



HAL
open science

Les microalgues : nouvelles sources de molécules élicitrices pour la santé et la défense des plantes.

Coralie Chuberre

► **To cite this version:**

Coralie Chuberre. Les microalgues : nouvelles sources de molécules élicitrices pour la santé et la défense des plantes.. Biologie végétale. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR079 . tel-02957216

HAL Id: tel-02957216

<https://theses.hal.science/tel-02957216>

Submitted on 5 Oct 2020

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.



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE - 4200006

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Les microalgues : nouvelles sources de molécules élicitrices pour la santé et la défense des plantes

Présentée et soutenue par

Coralie CHUBERRE

Thèse soutenue publiquement le 4 Octobre 2019
devant le jury composé de

Mme Carole DELEU	MCF-HDR, UMR IGEPP 1349, Université de Rennes 1, Rennes	Rapporteur
M. Xavier DAIRE	Ingénieur de recherche-HDR UMR Agroécologie 1347, INRA centre de Dijon	Rapporteur
M. Philippe REIGNAULT	PR, Directeur du Laboratoire de la santé des végétaux, ANSES	Examineur
Mme Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI	PR, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le vivant EA4492, Université Littoral Côte d'Opale	Examineur
M. Jean-Claude MOLLET	PR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Mustapha ARKOUN	Chargé de Recherche, Centre Mondial d'innovation Roullier, Saint-Malo	Membre invité
Mme Maïté VICRE	MCF-HDR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mme Muriel BARDOR	PR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse
M. Bruno GÜGI	MCF, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Co-encadrant de thèse

Thèse dirigée par Dr. Maïté VICRE et Pr. Muriel BARDOR et co-encadrée par Dr. Bruno GÜGI Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE - 4200006

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Les microalgues : nouvelles sources de molécules élicitrices pour la santé et la défense des plantes

Présentée et soutenue par

Coralie CHUBERRE

Thèse soutenue publiquement le 4 Octobre 2019
devant le jury composé de

Mme Carole DELEU	MCF-HDR, UMR IGEPP 1349, Université de Rennes 1, Rennes	Rapporteur
M. Xavier DAIRE	Ingénieur de recherche-HDR UMR Agroécologie 1347, INRA centre de Dijon	Rapporteur
M. Philippe REIGNAULT	PR, Directeur du Laboratoire de la santé des végétaux, ANSES	Examineur
Mme Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI	PR, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le vivant EA4492, Université Littoral Côte d'Opale	Examineur
M. Jean-Claude MOLLET	PR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Mustapha ARKOUN	Chargé de Recherche, Centre Mondial d'innovation Roullier, Saint-Malo	Membre invité
Mme Maïté VICRE	MCF-HDR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mme Muriel BARDOR	PR, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse
M. Bruno GÜGI	MCF, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie	Co-encadrant de thèse

Thèse dirigée par Dr. Maïté VICRE et Pr. Muriel BARDOR et co-encadrée par Dr. Bruno GÜGI Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV, EA 4358), Université de Rouen Normandie

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement M. Xavier DAIRE, Ingénieur de recherche à l'INRA de Dijon et Mme Carole DELEU, Maître de conférences à l'Université de Rennes 1, de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. Carole c'est avec un plaisir tout particulier que je vous remets ce mémoire. Le monde de la recherche s'est ouvert à moi lorsque j'ai commencé mon premier stage à vos côtés, vous avez contribué à mon développement personnel et je souhaitais terminer ce travail avec vous.

Je remercie également M. Philippe REIGNAULT, Professeur au Laboratoire de santé des végétaux d'Angers, Mme Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI, Professeure à l'Université Littoral Côte d'Opale de Calais, M. Jean-Claude MOLLET, Professeur à l'Université de Rouen Normandie et M. Mustapha ARKOUN, Chargé de recherche au Centre mondial d'innovation de Saint-Malo qui me font l'honneur de juger ce travail.

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été menés au sein du Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV EA4358) de l'Université de Rouen Normandie. Je remercie la région Normandie pour le soutien financier à l'origine de ce projet de thèse. Je tiens également à remercier l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE) grâce à laquelle j'ai pu suivre des formations de qualité et présenter mes travaux en anglais lors de la journée des doctorants.

Au-delà de l'acquisition de techniques, de connaissances et du raisonnement scientifique, cette thèse m'a permis de gagner en maturité. Tout ceci n'aurait pu être réalisé sans un ensemble de personnes à qui j'adresse mes plus sincères remerciements ainsi que le témoignage de mon plus profond respect.

