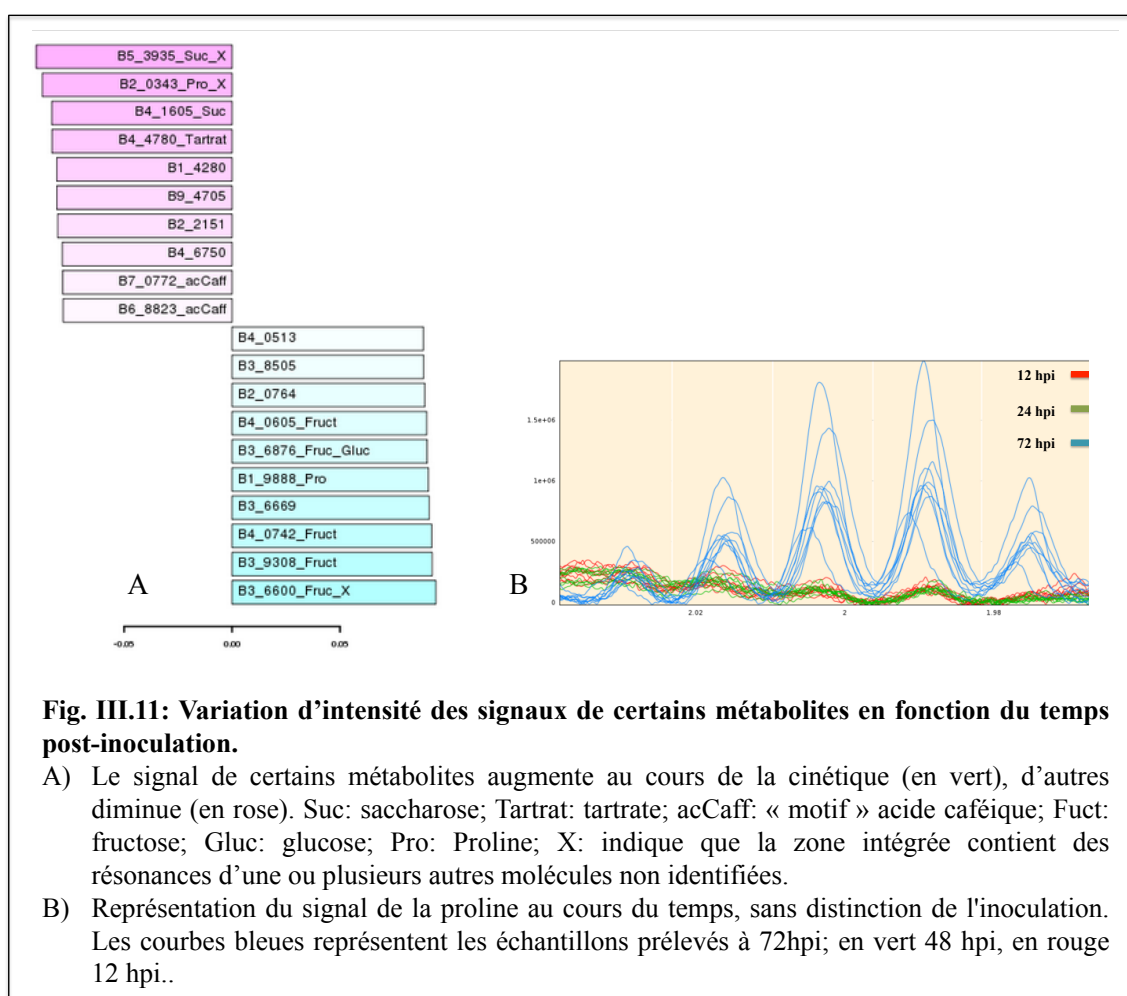
Dans cette étude, le stade de développement du mildiou explique 38,9% des variations observées entre les échantillons, avec une séparation nette entre les temps 12-24 hpi et 72 hpi. Le type de souche inoculé a un effet plus faible, évalué à 20,1% des variations observées. L'éloignement de l'échantillon 259 inoculé par Colmar des deux autres réplicats peut



expliquer en partie ces résultats. Lors de l'analyse LC-MS, les variations métaboliques entre les échantillons étaient plus importantes à 48 et 72 hpi, ce qui est cohérent avec les résultats de RMN. Les résultats de l'ACP montrent que le stade de l'infection a un impact majeur sur l'évolution du métabolisme de la plante. Les variations entre les échantillons ont donc été abordées selon 2 critères: la cinétique d'infection, d'une part, et la souche inoculée d'autre part.

### 3.3.2 Variations du métabolome selon le temps de cinétique

Les échantillons ont été analysés en fonction du temps auquel ils ont été prélevés, sans considération de l'isolat de mildiou inoculé. Les contenus en saccharose, proline et acide tartrique des échantillons semblent diminuer durant l'infection, tandis que les signaux dus aux hexoses augmentent au cours du temps (Fig. III.11).

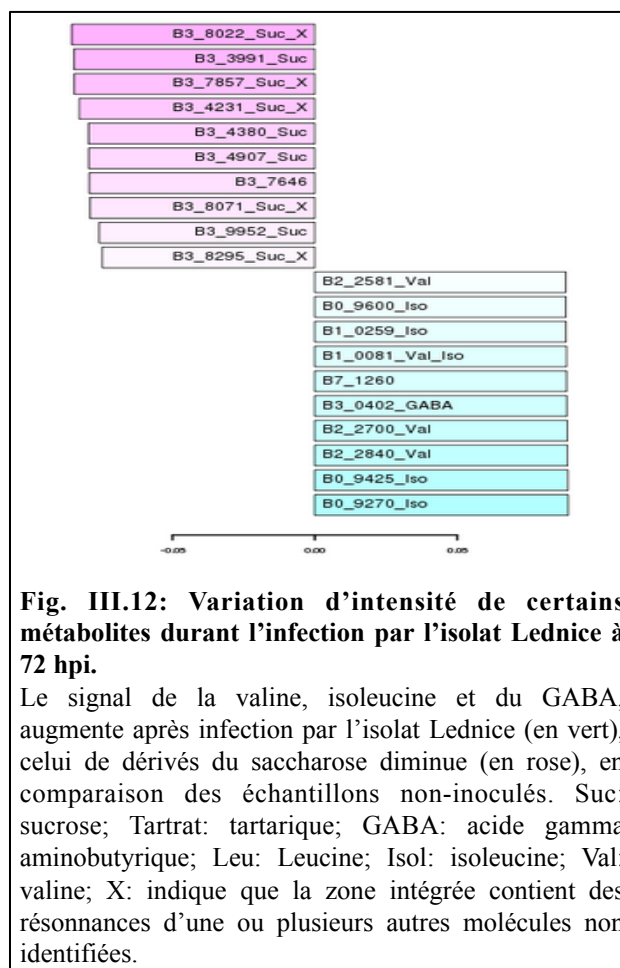


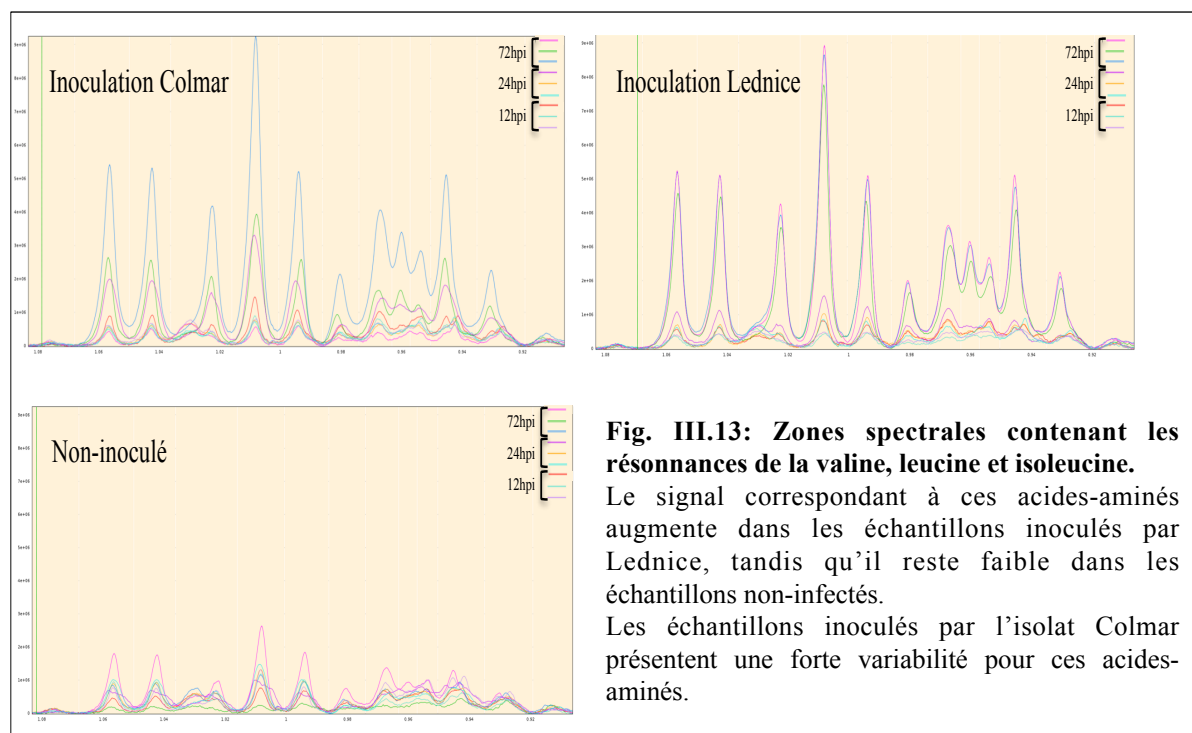
**Fig. III.11: Variation d'intensité des signaux de certains métabolites en fonction du temps post-inoculation.**

- A) Le signal de certains métabolites augmente au cours de la cinétique (en vert), d'autres diminue (en rose). Suc: saccharose; Tartrat: tartrate; acCaff: « motif » acide caféique; Fuct: fructose; Gluc: glucose; Pro: Proline; X: indique que la zone intégrée contient des résonances d'une ou plusieurs autres molécules non identifiées.
- B) Représentation du signal de la proline au cours du temps, sans distinction de l'inoculation. Les courbes bleues représentent les échantillons prélevés à 72hpi; en vert 48 hpi, en rouge 12 hpi..

### 3.3.3 Variations du métabolome selon l'isolat de *P. viticola* inoculé

Une comparaison entre échantillons infectés et échantillons non-inoculés a été réalisée, indépendamment du temps de prélèvement. Les échantillons infectés présentent une diminution de la leucine, de la valine et du GABA par rapport aux échantillons non-inoculés. A l'inverse, des dérivés du saccharose se concentrent dans les feuilles infectées. L'effet « inoculation » étant plus net à 72 hpi, les analyses suivantes se sont focalisées sur les échantillons prélevés à ce stade. Soixante-neuf variables ont été identifiées comme significativement différentes à 0,05%. Trente deux variables ont été attribuées à des résonances du saccharose, du GABA, de la valine, de l'isoleucine, de la leucine, et de la quercetine-O-glucoside (ou quercetine-O-glucuronide). Les échantillons infectés par l'isolat Lednice accumulent des acides-aminés, tandis que le signal du saccharose est faible par rapport aux échantillons non-inoculés (Fig. III.12). Les échantillons infectés par l'isolat Colmar présentent une trop forte dispersion au sein des répliquats biologiques pour aboutir à des conclusions statistiquement significatives (Fig. III.13).





### 3.4 Analyse par enzymologie à haut débit

Des analyses complémentaires ont été réalisées par le plateau de Phénotypage Métabolique à Haut Débit, au sein de l'équipe d'Yves Gibon à l'INRA de Villenave-d'Ornon. Deux types d'analyses ont été effectués :

Premièrement, un ensemble de métabolites primaires a été dosé dans des disques foliaires. Ils ont été quantifiés soit par tests chimiques (ajout d'un réactif et analyse en spectroscopie UV-visible) soit par tests enzymatiques (ajout d'une enzyme et analyse des produits de réaction par spectroscopie UV-visible). Quatorze métabolites ont été ainsi quantifiés, dont des acides-aminés, les acides-aminés totaux, des hexoses et hexoses-phosphate et les protéines totales. Parallèlement, les activités enzymatiques d'un certain nombre d'enzymes du métabolisme primaire ont été quantifiées, en particulier celles de la glucose-6-phosphate deshydrogénase, des hexokinases, de la NADP-isocitrate deshydrogenase, de la RubisCO et des invertases. La mise au point des conditions de dosage sur des extraits de disques foliaires de vigne s'est révélée plus compliquée que prévu, probablement en raison de la richesse en polyphénols de ces échantillons. Les données ont été obtenues relativement tardivement au cours de la thèse et sont encore en cours d'analyse.

### ***3.5 Conclusion et perspectives***

L'analyse RMN permis d'apporter des informations originales sur les modifications du métabolisme primaire durant l'infection de la vigne par *P. viticola*. La diminution de la concentration en saccharose parallèlement à l'augmentation de ce celles des hexoses a déjà été observées durant l'interaction compatible de la vigne avec *P. viticola* (Brem *et al.*, 1986; Gamm *et al.*, 2011). Cependant, l'accumulation de certains acides aminés durant le développement du mildiou n'avait, à notre connaissance, jamais été observée. L'exploitation globale des résultats obtenus en LC-MS, en RMN et en EHD est actuellement en cours et elle permettra, une fois terminée, d'offrir une vision globale des modifications du métabolisme de la vigne au cours de l'infection par *P. viticola*, en condition compatible et incompatible



## *Conclusion générale*

---



# Conclusion générale

---

L'émergence du nouvel isolat Lednice de *P. viticola*, capable de contourner la résistance lié au gène *Rpv3*, montre la nécessité de créer des plantes dotées de résistances multigéniques, et par là même, de mieux comprendre les bases de la résistance de la vigne à *P. viticola*. Au cours de cette thèse, nous avons utilisé le pathosystème original constitué de la variété Bianca et des souches Lednice et Colmar de *P. viticola* pour tenter d'obtenir l'image la plus complète possible de l'impact sur la vigne de l'infection par le mildiou, en situation compatible et incompatible. Pour ce faire, nous avons combiné des études de physiopathologie avec des analyses métabolomiques par chromatographie liquide et spectrométrie de masse à haute résolution (LC-MS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN).

Dès le début de ce travail, il est rapidement apparu que l'étude fine de la relation Bianca/*P. viticola* nécessitait le développement de méthodes de suivi dynamique de l'infection de la vigne par le mildiou qui ne se limitent pas à la quantification de la sporulation en de fin de cycle et qui permettent de s'affranchir des longues séances d'observations microscopiques. Mon travail de thèse a donc eu deux objectifs principaux :

Le développement de nouveaux outils de quantification du mildiou

L'étude de l'interaction de *P. viticola* et de la variété Bianca en situation compatible et incompatible.

## 1. Identification de lipides spécifiques au mildiou

Une recherche de métabolites spécifiques de *P. viticola* a été réalisée grâce à des analyses comparatives non ciblées par LC-MS de feuilles infectées, non-infectées et de suspensions de sporanges. Sur les 123 ions majeurs sélectionnés, 51 ions ont été identifiés avec certitude comme étant des dérivés de lipides spécifiques de *P. viticola* qui ne sont pas présents dans les feuilles de vigne saines. Ils se regroupent en trois classes, l'acide arachidonique (AA) et ses dérivés, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et ses dérivés, et une famille de céramides. L'EPA et l'AA avaient été identifiés précédemment chez différents oomycètes (Gandhi and Weete, 1991; Spring and Hass, 2002; Pang *et al.*, 2015), mais les