Je tiens sincèrement à remercier mes directrices et mon encadrant de thèse qui ont su, par leur passion et leur énergie, instaurer une bonne dynamique de travail. Maïté, je souhaite vous exprimer ma gratitude pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et pour m'avoir accordé votre confiance pendant ces trois années. Merci pour votre aide et vos conseils lors de nos réflexions et de la rédaction de ce manuscrit. Muriel, merci beaucoup pour avoir trouvé tant de temps à consacrer à ma thèse, j'ai même empiété sur vos week-ends. Tout ce travail serait loin d'être aussi abouti sans votre aide : vous avez toujours été là pour me conseiller et m'apporter votre regard critique. Un grand merci pour votre gentillesse et votre investissement sans faille dans ce travail. Les SDP n'ont maintenant plus de secrets pour nous ! Bruno, je vous ai dérangé tant de fois dans votre bureau et vous m'avez toujours accueillie avec un grand sourire. Votre


bonne humeur et votre joie de vivre ont su adoucir « ce petit caractère » dans les moments de doute. Vos conseils et vos encouragements m'ont été précieux tout au long de ma thèse ! J'ai vraiment adoré travailler avec vous et je me rends compte que c'est déjà fini. Mais je peux vous garantir sûrement que vous aurez de mes nouvelles Û 😊 !

Ma thèse ne serait rien sans votre aide et votre passion à tous les 3 : un grand merci !

Mes plus vifs remerciements vont à Carole BUREL (Maman du labo) qui m'a apporté ses connaissances, ses compétences en extractions de protéines (je vais pouvoir commencer, moi aussi, à revendiquer de l'expérience) et son enthousiasme au cours de mes années de thèse. Merci pour nos moments partagés, j'ai été ravie de travailler avec toi. Merci à Marie-Christine et à Carole PLASSON pour votre aide technique, je vous ai souvent dérangées pour vous demander des conseils et vous avez toujours su m'accorder du temps. Merci à Estelle MONFRAY pour tous les litres d'eau de mer filtrés ! Merci à Azeddine DRIOUICH pour le bon pain et nos discussions fort intéressantes.

Je remercie vivement tous ceux dont la collaboration a enrichi ces travaux. Philippe Chan de la plateforme protéomique PISSARO de l'Université de Rouen pour son aide et le temps qu'il a su m'accorder. Damien SCHAPMAN de la plateforme PRIMACEN de l'Université de Rouen, merci pour ta patience et ta disponibilité en matière de microscopie. Les monstros plantes nous ont donné du fil à retordre. Vincent FERRIERES et Laurent LEGENTIL de l'école nationale supérieure de chimie de Rennes, merci d'avoir accepté une biologiste parmi les chimistes. J'ai vraiment apprécié mon séjour au sein de votre équipe.

Et maintenant vient le tour des doctorants ! Ces 3 années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans vous. Merci à tous pour votre bonne humeur et pour nos moments passés ensemble (parfois un peu fous). Aline, Marie, Mathilde, Marc, Angèle, Romain, Charlotte merci pour votre amitié, faire une pause avec vous est un réel plaisir. Au fait, est ce que j'ai pensé à vous montrer mon cucurbitacé ? Rodolphe, Pierre-Louis, Jérémy (Team bureau), j'ai passé d'excellents moments en votre compagnie même si je ne sais pas qui de vous ou de moi a été le plus courageux pour supporter l'autre. Rodolphe, tous les siphons sont maintenant à toi, tu vas pouvoir buller en toute tranquillité. Pierre-Louis, je sais que tu es fan de ta microalgue mais j'ai vérifié, il n'y avait pas de chlamy avec bulle, le sirop n'est pas une source de carbone adapté à leur croissance. Jérémy, plus j'y pense et plus je me dis qu'en étant « comme ça comme ça », la probabilité d'accepter de perdre un cookie est normalement statistiquement impossible avec une p-value de 0,05. Finalement tu as déjoué les lois de la probabilité. Merci pour ton aide, ce fut un plaisir de partager ton bureau !

Ce n'est que le début d'une aventure passionnante et j'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de travailler ensemble ! Ah oui j'oubliais, pour vous faire plaisir : 

Mes remerciements ultimes vont à ma famille qui a toujours cru en moi et m'a toujours soutenue pendant ces trois ans.

Les travaux décrits dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV EA4358) de l'Université de Rouen Normandie. Ce projet de recherche est situé à l'interface entre deux thématiques de recherche : (1) l'étude des glycomolécules et des défenses racinaires et (2) l'étude des voies de *N*-glycosylation chez les microalgues.

Certaines maladies végétales ont marqué l'histoire en raison de leurs conséquences désastreuses.

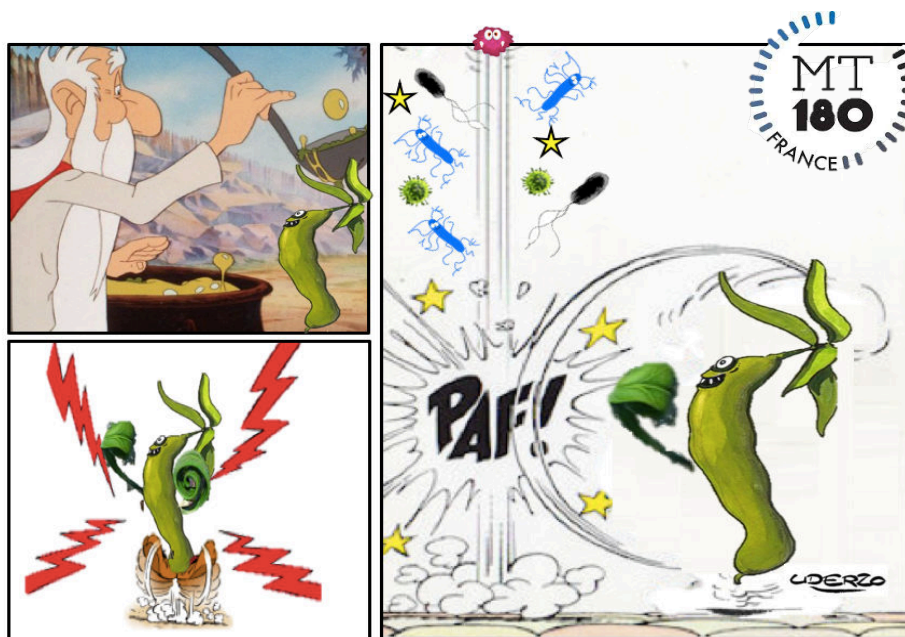
En 1846, l'arrivée de l'oomycète *Phytophthora infestans* en Irlande a détruit la quasi-totalité des cultures de pommes de terre du pays, nourriture de base de la population. Cette forte chute de production engendra une famine d'une grande ampleur et l'exode massif des populations (Vanhaute, Paping, et Ó Grada 2006). Aujourd'hui, les pertes annuelles causées par *Phytophthora infestans* sont encore estimées à plus de 2 milliards de dollars (Esquerré-Tugayé 2001).

Jusqu'en 1880, les anglais étaient des buveurs de café grâce à leurs cultures de caféiers au Sri Lanka (Lepoivre 2003). La production connut une forte augmentation (50 000 tonnes) grâce à des conditions de culture favorables et minutieuses (Mauro 2002). Cependant, la totalité des caféiers fût détruite à la fin du XIX^{ème} siècle par le champignon *Hemileia vastatrix* responsable de la rouille, aucun des géotypes de caféiers n'a pu résister à ce pathogène (McCook 2006). La culture d'arabica n'étant plus possible à moins d'utiliser des traitements agronomiques coûteux, les caféiers furent remplacés par des théiers et les anglais devinrent des buveurs de thé.

C'est à partir de cette époque que les produits phytosanitaires ont connu leur essor. L'usage massif des pesticides a permis d'augmenter la production agricole en diminuant les pertes de rendement liées aux organismes pathogènes. Toutefois, l'histoire nous rattrape. Nous sommes aujourd'hui confrontés à une recrudescence des maladies végétales causées par les insectes ravageurs et pathogènes devenus résistants aux pesticides (Liu et Chen 2016; Brent et Hollomon 2007). La situation est aggravée par l'émergence de nouvelles maladies (Lefeuvre et al. 2010; Bebber, Ramotowski, et Gurr 2013). De plus, l'aspect non spécifique et la toxicité des produits phytosanitaires contribuent aussi à un désamour de la population envers ces produits. La volonté de réduire la dépendance de l'agriculture vis-à-vis des produits phytosanitaires, la volonté de tendre vers une agriculture biologique, nous poussent à trouver de nouvelles alternatives de luttés contre les pathogènes plus durables et respectueuses de l'environnement.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de recherche. L'objectif de ce travail de recherche est de trouver une alternative durable, qui répond aux attentes sociétales et qui permet de limiter l'usage massif et systématique des produits phytosanitaires. La compréhension du fonctionnement de l'immunité végétale a permis la valorisation de nouvelles molécules d'origine naturelle intervenant dans la protection des plantes. Ces molécules appelées Stimulateurs de Défense des Plantes (SDP) sont capables de mimer l'action d'organismes pathogènes après application sur les plantes et agissent à l'image d'un vaccin. Dans cette thèse, le potentiel SDP de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum* sera évalué sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et sur la plante d'intérêt agronomique *Pisum sativum*.

Ce travail de recherche a fait l'objet d'une vulgarisation scientifique dans le cadre du concours national intitulé Ma Thèse en 180 secondes. Lors de cette présentation, j'ai essayé de convaincre le grand public que les microalgues pourraient être l'ingrédient secret de la potion de Panoramix pour vacciner les plantes.