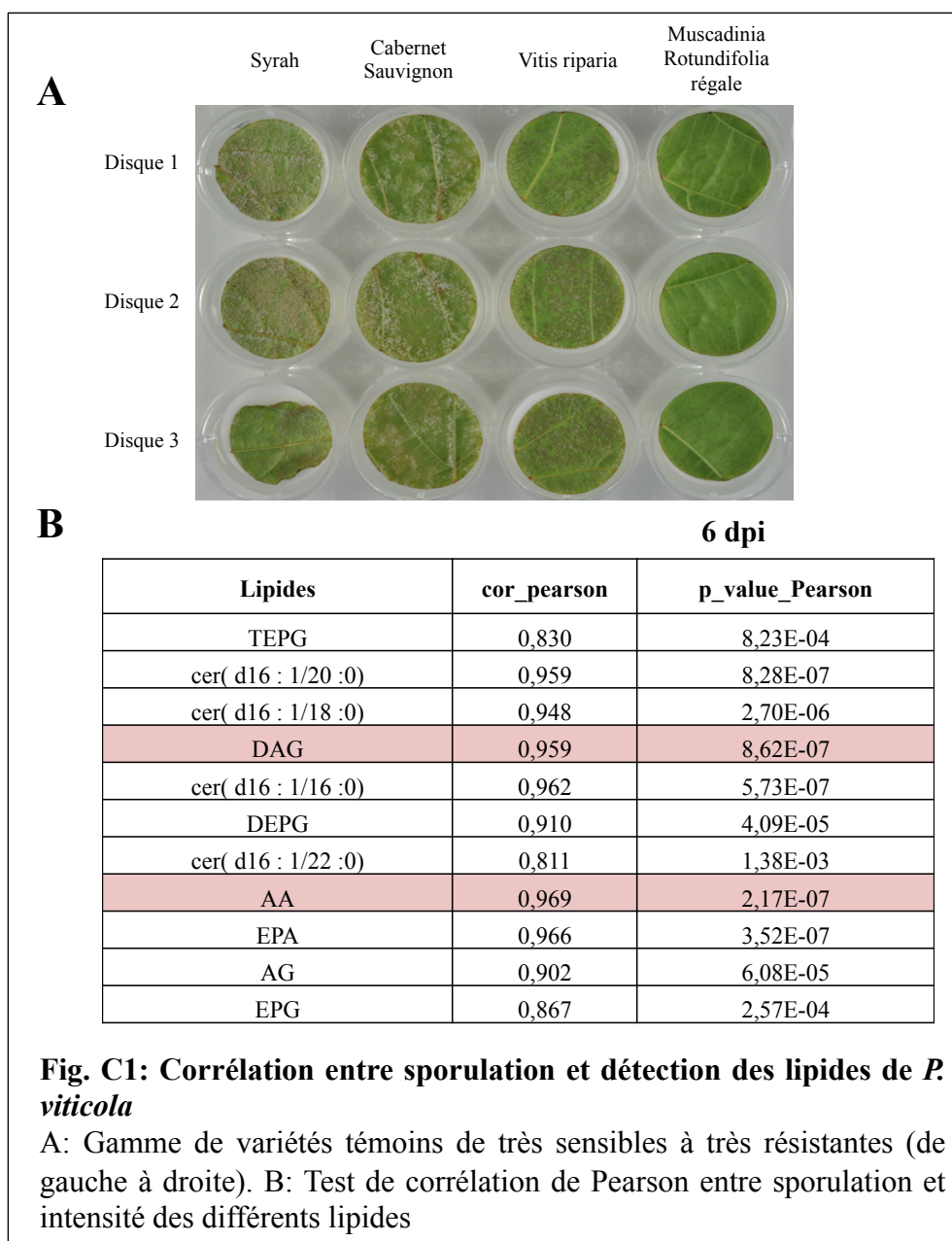


## Conclusion générale

dérivés glycérides de l'AA et de l'EPA, ainsi que la famille de céramides caractérisée dans ce travail, n'avaient jamais été mis en évidence chez les oomycètes. Spring *et al.* (2004) ont suggéré dès 2004 que l'EPA pourrait être utilisé comme marqueur de la contamination de graines de tournesol par *Plasmopara halstedii*, agent du mildiou du tournesol. Si l'EPA est effectivement présent dans les zoospores de *P. viticola*, les dérivés glycérides de l'EPA et les céramides identifiées ici constituent de meilleurs marqueurs pour suivre le développement de l'infection par le mildiou au sein des feuilles de vigne. Ces composés sont en effet détectés avec une sensibilité supérieure par LC-MS. Dans notre étude, les lipides de *P. viticola* ont été détectés dès 24 hpi au cours de l'infection de feuilles de vigne exprimant une résistance plus ou moins élevée au mildiou. La détection à 24 hpi de ces molécules dans l'espèce résistante *V. riparia* témoigne de l'excellente sensibilité de détection par HRMS, malgré un développement extrêmement limité du mildiou sur cet hôte.

Nos analyses par LC-MS ont également permis de mettre en évidence une modification du profil lipidique du mildiou au cours de l'infection. A partir de ces résultats, des hypothèses peuvent être proposées sur la localisation structurale des trois grandes familles de lipides détectés. La présence notable d'AA dans les sporanges, ainsi que l'apparition de cette molécule et de ses dérivés au moment de la sporulation, suggère que ces lipides sont particulièrement présents dans les sporanges de *P. viticola*. Alors que le mildiou peut sporuler dès 72 hpi lorsque son développement n'est pas perturbé, la résistance Rpv3 portée par la variété Bianca ralentit la croissance et la sporulation du pathogène, ce qui explique le décalage temporel dans l'apparition de l'AA et de ses dérivés entre les feuilles de Syrah et de Bianca. Cette hypothèse est soutenue par des résultats récents obtenus après l'analyse conjointe des lipides de *P. viticola* et de la sporulation après infection d'une gamme de variétés de vigne plus ou moins résistantes au mildiou. Un test de Pearson montre une excellente corrélation entre l'AA et ses dérivés et l'intensité de la sporulation (Fig. C1).

## Conclusion générale



L'EPA et ses dérivés sont détectés de manière importante lors des phases plus tardives de l'infection. Ces résultats amènent à penser qu'il pourrait s'agir de lipides accumulés au cours du développement du mycélium. Le mildiou croit difficilement sur *V. riparia* et il n'atteint jamais le développement mycélien observé chez les variétés sensibles, ce qui pourrait expliquer la détection de faibles niveaux d'EPA et de ses dérivés.

Les céramides semblent quant à eux très bien corrélés au niveau de résistance de la vigne durant la phase biotrophe du cycle infectieux (24 hpi à 72 hpi), ainsi qu'au niveau de sporulation finale (Fig. C1). Ces lipides semblent ainsi refléter fidèlement le déroulement de la phase biotrophe caractérisée par la formation des haustoria. L'influence du degré de

## Conclusion générale

compatibilité de l'interaction vigne-mildiou sur la formation des haustoria a été décrite durant l'étude du développement de *V. vinifera* cv. *Müller-Thurgau* (variété sensible) et *V. riparia*. (Unger *et al.*, 2007). Les mécanismes de résistance de *V. riparia* inhibent la formation des haustoria, qui, s'ils parviennent à se développer, sont beaucoup plus petits que sur la variété sensible. En première ligne face aux mécanismes de défense de la plante, les haustoria sont dégradés rapidement, ou contenus dans des capsules de callose produites par la plante lors des interactions incompatibles (Lu *et al.*, 2012). La corrélation des différentes familles de lipides avec des phases particulières du développement de l'infection devra être confirmée par de nouvelles analyses, mais l'identification de ces trois familles de lipides offre de nouvelles perspectives pour l'étude dynamique de l'interaction entre le mildiou et la vigne.

## **2. Analyse de l'interaction de la vigne avec *P. viticola*, en situation compatible et incompatible**

### ***2.1 Analyse qualitative de l'interaction***

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance partielle de la variété Bianca, les caractéristiques du développement de l'isolat virulent Lednice ont été analysées par microscopie, puis comparées aux événements observés durant l'infection de Bianca par l'isolat incompatible Colmar. La capacité infectieuse de Lednice a été évaluée selon le nombre de zoospores contenues par sporange, le nombre de stomates infectés lors d'une inoculation à concentration saturante et enfin le nombre de spores accrochées par stomates. Les résultats obtenus montrent une moindre efficacité infectieuse de l'isolat Lednice par rapport à l'isolat Colmar, avec un plus faible nombre de spores contenues par sporange. En outre, la plus faible capacité d'enkystement des zoospores de Lednice aboutit à un pourcentage de stomates infectés nettement inférieur à celui observé lors de l'inoculation de l'isolat Colmar (en moyenne, 25% de stomates infectés par Lednice, et 55% lors de l'infection par Colmar). Les mêmes pourcentages de stomates infectés que ceux relevés chez Bianca ont été observés lors de l'infection de la variété Syrah, suggérant une perte de l'efficacité d'adhésion de l'isolat Lednice indépendamment des caractéristiques de l'hôte. Plus généralement, le développement de l'isolat Lednice sur les vignes dépourvues de gène de résistance semble ralenti par rapport à celui de Colmar.

L'observation du développement de l'isolat Colmar dans des variétés portant le QTL de résistance *Rpv3* (Bianca, Regent, Johanniter) a mis en évidence l'apparition de trois types

## Conclusion générale

d'évènements: l'apparition d'amas de fluorescence au niveau de l'épiderme de la feuille, la formation de callose et la dégradation des hyphes du mildiou. Ces manifestations liées à la résistance de la feuille apparaissent plus tardivement et avec une amplitude beaucoup moins importante durant le développement infectieux de l'isolat Lednice. La localisation des amas de fluorescence au niveau de l'épiderme de la feuille infectée suppose une reconnaissance des appressoria du pathogène par la plante. Les appressoria des oomycètes ont été principalement étudiés chez des espèces de *Phytophthora*, et peu d'informations sont disponibles sur leur structure chez les mildioux. La protéine CBEL-like (pour cellulose-binding elicitor lectin activity) a été identifiée dans la membrane des appressoriums de *Phytophthora infestans* (Meijer *et al.*, 2006 ; Grenville *et al.*, 2010). Cette protéine a été identifiée comme un éliciteur des mécanismes de défense (Gaulin *et al.*, 2006). Il est possible qu'une protéine similaire soit reconnue par la vigne lors de l'accrochage des zoospores de *P. viticola*. Lednice étant mal reconnu par la plante, la formation de callose et la dégradation des hyphes du pathogène s'en trouvent diminuées. Le contournement de la résistance liée à *Rpv3* par l'isolat Lednice pourrait être dû à une modification ou une absence chez Lednice d'un effecteur spécifiquement reconnu par ce gène de résistance. L'absence de cet effecteur permettrait certes à Lednice d'être virulent sur les variétés de vignes possédant le gène *Rpv3*, mais elle pourrait également être responsable de la plus faible efficacité infectieuse de l'isolat Lednice par rapport à un isolat classique tel que Colmar.

### **2.2 Quantification de la biomasse du mildiou au cours de l'infection**

La caractérisation de nouveaux lipides spécifiques du mildiou et leur détection précoce durant le cycle infectieux du mildiou a permis le développement d'une nouvelle technique de quantification de la biomasse du pathogène. Afin de déterminer les performances de ce nouvel outil, le développement de l'isolat Colmar a été analysé sur les variété Syrah (sensible), Bianca (partiellement résistante) et *V. riparia* (résistante). Parallèlement, une approche par qPCR a été mise au point, pour quantifier le gène mitochondrial du cytochrome B (cytoB) ainsi que du gène nucléaire eIF1a du pathogène. Des méthodes basées sur la qPCR ont été développées pour la quantification de différents oomycètes (Anderson *et al.*, 2015 ; Silvar *et al.*, 2015), mais la mise au point d'une méthode de quantification de la biomasse de *P. viticola* par qPCR permet de disposer d'un outils précieux pour l'étude des relations vigne-mildiou.

L'analyse du développement de l'infection par *P. viticola* a donc été abordée de manière comparative par trois techniques: la quantification des lipides en LC-MS, la qPCR et la

## Conclusion générale

quantification de la sporulation, complétées par une observation microscopique du développement du mildiou. Un test de Pearson a permis de l'excellente corrélation l'intensité des lipides détectés et la quantification par qPCR. La quantification des lipides et la qPCR permettent une analyse précoce du développement du mildiou (dès 24 hpi). Par rapport à la qPCR, la préparation des échantillons pour les analyses LC-MS est simple et la lecture des résultats est immédiate. La quantification des lipides en LC-MS en fin du cycle infectieux est parfaitement corrélée à la quantification de la sporulation. A ce stade, la quantification de la sporulation par analyse d'image présente l'avantage d'être une méthode non destructive et à haut débit. Par contre, dans certaines situations ne permettant pas d'utiliser l'analyse d'image (feuilles poilues, nécrose importante), la quantification des lipides constitue une méthode de choix pour analyser le développement de l'infection.

La qPCR, l'analyse LC-MS et la quantification de la sporulation apportent des informations différentes et complémentaires sur l'interaction de la vigne et du mildiou. La mise au point et la comparaison des performances de ces différentes méthodes de quantification feront l'objet d'une publication qui est actuellement en cours de rédaction.

### ***2.3 Analyse métabolomique de l'interaction de la vigne avec *P. viticola*, en situation compatible et incompatible***

L'analyse comparative du métabolome de la variété Bianca durant une interaction compatible (Lednice) et incompatible (Colmar) a été effectuée dans le but de mieux caractériser les conséquences du déclenchement des mécanismes de défense de la vigne. Une première étape a consisté en une analyse ciblée en LC-MS d'une sélection de molécules potentiellement impliquées dans les défenses de la vigne. Dans une seconde approche des analyses globales en LC-MS et RMN ont permis de comparer le métabolome de la vigne au cours de l'interaction avec *P. viticola*, en situation compatible et incompatible.

#### ***2.3.1 Perturbation du métabolisme primaire***

L'hétérogénéité des échantillons infectés par l'isolat "Colmar" n'ayant malheureusement pas permis une caractérisation satisfaisante des variations du métabolisme primaire durant l'interaction incompatible, nos analyses se sont focalisées sur l'interaction compatible. L'analyse par RMN a mis en évidence une accumulation de la valine, la leucine, et l'isoleucine dans les échantillons inoculés par Lednice. Aucun rôle dans les mécanismes de défense n'a été rapporté pour ces acides-aminés, ce qui suggère que ces accumulations

## Conclusion générale

pourraient résulter du détournement de métabolisme de la plante au profit de pathogène. En revanche, la quantité importante de GABA dans les feuilles infectées par *Lednice* pourrait correspondre à une réponse non-spécifique au stress biotique induit par le pathogène (Shelp *et al.*, 1999 ; Bolton *et al.*, 2009). L'accumulation de proline dans tous les échantillons inoculés et non-inoculés pourrait être liée aux conditions expérimentales, l'accumulation de proline chez les plantes témoignant généralement d'un stress hydrique (Arrazate *et al.*, 2005).

*Lednice* provoque également une importante perturbation du métabolisme des glucides. Le saccharose est détecté en quantité moindre dans les échantillons infectés par rapport aux échantillons non-inoculés. À l'inverse, la quantité d'hexoses augmente après inoculation par *Lednice*. Ces résultats rejoignent les observations faites lors de l'analyse non-ciblée en LC-MS, où une accumulation de dérivés d'hexoses est spécifiquement observée dans les échantillons infectés par *Lednice* à 72 hpi. Ceci est cohérent avec des résultats montrant que l'interaction compatible d'oomycètes de l'ordre Péronosporales avec leur hôte entraîne une diminution de la quantité de saccharose et une augmentation de concentration d'hexoses dans les tissus infectés (Chou *et al.*, 2000 ; Scharte *et al.*, 2005).

### 2.3.2 Induction du métabolisme de défense

Les échantillons inoculés par l'isolat Colmar se caractérisent par une accumulation d'acide salicylique. La production de cette phytohormone est classiquement induite lors de la reconnaissance par la plante de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), et conduit à l'activation des réponses de défense (Halim *et al.*, 2006). Les quantités d'acide salicylique détectées dans les échantillons infectés par *Lednice* sont du même ordre de grandeur que dans les échantillons non-inoculés. Ceci suggère que *Lednice* n'est pas reconnu comme un agresseur par la Bianca, ou bien qu'un effecteur de cet isolat est capable de bloquer la production d'acide salicylique. De plus, la quantification de l'acide jasmonique, une seconde phytohormone essentielle dans les systèmes de défense des plantes, met en évidence un profil inattendu. Cette phytohormone s'accumule en effet dans les échantillons non-inoculés et infectés par Colmar, mais a tendance à diminuer durant l'interaction compatible avec *Lednice*, indiquant que cet isolat pourrait être capable d'inhiber la biosynthèse d'acide jasmonique.

En comparaison de *Lednice*, l'infection par l'isolat Colmar induit une accumulation massive de molécules de défense telles que les stilbènes et les flavonoïdes. Certaines viniférines détectées lors de l'analyse non ciblée en LC-MS pourraient correspondre à de

## Conclusion générale

nouveaux hétérodimères de picéatannol et resvératrol, mais une analyse plus poussée de ces molécules sera nécessaire pour de valider leur identification.

L'étude de l'interaction de la variété Bianca avec *P. viticola* en situation compatible et incompatible permet donc de proposer plusieurs hypothèses :

1. La variété Bianca détecterait les souches classiques de *P. viticola* dès l'apparition des premiers appressoria. En raison du contournement de la résistance liée à Rpv3 par Lednice, Bianca reconnaît difficilement l'isolat Lednice, ce qui provoque une diminution des réponses de défense, comme la formation de callose, ou l'accumulation d'acide salicylique.

2. La diminution de l'acide jasmonique dans les feuilles inoculées par Lednice par rapport aux échantillons infectés par Colmar et aux témoins non-inoculés semble mettre en évidence une répression de la voie de synthèse de l'acide jasmonique, ou une induction de la dégradation de cette molécule.

Ces premiers résultats intéressants devront être confirmés par des analyses plus poussées des voies des acides salicylique et jasmonique lors de l'interaction avec Lednice. L'exploitation globale des résultats obtenus en LC-MS, en RMN et en EHD, actuellement en cours permettra d'offrir une vision globale des modifications du métabolisme de la vigne au cours de l'infection par *P. viticola*, en condition compatible et incompatible.