- Bebber, Daniel P., Mark A. T. Ramotowski, et Sarah J. Gurr. 2013. « Crop Pests and Pathogens Move Polewards in a Warming World ». *Nature Climate Change* 3 (11): 985-88.
- Brent, Keith J., et Derek W. Hollomon. 2007. *Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed?* FRAC Monograph, no. 1. Brussels
- Esquerré-Tugayé. 2001. « Plantes et agents pathogènes, une liaison raffinée et dangereuse : l'exemple des champignons ». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324 (10): 899-903.
- Lefevre, Pierre, Darren P. Martin, Gordon Harkins, Philippe Lemey, Alistair J. A. Gray, Sandra Meredith, Francisco Lakay, et al. 2010. « The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World ». Édité par Claude Fauquet. *PLoS Pathogens* 6 (10)
- Lepoivre, Philippe. 2003. *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Presses agronomiques
- Liu, Che, et Chen. 2016. « Multiple-Fungicide Resistance to Carbendazim, Diethofencarb, Procyimdone, and Pyrimethanil in Field Isolates of Botrytis Cinerea from Tomato in Henan Province, China ». *Crop Protection* 84: 56-61.
- Mauro, Frédéric. 2002. *Histoire du café*. Paris: Desjonquères.
- McCook, Stuart. 2006. « Global Rust Belt: *Hemileia Vastatrix* and the Ecological Integration of World Coffee Production since 1850 ». *Journal of Global History* 1 (2): 177-95
- Vanhaute, Paping, et Ó Grada. 2006. « The European subsistence crisis of 1845-1850: a comparative perspective ». *IEHC Helsinki*, 2006.

Liste des figures :

FIGURE 1 :	PRINCIPAUX FACTEURS ABIOTIQUES ET BIOTIQUES POUVANT ALTERER LA CROISSANCE DES PLANTES.	14
FIGURE 2 :	ORGANISATION STRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DE LA CUTICULE.	18
FIGURE 3 :	INITIATION ET DEVELOPPEMENT D'UN TRICHOME GLANDULAIRE CHEZ <i>N. TABACUM</i> .	20
FIGURE 4 :	REPRESENTATION DES DIFFÉRENTS TYPES D'HÉMICELLULOSES (A) ET DE PECTINES (B) PRESENTES DANS LA PAROI CELLULAIRE DES PLANTES TERRESTRES SELON LA NOMENCLATURE DES GLYCANES.	23
FIGURE 5 :	PHOTOGRAPHIES PRISES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UN HYDATHODE (A) ET D'UN STOMATE FOLIAIRE (B-C) INFECTES PAR DES CELLULES BACTERIENNES.	25
FIGURE 6 :	PHOTOGRAPHIE PRISE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE D'UN CHAMPIGNON <i>BLUMERIA GRAMINIS</i> (B.G) PENETRANT UNE CELLULE D'ORGE.	25
FIGURE 7 :	MÉCANISMES DE RECONNAISSANCE D'UNE ATTAQUE PAR UN PATHOGENE CHEZ LA PLANTE.	27
FIGURE 8 :	MÉCANISMES DE RECONNAISSANCE DE LA FLAGELLINE 22 IMPLIQUANT LES RECEPTEURS RLK FLS2/BAK1/BIR1 ET LE COMPLEXE PROTEIQUE G.	30
FIGURE 9 :	IMPLICATION DES DIFFERENTS RECEPTEURS PROTEIQUES DANS LES MECANISMES DE RESISTANCE CHEZ LES VEGETAUX.	31
FIGURE 10 :	MÉCANISME DE PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.	35
FIGURE 11 :	IMPLICATION DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LES MECANISMES DE DEFENSE A LA SUITE D'UNE ATTAQUE PAR UN AGENT PATHOGENE.	37
FIGURE 12 :	IMPLICATION DES DIFFERENTES VOIES HORMONALES DANS LA DEFENSE CONTRE DES ORGANISMES PATHOGENES CHEZ LA PLANTE MODELE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .	39
FIGURE 13 :	OBSERVATION PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE DES DEPOTS DE CALLOSE, COLORES A L'ANILINE BLEUE, SUR DES FEUILLES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> SUITE A UN TRAITEMENT AVEC UN ELICITEUR (FLG22 1 μ M).	42
FIGURE 14 :	CARACTERISATION DES DIFFERENTES PROTEINES PR EN FONCTION DE L'ESPECE VEGETALE OU ELLES ONT ETE DECOUVERTES ET EN FONCTION DE LEURS PROPRIETES « DEFENSIVES ».	42
FIGURE 15 :	DISTRIBUTION DES PRINCIPALES VOIES D'ENTREES POUR LES MICROORGANISMES BENEFIQUES ET PATHOGENES DANS LA RACINE.	46
FIGURE 16 :	DYNAMIQUE D'INFECTION DES FEUILLES ET DES RACINES DE MAÏS PAR LE CHAMPIGNON COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA.	49
FIGURE 17 :	LES CELLULES FRONTIERES (AC-DC) : DETACHEMENT DE L'APEX ET LES DEUX TYPES MAJORITAIRES D'AC-DC.	49
FIGURE 18 :	OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DU RET FORME PAR LES AC-DC ET LE MUCILAGE CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EN CONDITIONS NON ELICITEES (A-D) ET ELICITEES (B-C) AVEC LA FLG22.	51
FIGURE 19 :	MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'ADN EXTRACELLULAIRE ET DE SON IMPLICATION DANS LA DEFENSE LORS DE L'INTERACTION <i>N. HAEMATOCOCCA/PISUM SATIVUM</i> .	51
FIGURE 20 :	MISE EN EVIDENCE DES PONTS MOLECULAIRES DE XYLOGLUCANE ENTRE LES CELLULES BORDANTES (AC-DC).	52
FIGURE 21 :	STRATEGIES EMPLOYEES POUR LA PROTECTION DES PLANTES.	70
FIGURE 22 :	LOCALISATION DES STOMATES DE <i>VITIS VINIFERA L.</i> ET IMPACT DE L'ASSIMILATION DE LAMINARINE SULFATE EN FONCTION DES FACES FOLIAIRES TRAITEES.	75
FIGURE 23 :	PHOTOGRAPHIES PRISES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION DES FACES FOLIAIRES ABAXIALE (INFERIEURE) (A) ET ADAXIALE (SUPERIEURE) (B).	75
FIGURE 24 :	COMPARAISON DES NIVEAUX DE PENETRATION DE LA LAMINARINE SULFATE (1 G.L ⁻¹) LORSQUE CELLE-CI EST FORMULEE AVEC DE L'EAU OU AVEC UN TENSIACTIF (DEHSCOFIX 0,1%) APRES TRAITEMENT DE FEUILLES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (FACE ADAXIALE).	78
FIGURE 25 :	SUIVI DE L'ABSORPTION CELLULAIRE <i>IN VITRO</i> DU CHITOSANE (CHT) ET DE NANOPARTICULES DE CHITOSANE (CNP) MARQUES A L'ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCINE (FITC) DANS DES CELLULES FOLIAIRES DE <i>CAMELLIA SINENSIS</i> .	78
FIGURE 26 :	ÉCHELLE DE NOTATION DE MALADIE POUR LE COUPLE <i>M. PINODES</i> /POIS.	80
FIGURE 27 :	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES METHODES D'APPLICATION D'EXTRAITS D'ALGUES, DE LEUR EFFET ET DES MECANISMES D' ACTIONS ENGENDRES CHEZ LES PLANTES.	80
FIGURE 28 :	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE MONTRANT L'ATTACHEMENT DE BACTERIES SUR LA MICROALGUE <i>PSEUDO-NITZSCHIA MULTISERIES</i> .	88
FIGURE 29 :	FULTOPORTULATA ET FIBRES DE β -CHITINE CHEZ LA MICROALGUE <i>THALASSIOSIRA FLUVIATILIS</i> .	88
FIGURE 30 :	PHOTOGRAPHIES DES DIFFERENTS MORPHOTYPES DE <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> PRISES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.	91
FIGURE 31 :	PREDISPOSITION MORPHOLOGIQUE DES DIX SOUCHES ACTUELLEMENT ETUDIEES DANS LES LABORATOIRES DE RECHERCHE AINSI QUE LE GENOTYPE ASSOCIE AU POLYMORPHISME DE LA REGION ITS2.	91
FIGURE 32 :	ORGANISATION STRUCTURALE DES CELLULES FUSIFORMES ET DES CELLULES TRIRADIEES.	93