# *Bibliographie*

---





# Bibliographie

---

- Adam-Blondon A F, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D, & This P** (2004) Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theoretical and Applied Genetics* **109**(5): 1017-1027
- Agrios G** (1997) *Plant pathology*. Fourth edition. Academic Press, San Diego, California, USA
- Akhouri RR, Bhattacharyya A, Pattnaik P, Malhotra P, Sharma A** (2004) Structural and functional dissection of the adhesive domains of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). *Biochem J* **379**: 815–822
- Ali K, Maltese F, Zyprian E, Rex M, Choi YH, Verpoorte R** (2009) NMR Metabolic Fingerprinting Based Identification of Grapevine Metabolites Associated with Downy Mildew Resistance. *J Agric Food Chem* **57**: 9599–9606
- Allen RN, Harvey JD** (1974) Negative chemotaxis of zoospores of *Phytophthora cinnamomi*. *J Gen Microbiol* **84**: 28–38
- Allen RN, Newhook FJ** (1973) Chemotaxis of zoospores of *Phytophthora cinnamomi* to ethanol in capillaries of soil pore dimensions. *Transactions of the British Mycological Society* **61**: 287–302
- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring J-L, Gindro K** (2011) The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiol Biochem* **49**: 265–274
- Anderson RG, Deb D, Fedkenheuer K, McDowell JM** (2015) Recent Progress in RXLR Effector Research. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 1063–1072
- Anderson RG, McDowell JM** (2015) A PCR assay for the quantification of growth of the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* **16**: 893–898
- Appiah AA, van West P, Osborne MC, Gow NAR** (2005) Potassium homeostasis influences the locomotion and encystment of zoospores of plant pathogenic oomycetes. *Fungal Genet Biol* **42**: 213–223
- Avrova AO, Boevink PC, Young V, Grenville-Briggs LJ, van West P, Birch PRJ, Whisson SC** (2008) A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cell Microbiol* **10**: 2271–2284
- Beakes G W, Glockling S L, & Sekimoto S** (2012) The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma* **249**(1), 3-19
- Behrens HM, Weisenseel MH, Sievers A** (1982) Rapid Changes in the Pattern of Electric Current around the Root Tip of *Lepidium sativum* L. following Gravistimulation. *Plant Physiol* **70**: 1079–1083
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon A-F, Cipriani G, Morgante M, Testolin R, Di Gaspero G** (2009) Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine “Bianca” is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor Appl Genet* **120**: 163–176
- Bimpong CE, Clerk GC** (1970) Motility and Chemotaxis in Zoospores of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. *Ann Bot* **34**: 617–624
- Bircher U, Hohl HR** (1997) Environmental signalling during induction of appressorium formation in *Phytophthora*. *Mycol Res* **101**: 395–402
- Blanco FA, Judelson HS** (2005) A bZIP transcription factor from *Phytophthora* interacts with a protein kinase and is required for zoospore motility and plant infection. *Mol Microbiol* **56**: 638–648
- Blasi P, Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Rühl E H, Mestre P, & Merdinoglu D** (2011). Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics* **123**(1), 43-53.
- Blasi P** (2010) Analyse génétique comparée de la résistance à *Plasmopara viticola* chez les espèces apparentées à la vigne-thèse doct., Université de Strasbourg, France
- Bloodgood RA** (1991) Transmembrane signaling in cilia and flagella. *Protoplasma* **164**: 12–22

## Bibliographie

- Bostock RM, Kuc JA, Laine RA** (1981) Eicosapentaenoic and Arachidonic Acids from *Phytophthora infestans* Elicit Fungitoxic Sesquiterpenes in the Potato. *Science* **212**: 67–69
- Bostock RM, Savchenko T, Lazarus C, Dehesh K** (2011) Eicosapolyenoic acids: novel MAMPs with reciprocal effect on oomycete-plant defense signaling networks. *Plant Signal Behav* **6**: 531–533
- Bozkurt TO, Belhaj K, Dagdas YF, Chaparro-Garcia A, Wu C-H, Cano LM, Kamoun S** (2015) Rerouting of Plant Late Endocytic Trafficking Toward a Pathogen Interface. *Traffic* **16**: 204–226
- Bozkurt TO, Schornack S, Banfield MJ, Kamoun S** (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 483–492
- Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM** (2008) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl Environ Microbiol* **74**: 738–744
- Broembsen von SL, Deacon JW** (1996) Effects of calcium on germination and further zoospore release from zoospore cysts of *Phytophthora parasitica*. *Mycol Res* **100**: 1498–1504
- Broembsen von SL, Deacon JW** (1997) Calcium Interference with Zoospore Biology and Infectivity of *Phytophthora parasitica* in Nutrient Irrigation Solutions. *Phytopathology* **87**: 522–528
- Brouwer M, Lievens B, Van Hemelrijck W, van den Ackerveken G, Cammue BPA, Thomma BPHJ** (2003) Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiol Lett* **228**: 241–248
- Brunner F, Rosahl S, Lee J, Rudd JJ, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D, Nürnberger T** (2002a) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora transglutaminases*. *EMBO J* **21**: 6681–6688
- Brunner F, Wirtz W, Rose JKC, Darvill AG, Govers F, Scheel D, Nürnberger T** (2002b) A beta-glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete, *Phytophthora infestans*. *Phytochem* **59**: 689–696
- Butault J P, Dedryver C A, Gary C, Guichard L, Jacquet F, Meynard J M, ... & Savini I** (2010) Synthèse du rapport d'étude Écophyto R&D: quelles voies pour réduire l'usage des pesticides? (Doctoral dissertation, Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer)
- Byrt PN, Irving HR, Grant BR** (1982) The effect of cations on zoospores of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. *J Gen Microbiol* **128**: 1189–1198
- Cahill DM, Hardham AR** (1994a) Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **84**: 193–200
- Cahill DM, Hardham AR** (1994b) A dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi* in soils. *Phytopathology* **84**: 1284–1292
- Cameron JN, Carlile MJ** (1978) Fatty acids, aldehydes and alcohols as attractants for zoospores of *Phytophthora palmivora*. *Nature* **271**: 448–449
- Carlile MJ** (1983) Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*, APS Press. 95–107
- Carzaniga R, Bowyer P, O'Connell RJ** (2001) Production of extracellular matrices during development of infection structures by the downy mildew *Peronospora parasitica*. *New Phytol* **149**: 83–93
- Casagrande K, Falginella L, Castellarin S D, Testolin R, & Di Gaspero G** (2011) Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. *Planta* **234**(6), 1097-1109
- Chen W J, Delmotte F, Cervera S R, Douence L, Greif C, & Corio-Costet M F** (2007) At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(16): 5162-5172.
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, et al** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532
- Connolly MS, Williams N, Heckman CA, Morris PF** (1999) Soybean isoflavones trigger a calcium influx in *Phytophthora sojae*. *Fungal Genet Biol* **28**: 6–11
- Deacon JW, Saxena G** (1998) Germination triggers of zoospore cysts of *Aphanomyces euteiches*. *Mycol Res* **102**: 33–41
- Declercq B, Devlamynck J, De Vleeschauwer D, Cap N, De Nies J, Pollet S, Höfte M** (2011) New Insights

## Bibliographie

in the Life Cycle and Epidemics of *Phytophthora porri*. *J Phytopathol* **160**: 67–75

**Di Gaspero G, Cipriani G, Adam-Blondon A F, & Testolin R** (2007). Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. *Theoretical and Applied Genetics* **114**(7), 1249–1263

**Díez-Navajas AM, Wiedemann-Merdinoglu S, Greif C, Merdinoglu D** (2008) Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology* **98**: 776–780

**Donaldson SP, Deacon JW** (1993) Changes in motility of *Pythium* zoospores induced by calcium and calcium-modulating drugs. *Mycol Res* **97**: 877–883

**Doud MB, Koksall AC, Mi L-Z, Song G, Lu C, Springer TA** (2012) Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 7817–7822

**Duan D, Halter D, Baltenweck R, Tisch C, Tröster V, Kortekamp A, Hugueney P, Nick P** (2015) Genetic diversity of stilbene metabolism in *Vitis sylvestris*. *J Exp Bot* **66**: 3243–3257

**Enkerli K, Mims CW, Hahn MG** (1997) Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Can J Bot* **75**: 1493–1508

**Fawke S, Doumane M, Schornack S** (2015) Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 263–280

**Figueiredo A, Fortes AM, Ferreira S, Sebastiana M, Choi YH, Sousa L, Acioli-Santos B, Pessoa F, Verpoorte R, Pais MS** (2008) Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *J Exp Bot* **59**: 3371–3381

**Fischer B M, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards K J, Töpfer R, & Zyprian E M** (2004) Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **108**(3): 501–515

**Förster H, Tyler BM, Coffey MD** (1994) *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 780–791

**Galet P** (1977) *Les Maladies et les Parasites de la Vigne* (No. 634.81 G3)

**Galiana E, Rivière M-P, Pagnotta S, Baudouin E, Panabières F, Gounon P, Boudier L** (2005) Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Cell Microbiol* **7**: 1365–1378

**Gandhi SR, Weete JD** (1991) Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. *J Gen Microbiol* **137**: 1825–1830

**Gaulin E, Bottin A, Dumas B** (2010) Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. *Plant Signal Behav* **5**: 258–260

**Gaulin E, Dramé N, Lafitte C, Torto-Alalibo T, Martinez Y, Ameline-Torregrosa C, Khatib M, Mazarguil H, Villalba-Mateos F, Kamoun S, et al** (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell* **18**: 1766–1777

**Gaulin E, Jauneau A, Villalba F, Rickauer M, Esquerré-Tugayé M-T, Bottin A** (2002) The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var-*nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J Cell Sci* **115**: 4565–4575

**Gessler C, Pertot I, Perazzolli M** (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* **1**–42

**Gilchristt** (1996) Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 189–196

**Gisi U** (1983) Biophysical aspects of the development of *Phytophthora*, APS Press. 109–119

**Görnhardt B, Rouhara I, Schmelzer E** (2000) Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 32–42

**Gow NA** (1993) Nonchemical signals used for host location and invasion by fungal pathogens. *Trends Microbiol* **1**: 45–50

**Grando M S, Bellin D, Edwards K J, Pozzi C, Stefanini M, & Velasco R** (2003). Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. *Theoretical and applied genetics*, **106**(7): 1213–1224

**Grant BR, Griffith JM, Irving HR** (1986) A model to explain ion-induced differentiation in zoospores of

## Bibliographie

Phytophthora palmivora. *Exp Mycol* **10**: 89–98

**Grant BR, Irving HR, Radda M** (1985) The effect of pectin and related compounds on encystment and germination of *Phytophthora palmivora* zoospores. *J Gen Microbiol* **131**: 669–676

**Grenville-Briggs LJ, Avrova AO, Hay RJ, Bruce CR, Whisson SC, van West P** (2010) Identification of appressorial and mycelial cell wall proteins and a survey of the membrane proteome of *Phytophthora infestans*. *Fungal Biol* **114**: 702–723

**Grenville-Briggs LJ, van West P** (2005) The biotrophic stages of oomycete-plant interactions. *Adv Appl Microbiol* **57**: 217–243

**Griffith JM, Iser JR, Grant BR** (1988) Calcium control of differentiation in *Phytophthora palmivora*. *Arch Microbiol* **149**: 565–571

**Gubler F, Hardham AR** (1988) Secretion of adhesive material during encystment of *Phytophthora cinnamomi* zoospores, characterized by immunogold labelling with monoclonal antibodies to .... *J Cell Sci* **90**: 225–235

**Gubler F, Hardham AR, Duniec J** (1989) Characterizing adhesiveness of *Phytophthora cinnamomi* zoospores during encystment. *Protoplasma* **149**: 24–30

**Halsall DM, Forrester RI** (1977) Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium, and iron ions. *Can J Microbiol* **23**: 994–1001

**Hardham AR** (1985) Studies on the cell surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*: The influence of fixation on patterns of lectin binding. *J Histochem Cytochem* **33**: 110–118

**Hardham AR** (2005) *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Plant Pathol* **6**: 589–604

**Hardham AR** (2007) Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cell Microbiol* **9**: 31–39

**Horio T, Kawabata Y, Takayama T, Tahara S** (1992) A potent attractant of zoospores of *Aphanomyces cochlioides* isolated from its host, *Spinacia oleracea*. *Experientia* **48**: 410–414

**Hsu F-F, Turk J** (2002) Characterization of ceramides by low energy collisional-activated dissociation tandem mass spectrometry with negative-ion electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* **13**: 558–570

**Hu L, Wang D, Liu L, Chen J, Xue Y, Shi Z** (2013) Ca<sup>2+</sup> Efflux Is Involved in Cinnamaldehyde-Induced Growth Inhibition of *Phytophthora capsici*. *PLoS ONE* **8**: e76264

**Irving HR, Griffith JM, Grant BR** (1984) Calcium efflux associated with encystment of *Phytophthora palmivora* zoospores. *Cell Calcium* **5**: 487–500

**Jackson SL, Hardham AR** (1996) A transient rise in cytoplasmic free calcium is required to induce cytokinesis in zoosporangia of *Phytophthora cinnamomi*. *Eur J Cell Biol* **69**: 180–188

**Johnson R** (1981) Durable resistance: definition of genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* **71**(6), 567-568.

**Jones SW, Donaldson SP, Deacon JW** (1991) Behaviour of zoospores and zoospore cysts in relation to root infection by *Pythium aphanidermatum*. *New Phytol* **117**: 289–301

**Judelson HS, Blanco FA** (2005) The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nat Rev Microbiol* **3**: 47–58

**Judelson HS, Roberts S** (2002) Novel Protein Kinase Induced during Sporangial Cleavage in the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Eukaryotic Cell* **1**: 687–695

**Kamoun S, Huitema E, Vleeshouwers V** (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci* **4**: 196–200

**Kamoun S** (2003) Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic cell* **2**(2), 191-199

**Katsura K, Masago H, Miyata Y** (1966) Movements of zoospores of *Phytophthora capsici*. I. Electrotaxis in some organic solutions. **32**: 215–220

**Kebdani N, Pieuchot L, Deleury E, Panabieres F, Le Berre J-Y, Gourgues M** (2010) Cellular and molecular characterization of *Phytophthora parasitica* appressorium-mediated penetration. *New Phytol* **185**: 248–257

**Khew KL, Zentmyer GA** (1973) Chemotactic response of zoospores of five species of *Phytophthora*. **63**: 1511–1517

## Bibliographie

- Kiefer B, Riemann M, Büche C, Kassemeyer H-H, Nick P** (2002) The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* **215**: 387–393
- Kim H, Gandhi SR, Moreau RA, Weete JD** (1998) Lipids of *Haliphthoros philippinensis*: An oomycetous marine microbe. *J Am Oil Chem Soc* **75**: 1657–1665
- Kinoshita K, Takahashi K, Zama K** (1986) Triarachidonin and Diarachidonylphosphatidylcholine in “Ogonori” *Gracilaria verrucosa*. *Bull Japan Soc Sci Fish* **52**: 757
- Koh S, André A, Edwards H, Ehrhardt D, Somerville S** (2005) *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *Plant J* **44**: 516–529
- Kong P, Moorman GW, Lea-Cox JD, Ross DS, Richardson PA, Hong C** (2009) Zoospore tolerance to pH stress and its implications for *Phytophthora* species in aquatic ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4307–4314
- Kortekamp A** (2005) Staining methods for the investigation of *Plasmopara viticola* and its infection structures in semi-thin sections. *VITIS-Journal of Grapevine Research* **44**: 45–47
- Kortekamp A** (2006) Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Biochem* **44**: 58–67
- Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, et al** (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature* **451**: 835–840
- Latijnhouwers M, Ligterink W, Vleeshouwers VGAA, van West P, Govers F** (2003) A  $G\alpha$  subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiol* **51**: 925–936
- Latijnhouwers M, Munnik T, Govers F** (2002) Phospholipase D in *Phytophthora infestans* and Its Role in Zoospore Encystment. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 939–946
- Legay G, Marouf E, Berger D, Neuhaus JM** (2011) Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with through suppression subtractive hybridization (SSH). *Eur J Plant Pathol* **129**: 281–301
- Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J** (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746–785
- Lenzi L, Caruso C, Bianchedi PL, Pertot I, Perazzolli M** (2016) Laser Microdissection of Grapevine Leaves Reveals Site-Specific Regulation of Transcriptional Response to *Plasmopara viticola*. *Plant and Cell Physiology* **57**: 69–81
- Leverly SB, Toledo MS, Doong RL, Straus AH, Takahashi HK** (2000) Comparative analysis of ceramide structural modification found in fungal cerebrosides by electrospray tandem mass spectrometry with low energy collision-induced dissociation of  $Li^+$  adduct ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**: 551–563
- Lhomme O, Bruneteau M, Costello CE, Más P, Molot PM, Dell A, Tiller PR, Michel G** (1990) Structural investigations and biological activity of inositol sphingophospholipids from *Phytophthora capsici*. *Eur J Biochem* **191**: 203–209
- Longman D, Callow JA** (1987) Specific saccharide residues are involved in the recognition of plant root surfaces by zoospores of *Pythium aphanidermatum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **30**: 139–159
- Lu Y-J, Schornack S, Spallek T, Geldner N, Chory J, Schellmann S, Schumacher K, Kamoun S, Robatzek S** (2012) Patterns of plant subcellular responses to successful oomycete infections reveal differences in host cell reprogramming and endocytic trafficking. *Cell Microbiol* **14**: 682–697
- Malacarne G, Vrhovsek U, Zulini L, Cestaro A, Stefanini M, Mattivi F, Delledonne M, Velasco R, Moser C** (2011) Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol* **11**: 114
- Marguerit E, Boury C, Manicki A, Donnart M, Butterlin G, Némorin A, ... & Decroocq S** (2009) Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **118**(7), 1261–1278
- María Laxalt A, Latijnhouwers M, van Hulten M, Govers F** (2002) Differential expression of G protein alpha and beta subunit genes during development of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol* **36**: 137–146