FIGURE 33 :	ORGANISATION STRUCTURALE DE LA PAROI CELLULAIRE DES CELLULES FUSIFORMES OBSERVEE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.	93
FIGURE 34 :	PHOTOGRAPHIES DE CELLULES OVALES AVEC DIFFERENTS DEGRES DE SILICIFICATION (MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE).	95
FIGURE 35 :	ORGANISATION STRUCTURALE DE LA PAROI DES CELLULES DU MORPHOTYPE OVALE OBSERVEE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION.	95
FIGURE 36 :	CINETIQUE DE CROISSANCE DES TROIS MORPHOTYPES DE LA SOUCHE Pt3 (FUSIFORME, OVALE ET TRIRADIE) ET DE LA SOUCHE Pt1.8.6 MORPHOTYPE FUSIFORME.	104
FIGURE 37 :	ÉVALUATION DE LA QUALITE DES ARN EXTRAITS A PARTIR DE PLANTES ENTIERES TRAITEES AVEC LES ELICITEURS.	121
FIGURE 38 :	REPRESENTATION GRAPHIQUE DU LOG DE QUANTITE D'ADNC EN FONCTION DE LA MOYENNE DE CT POUR CHAQUE COUPLE D'AMORCES. LES COURBES SONT OBTENUES <i>VIA</i> QRT-PCR PAR DILUTION EN CASCADE AU TIERS A PARTIR DE L'ÉCHANTILLON D'ADNC DILUE AU 10 ^{ÈME}	128
FIGURE 39 :	PLANTES D'ARABIDOPSIS THALIANA AGEES DE 3 SEMAINES TRAITEES PAR PULVERISATION FOLIAIRE AVEC UN VOLUME DE 1 ML D'ELICITEUR.	132
FIGURE 40 :	TEST DE RESISTANCE DE <i>P. SATIVUM</i> CONTRE L'AGENT PATHOGENE <i>M. PINODES</i> SUR STIPULES OU FOLIOLES DETACHES.	134
FIGURE 41 :	PLANTES DE <i>PISUM SATIVUM</i> AGEES DE 15 JOURS TRAITEES PAR PULVERISATION FOLIAIRE AVEC UN VOLUME DE 2 ML D'ELICITEUR.	134
FIGURE 42 :	ÉCHELLE DE NOTATION DE MALADIE POUR LE COUPLE <i>M. PINODES</i> /POIS.	135
FIGURE 43 :	MISE EN EVIDENCE D'UNE REPONSE SYSTEMIQUE DANS LES ORGANES NON TRAITES APRES TRAITEMENT DES PARTIES FOLIAIRES OU DES PARTIES RACINAIRES.	141
FIGURE 44 :	COMPOSITION MONOSACCHARIDE DES RESIDUS INSOLUBLES DANS L'ALCOOL (AIR) EXTRAITS A PARTIR DES CELLULES DE <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i>	143
FIGURE 45 :	ETUDE DE L'EFFET INDUCTEUR D'EXTRAIT AIR (0,1 MG. ML ⁻¹) ET D'HOMOGENAT DE LA MICROALGUE <i>P. TRICORNUTUM</i> (10 MG. ML ⁻¹ , MASSE SECHE/VOLUME) SUR L'EXPRESSION DES PROMOTEURS DES GENES DE DEFENSE <i>CYP71A12</i> , <i>MYB51</i> ET <i>WRKY11</i> COUPLES AU GENE RAPPORTEUR GUS APRES 24H D'ELICITATION DES RACINES AGEES DE 7 JOURS.	145
FIGURE 46 :	EXPRESSION DES GENES <i>WRKY11</i> , <i>PER5</i> ET <i>ZAT12</i> DANS LES APEX RACINAIRES DES PLANTES DONT LES RACINES ONT ETE TRAITEES AVEC DE L'EAU, DE LA FLAGELLINE 22 1 μ M (FLG22), DES AIR DE Pt 1.8.6 A 0,1 MG. ML ⁻¹ ET DES HOMOGENATS AUX DOSES DE 10 MG.ML ⁻¹ ET DE 2 MG. ML ⁻¹ RESPECTIVEMENT.	147
FIGURE 47 :	ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES <i>ACS6</i> ET <i>ICS1</i> AU NIVEAU RACINAIRE.	148