## Bibliographie

- Marino R, Sevini F, Madini A, Vecchione A, Pertot I, Serra A D, ... & Grando M S** (2003) QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. *Acta Horticulturae* **2**: 527-534
- Meijer HJG, van de Vondervoort PJI, Yin QY, de Koster CG, Klis FM, Govers F, de Groot PWJ** (2006) Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1348–1358
- Merdinoglu D, Wiedeman-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G, & Greif C** (2003) Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae*
- Merdinoglu D, Butterlin G, Bevilacqua L, Chiquet V, Adam-Blondon A F, & Decroocq S** (2005). Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding* **15**(4): 349-366
- Meyer D, Pajonk S, Micali C, O'Connell R, Schulze-Lefert P** (2009) Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *Plant J* **57**: 986–999
- Miller AL, Gow N** (1989) Correlation between profile of ion-current circulation and root development. *Physiol Plant* **75**: 102–108
- Miller AL, Smith GN, Raven JA, Gow N** (1991) Ion currents and the nitrogen status of roots of *Hordeum vulgare* and non-nodulated *Trifolium repens*. *Plant Cell Environ* **14**: 559–567
- Mims CW, Richardson EA** (2003) Ultrastructure of the zoosporangia of *Albugo ipomoeae-panduratae* as revealed by conventional chemical fixation and high pressure freezing followed by freeze substitution. *Mycologia* **95**: 1–10
- Mitchell HJ, Hardham AR** (1999) Characterisation of the water expulsion vacuole in *Phytophthora nicotianae* zoospores. *Protoplasma* **206**: 118–130
- Moreau RA, Young DH, Danis PO, Powell MJ** (1998) Identification of ceramide-phosphorylethanolamine in oomycete plant pathogens: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora capsici*. *Lipids* **33**: 307–317
- Morris BM, Gow N** (1993) Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* **83**: 877–882
- Morris PF, Ward E** (1992) Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. *Physiol Mol Plant Pathol* **40**: 17–22
- Mostafa NA, Maher A, Abdelmoez W** (2013) Production of mono-, di-, and triglycerides from waste fatty acids through esterification with glycerol. *Adv Biosci Biotechnol*. doi: 10.4236/abb.2013.49118
- Murphy RC** (2015) Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids. 194–232
- Mutemberezi V, Masquelier J, Guillemot-Legris O, Muccioli GG** (2016) Development and validation of an HPLC-MS method for the simultaneous quantification of key oxysterols, endocannabinoids, and ceramides: variations in metabolic syndrome. *Anal Bioanal Chem* **408**: 733–745
- O'Brien DJ, Kurantz MJ, Kwoczak R** (1993) Production of eicosapentaenoic acid by the filamentous fungus *Pythium irregulare*. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**: 211–214
- O'Connell RJ, Panstruga R** (2006) Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol* **171**: 699–718
- Palloix A, Ayme V, & Moury B** (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**(1): 190-199
- Pang K-L, Lin H-J, Lin H-Y, Huang Y-F, Chen Y-M** (2015) Production of arachidonic and eicosapentaenoic acids by the marine oomycete *Halophytophthora*. *Mar Biotechnol* **17**: 121–129
- Peressotti E, Duchêne E, Merdinoglu D, Mestre P** (2011) A semi-automatic non-destructive method to quantify grapevine downy mildew sporulation. *J Microbiol Meth* **84**: 265–271
- Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, Testolin R, Merdinoglu D, Mestre P** (2010) Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol* **10**: 147
- Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O** (2003)  $\delta$ -Viniferin, a Resveratrol

## Bibliographie

- Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *J Agric Food Chem* **51**: 5488–5492
- Pivot V, Bruneteau M, Más P, Bompeix G, Michel G** (1994) Isolation, Characterization and Biological Activity of Inositol Sphingophospholipids From *Phytophthora capsici*. *Lipids* **29**: 21–25
- Polesani M, Bortesi L, Ferrarini A, Zamboni A, Fasoli M, Zadra C, Lovato A, Pezzotti M, Delledonne M, Polverari A** (2010) General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC genomics* **11**: 117
- Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A** (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC genomics* **9**: 142
- Raftoyannis Y, Dick MW** (2006) Zoospore encystment and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species on plant roots. *Microbiol Res* **161**: 1–8
- Rathore KS, Goldsworthy A** (1985) Electrical control of growth in plant tissue cultures. *Nat Biotech* **3**: 253–254
- Reiss K, Kirchner E, Gijzen M, Zocher G, Löffelhardt B, Nürnberger T, Stehle T, Brunner F** (2011) Structural and phylogenetic analyses of the GP42 transglutaminase from *Phytophthora sojae* reveal an evolutionary relationship between oomycetes and marine *Vibrio* bacteria. *J Biol Chem* **286**: 42585–42593
- Riemann M, Büche C, Kassemeyer HH, Nick P** (2002) Cytoskeletal responses during early development of the downy mildew of grapevine (*Plasmopara viticola*). *Protoplasma* **219**: 13–22
- Robold AV, Hardham AR** (2005) During attachment *Phytophthora* spores secrete proteins containing thrombospondin type 1 repeats. *Curr Genet* **47**: 307–315
- Savchenko T, Walley JW, Chehab EW, Xiao Y, Kaspi R, Pye MF, Mohamed ME, Lazarus CM, Bostock RM, Dehesh K** (2010) Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *Plant Cell* **22**: 3193–3205
- Schwander F, Eibach R, Fechter I, Hausmann L, Zyprian E, & Töpfer R** (2012). Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* **124**(1): 163-176.
- Shimizu S, Shinmen Y, Kawashima H, Akimoto K, Yamada H** (1988) Fungal mycelia as a novel source of eicosapentaenoic acid. Activation of enzyme(s) involved in eicosapentaenoic acid production at low temperature. *Biochem Biophys Res Commun* **150**: 335–341
- Shirasaka N, Shimizu S** (1995) Production of eicosapentaenoic acid by *Saprolegnia* sp. 28YTF-1. *J Am Oil Chem Soc* **72**: 1545–1549
- Shreaz S, Sheikh RA, Bhatia R, Neelofar K, Imran S, Hashmi AA, Manzoor N, Basir SF, Khan LA** (2011) Antifungal activity of  $\alpha$ -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. *Biometals* **24**: 923–933
- Sing VO, Bartnicki-Garcia S** (1975a) Adhesion of *Phytophthora palmivora* zoospores: electron microscopy of cell attachment and cyst wall fibril formation. *J Cell Sci* **18**: 123–132
- Sing VO, Bartnicki-Garcia S** (1975b) Adhesion of *Phytophthora palmivora* zoospores: detection and ultrastructural visualization of concanavalin A-receptor sites appearing during encystment. *J Cell Sci* **19**: 11–20
- Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, Custodio DE, Abagyan R, Siuzdak G** (2005) METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit* **27**: 747–751
- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G** (2006) XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal Chem* **78**: 779–787
- Spencer D** (1981) *The downy mildews*, Academic Press, London
- Soylu S** (2004) Ultrastructural characterisation of the host-pathogen interface in white blister-infected *Arabidopsis* leaves. *Mycopathologia* **158**: 457–464
- Spring O, Haas K** (2002) The fatty acid composition of *Plasmopara halstedii* and its taxonomic significance. *Eur J Plant Pathol* **108**: 263–267