FIGURE 48 :	EXPRESSION DES PROMOTEURS DES GENES DE DEFENSE <i>MYB51</i> , <i>CYP71A12</i> , ET <i>WRKY11</i> COUPLES AU GENE RAPPORTEUR GUS APRES 24 H D'ELICITATION FOLIAIRE.	148
FIGURE 49 :	COMPARAISON DE L'EFFET ELICITEUR PAR DEUX METHODES D'ELICITATION : ELICITATION FOLIAIRE ET ELICITATION DE LA PLANTULE ENTIERE EN MILIEU LIQUIDE, SUR L'EXPRESSION DE GENES DE DEFENSE <i>WRKY11</i> , <i>ACS6</i> , <i>ICS1</i> ET <i>MYB51</i>	151
FIGURE 50 :	EFFET DES HOMOGENATS ET DES AIR SUR LE DEVELOPPEMENT DES PLANTES D'ARABIDOPSIS THALIANA.	153
FIGURE 51 :	EFFECTS OF <i>P. TRICORNUTUM</i> CRUDE CELL HOMOGENATES ON (A) PRIMARY ROOT LENGTH, (B) CHLOROPHYLL CONTENT, (C) LEAF AND (D) ROOT BIOMASS, AND (E) ROOT PHENOTYPE AT A HOMOGENATE CONCENTRATION OF 2 MG/ML.	161
FIGURE 52 :	INDUCTION OF <i>PRI</i> : GUS EXPRESSION IN 9-DAY-OLD LEAVES TREATED FOR (A) 24 H WITH WATER, 1 μ M FLG22, OR CELL HOMOGENATES (2 MG/ML) OF Pt1.8.6 FUSIFORM, Pt3 FUSIFORM, Pt3 TRIRADIATE, OR Pt3 OVAL OR FOR (B) 48 H.	163
SCALE BARS = 1 MM. L, LEAVES; C, COTYLEDONS; S, REMAINING SEED COAT. OBSERVATIONS WERE PERFORMED ON 6 TO 10 PLANTS WITH 4 REPLICATES.		163
FIGURE 53 :	EFFECTS OF <i>P. TRICORNUTUM</i> CELL HOMOGENATES ON "ACS6" GENE EXPRESSION TESTED ON ACS6 : YFP ARABIDOPSIS SEEDLINGS EXPRESSION ACS6 : YFP.	165
NINE-DAY-OLD SEEDLINGS WERE TREATED WITH WATER, 1 μ M FLG22, AND CELL HOMOGENATES (2 MG/ML) OF Pt1.8.6 FUSIFORM, Pt3 FUSIFORM, Pt3 TRIRADIATE, AND Pt3 OVAL. FLUORESCENCE (GREEN SPOTS IN LEAF NUCLEI) WAS RECORDED WITH A LASER CONFOCAL MICROSCOPE. SCALE BARS = 500 μ M. REPRESENTATIVE PICTURES OF 3 PLANTS IN 3 BIOLOGICAL REPLICATES.		165
FIGURE 54 :	EFFECTS OF <i>P. TRICORNUTUM</i> CELL HOMOGENATES (2 MG/ML) ON CALLOSE DEPOSITION IN 9-DAY-OLD <i>ARABIDOPSIS</i> LEAVES TREATED FOR 48 H WITH WATER, 1 μ M FLG22, AND CELL HOMOGENATES (2 MG/ML) OF Pt1.8.6 FUSIFORM, Pt3 FUSIFORM, Pt3 TRIRADIATE, AND Pt3 OVAL.	166
FIGURE 55 :	EFFECTS OF <i>P. TRICORNUTUM</i> CELL HOMOGENATES ON THE EXPRESSION OF THE DEFENSE-RELATED GENES (A) <i>RBOHD</i> , (B) <i>ICS1</i> , (C) <i>PR-1</i> , (D) <i>WRKY40</i> , (E) <i>ACS6</i> , (F) <i>LOX3</i> , (G) <i>PAD3</i> , AND (H) <i>PAL1</i> USING QRT-PCR IN 9-DAY-OLD <i>ARABIDOPSIS</i> COL-0 SEEDLINGS.	168
FIGURE 56 :	EFFECTS OF <i>P. TRICORNUTUM</i> CELL HOMOGENATES ON DISEASE SYMPTOM DEVELOPMENT CAUSED BY <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> DC3000 (<i>Pst</i>) IN 4-WEEK-OLD <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> PLANTS.	171
FIGURE 57 :	EFFECTS OF <i>P. TRICORNUTUM</i> CELL HOMOGENATES ON DISEASE SYMPTOM DEVELOPMENT CAUSED BY THE FUNGI <i>MYCOSPHAERELLA PINODES</i>	173

FIGURE 58 : INDUCTION DE L'EXPRESSION DU GENE <i>PR1</i> CHEZ LES PLANTES TRANSFORMEES <i>PR1</i> : GUS APRES APPLICATION DE DIFFERENTES FRACTIONS D'UN HOMOGENAT DE CELLULES BROYEES FUSIFORME PT3.	193
FIGURE 59 : MODELE PROPOSE POUR EXPLIQUER LE MODE D'ACTION DES HOMOGENATS DE CELLULES PT3 BROYEES SUR LES CELLULES VEGETALES.	209

LISTE DES TABLEAUX :

TABLEAU I :	COMPOSITION DU MILIEU NUTRITIF CONWAY ET DE LA SOLUTION SILICATEE.	102
TABLEAU II :	LISTE DES AMORCES FORWARD (F-PRIMER) SPECIFIQUES DE CHAQUE PROMOTEUR ET DE L'AMORCE REVERSE (R-PRIMER) ASSOCIEE AU GENE YFP AVEC LA TAILLE DU FRAGMENT ATTENDUE LORS DE L'AMPLIFICATION.	113
TABLEAU III :	MILIEU REACTIONNEL POUR LES REACTIONS DE PCR SELON LE PROTOCOLE DE LA GoTaq® DNA POLYMERASE (PROMEGA)	114
TABLEAU IV :	PROGRAMME DU THERMOCYCLEUR UTILISE POUR LES REACTIONS DE PCR.....	115
TABLEAU V :	IMPLICATION DES GENES DE DIFFERENTES CONSTRUCTIONS GUS ET YFP DANS LES REPONSES DE DEFENSE POUVANT ETRE ASSOCIEES AUX VOIES HORMONALES DE L'ACIDE SALICYLIQUE (SA), DE L'ACIDE JASMONIQUE (JA) OU DE L'ETHYLENE (ET).....	118
TABLEAU VI :	COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL UTILISE POUR LES REACTIONS DE RETROTRANSCRIPTION SELON LE PROTOCOLE DU KIT HIGH CAPACITY CDNA REVERSE TRANSCRIPTION (APPLIED BIOSYSTEMS).....	122
TABLEAU VII :	SEQUENCES OLIGONUCLEOTIDIQUES DES AMORCES UTILISEES POUR CONTROLER L'EFFICACITE DE LA RETROTRANSCRIPTION (RT) ET L'ABSENCE D'ADNG DANS LES ECHANTILLONS (F : FORWARD ; R : REVERSE ; PEX5 : GENE PEROXINE 5).....	122
TABLEAU VIII :	PROGRAMME DU THERMOCYCLEUR UTILISE POUR LES REACTIONS DE PCR.....	123
TABLEAU IX :	SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES SPECIFIQUES UTILISES POUR L'AMPLIFICATION PAR QRT-PCR DES GENES DE DEFENSE ET DE REFERENCE CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	126
TABLEAU X :	COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL UTILISE POUR LES EXPERIENCES DE QRT-PCR AFIN D'EVALUER LES NIVEAUX DE TRANSCRIPTION DES GENES DE DEFENSE OU DES GENES DE REFERENCE.....	128
TABLEAU XI :	DIRECT EFFECT OF <i>P. TRICORNUTUM</i> CELL HOMOGENATES ON THE BIOTROPHIC BACTERIA <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE DC3000</i> AT 24 H POST TREATMENT.....	172
TABLEAU XII :	TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTS MARQUEURS UTILISES POUR EVALUER L'INDUCTION DES DEFENSES CHEZ LES PLANTES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> APRES UN TRAITEMENT AVEC LES HOMOGENATS FUSIFORME Pt1.8.6, FUSIFORME Pt3, OVALE Pt3, TRIRADIE Pt3 EN COMPARAISON AUX REPONSES DES PLANTES CONTROLE TRAITES AVEC DE L'EAU OU DE LA Flg22.	202