## Bibliographie

- Spring O, Haas K** (2004) Eicosapentaenoic acid, a possible marker for downy mildew contamination in sunflower seeds. *Advances in Downy Mildew Research—Volume 2*
- Stassen JHM, van den Ackerveken G** (2011) How do oomycete effectors interfere with plant life? *Curr Opin Plant Biol* **14**: 407–414
- Sugimoto T, Watanabe K, Yoshida S, Aino M** (2008) Select calcium compounds reduce the severity of Phytophthora stem rot of soybean. *Plant Dis* **92**: 1559–1565
- Takayama T, Mizutani J, Tahara S** (1998) Drop Method as a Quantitative Bioassay Method of Chemotaxis of *Aphanomyces cochlioides* Zoospore. *Ann Phytopathol Soc Japan* **64**: 175–178
- Toko K, Fujiyoshi T, Tanaka C, Iiyama S, Yoshida T** (1989) Growth and electric current loops in plants. *Biophys Chem* **33**: 161–176
- Troutman JL, Wills WH** (1964) Electrotaxis of *Phytophthora parasitica* zoospores and its possible role in infection of tobacco by the fungus. **54**: 225–228
- Tucker RP** (2004) The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 969–974
- Tucker SL, Talbot NJ** (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 385–417
- Tyler BM** (2002) Molecular basis of recognition between phytophthora pathogens and their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 137–167
- Tyler BM, Wu M, Wang J, Cheung W, Morris PF** (1996) Chemotactic Preferences and Strain Variation in the Response of *Phytophthora sojae* Zoospores to Host Isoflavones. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2811–2817
- Unger S, Büche C, Boso S, Kassemeyer H-H** (2007) The Course of Colonization of Two Different Vitis Genotypes by *Plasmopara viticola* Indicates Compatible and Incompatible Host-Pathogen Interactions. *Phytopathology* **97**: 780–786
- van West P, Morris BM, Reid B, Appiah AA, Osborne MC, Campbell TA, Shepherd SJ** (2002) Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 790–798
- Viennot-Bourgin G** (1949) The parasitic fungi of cultivated plants. Volume I. Les champignons parasites des plantes cultivées. Tome I., xv+1.
- Vleeshouwers VG, van Dooiuweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT** (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: 853–864
- Walker CA, van West P** (2007) Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* **21**: 10–18
- Wang Y, Li A, Wang X, Zhang X, Zhao W, Dou D, Zheng X, Wang Y** (2010) GPR11, a putative seven-transmembrane G protein-coupled receptor, controls zoospore development and virulence of *Phytophthora sojae*. *Eukaryotic Cell* **9**: 242–250
- Warburton A, Deacon J** (1998) Transmembrane Ca<sup>2+</sup> fluxes associated with zoospore encystment and cyst germination by the phytopathogen *phytophthora parasitica*. *Fungal Genet Biol* **25**: 54–62
- Wawra S, Belmonte R, Löbach L, Saraiva M, Willems A, van West P** (2012) Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Current Opinion in Microbiology* **15**: 685–691
- Welter L J, Göktürk-Baydar N, Akkurt M, Maul E, Eibach R, Töpfer R, & Zyprian E M** (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Molecular Breeding* **20**(4): 359-374
- Weste G** (1983) *Phytophthora cinnamomi*: the dynamics of chlamydospore formation and survival. *J Phytopathol* **106**: 163–176
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, et al** (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**: 115–118
- Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Coste P, Dumas V, Butterlin G, Bouquet A, & Merdinoglu D** (2006) Genetic analysis of resistance to downy mildew from *Muscadinia rotundifolia*. In 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding (Vol. 2, No. 06.07, p. 2006)
- Wong F P, Burr H N, & Wilcox W F** (2001) Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **50**(4): 427-432

## Bibliographie

- Wu J, Zhang Y, Zhang H, Huang H, Folta KM, Lu J** (2010) Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biol* **10**: 234
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**: 764–767

# Résumé

---

Le mildiou causé par l'oomycète *Plasmopara viticola* est l'une des maladies les plus importantes de la vigne (*Vitis vinifera*). La création de variétés de vignes naturellement résistantes constitue une alternative respectueuse de l'environnement à l'utilisation de fongicides contre le mildiou. Cependant, un déploiement optimal de variétés résistantes nécessite une excellente connaissance des relations entre la vigne et *P. viticola*. Ces connaissances fondamentales pourront ensuite alimenter les stratégies pour le développement de variétés durablement résistantes au vignoble. Bianca est une variété de vigne résistante au mildiou qui possède le gène résistance *Rpv3*. Cette variété est résistante à la plupart des souches de *P. viticola*. Cependant, une souche virulente capable de l'infecter a été isolée. Dans ce projet, un pathosystème original, fondé sur la variété Bianca confrontée à une souche avirulente et à une souche virulente de *P. viticola*, a été utilisé pour obtenir une image complète de l'impact sur la vigne de l'infection par *P. viticola* en situation compatible et incompatible, en combinant des études de physiopathologie avec des analyses métabolomiques par spectrométrie de masse à haute résolution et par résonance magnétique nucléaire. Parallèlement, l'identification de métabolites et de séquences géniques spécifiques de *P. viticola* a permis le développement de méthodes de suivi dynamique de l'infection, grâce à la PCR quantitative et à la quantification de lipides caractéristiques de l'agent pathogène.

Mots clés : Vigne, mildiou, résistance, métabolomique

## **Abstract**

Downy mildew, caused by the oomycete *Plasmopara viticola* is one of the most damaging diseases of grapevine (*Vitis vinifera*). The creation of naturally resistant grapevine varieties is an environment-friendly alternative to the use of fungicides against downy mildew. However, optimal deployment of resistant varieties requires an excellent knowledge of the relationship between grapevine and *P. viticola*. This fundamental knowledge can then feed the strategies for the development of grapevine varieties with sustainable resistance. Bianca is a downy mildew-resistant grapevine variety, due its *Rpv3* resistance gene. This variety is resistant to most strains of *P. viticola*. However, a virulent strain capable of infecting Bianca has recently been isolated. In this project, we use an original pathosystem based on Bianca facing either a virulent or an avirulent strain of *P. viticola*. This pathosystem was used to obtain a complete picture of the impact *P. viticola* infection on grapevine in both compatible and incompatible situations, by combining physiopathological studies with metabolomic analyses using high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. In addition, the identification of specific metabolites and gene sequences from *P. viticola* has allowed the development of original methods for dynamic monitoring of the infection process, through quantitative PCR and quantification of specific lipids.

Keywords: Grapevine, downy mildew, resistance, metabolomics





## ANALYSE INTEGREE DE LA REPONSE DE LA VIGNE A L'INFECTION PAR *P. VITICOLA*

*Par l'étude d'un cas de contournement  
de résistance*

### Résumé

La création de variétés de vignes naturellement résistantes constitue une alternative respectueuse de l'environnement à l'utilisation de fongicides contre le mildiou. Cependant, un déploiement optimal de variétés résistantes nécessite une excellente connaissance des relations entre la vigne et *P. viticola*. Ces connaissances fondamentales pourront ensuite alimenter les stratégies pour le développement de variétés durablement résistantes au vignoble. Bianca est une variété de vigne résistante au mildiou qui possède le gène résistance Rpv3. Cette variété est résistante à la plupart des souches de *P. viticola*. Cependant, une souche virulente capable de l'infecter a été isolée. Dans ce projet, ce nouveau pathosystème original a été utilisé pour obtenir une image complète de l'impact sur la vigne de l'infection par *P. viticola*, en combinant des études de physiopathologie avec des analyses métabolomiques. Parallèlement, l'identification de métabolites et de séquences géniques spécifiques de *P. viticola* a permis le développement de méthodes de suivi dynamique de l'infection, par PCR quantitative et quantification de lipides caractéristiques du mildiou.

**Mots clés** : Vigne, mildiou, résistance, métabolomique

### Abstract

The creation of naturally resistant grapevine varieties is an environment-friendly alternative to the use of fungicides against downy mildew. However, optimal deployment of resistant varieties requires an excellent knowledge of the relationship between grapevine and *P. viticola*. This fundamental knowledge can then feed the strategies for the development of grapevine varieties with sustainable resistance. Bianca is a downy mildew-resistant grapevine variety, due its Rpv3 resistance gene. This variety is resistant to most strains of *P. viticola*. However, a virulent strain capable of infecting Bianca has recently been isolated. In this project, we use this original pathosystem to obtain a complete picture of the impact *P. viticola* infection on grapevine, by combining physiopathological studies with metabolomic analyses. In addition, the identification of specific metabolites and gene sequences from *P. viticola* has allowed the development of original methods for dynamic monitoring of the infection process, through quantitative PCR and quantification of specific lipids.

**Keywords**: Grapevine, downy mildew, resistance, metabolomics