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: oxygène singulet	LysM : Répétitions de motifs Lysine
AC-DC <i>Associated root Cap Derived Cells</i>	MAMPs : <i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>
ADN <i>acide désoxyribo nucléique</i>	Na^+ : ions sodium
ADNex : <i>ADN extracellulaire</i>	NB-LRR : <i>nucleotide binding-site–leucine-rich repeat</i> , : Récepteurs protéiques intracellulaires
AGPs : <i>arabinogalactanes protéines</i>	NET <i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
ASM : <i>acibenzolar-S-methyl</i>	NO : <i>monoxyde d'azote</i>
BC : <i>cellules bordantes</i>	NR : <i>nitrate réductase</i>
BLC : <i>cellules apparentées aux cellules bordantes</i>	O ₂ ⁻ : anion superoxyde
BTH : <i>benzothiadiazole</i>	PAL : <i>Phénylalanine ammonia lyase</i>
Ca^{2+} : <i>ion calcium</i>	PAMPs : <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
Cl^- : <i>ion chlorure</i>	PGN : <i>Peptidoglycane</i>
DAMPs : <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>	PGPR <i>Plant Growth Promoting Bacteria</i>
DMSO : <i>dimethyl sulfoxide</i>	PR : <i>pathogenesis related</i>
DP : <i>degré de polymérisation</i>	PRPs : <i>Protéines Riches en Proline</i>
EPS : <i>exopolysaccharides</i>	PRRs : <i>Pattern recognizing receptors</i>
ER-bodies : <i>corps du réticulum endoplasmiques</i>	Pst : <i>Pseudomonas syringae DC3000</i>
ET : <i>éthylène</i>	PTI : <i>Pathogen/ Pattern/PAMP-Triggered Immunity</i> ou <i>immunité innée</i>
Flg 22 : <i>Flagelline</i>	PUA : <i>aldéhydes poly-insaturés</i>
FlgII-28 : <i>Dérivé de la flagelline</i>	qRT-PCR : <i>quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction, Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
FLS2 : <i>Flagellin sensitive 2</i>	RET : <i>piège extracellulaire racinaire, Root extracellular trap</i>
GalA : <i>acides α (1,4)-D-galacturonique</i>	RG I : <i>rhamnogalacturonanes de type I</i>
GFP : <i>green fluorescent protein</i>	RGII : <i>rhamnogalacturonan de type II</i>
GRPs : <i>Protéines Riches en Glycine</i>	RLKs : <i>receptor like kinase</i> , : Récepteurs kinases
GSL : <i>Glucan Synthase Like</i>	RLPs : <i>receptor-like protein</i> , : Récepteurs protéiques extracellulaires
gus : β - <i>glucuronidase</i>	RMT : <i>Réseau Mixte Technologique</i>
H^+ : <i>proton hydrogène</i>	SA : <i>acide salicylique</i>
H_2O_2 : <i>peroxyde d'hydrogène</i>	SAR : <i>résistance systémique acquise</i>
HGs : <i>homogalacturonanes</i>	SDP : <i>stimulateurs de défense des plantes</i>
HO^- : <i>anion hydroxyle</i>	VOCs : <i>composés organiques volatils</i>
HR : <i>réponse hypersensible</i>	YFP : <i>Yellow fluorescent protein</i>
HRGPs : <i>Glycoprotéines Riches en Hydroxy-proline</i>	
HSTs : <i>Host-selective toxins</i>	
JA : <i>acide jasmonique</i>	
K^+ : <i>ion potassium</i>	
lacZ : β - <i>galactosidase</i>	
LAR : <i>résistance locale</i>	
LPS : <i>Lipopolysaccharides</i>	
LRRs : <i>Répétition de motifs Leucine</i>	

Tables des Matières :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES A L'ECHELLE FOLIAIRE	17
I. Un système de défense constitutif : les barrières naturelles	19
1. La cuticule : une barrière structurale et chimique complexe.....	19
2. Les trichomes au service de la défense des plantes.....	20
3. La paroi végétale : une structure complexe et dynamique	21
II. Les systèmes de défense induits par la plante	26
1. La reconnaissance de l'agent pathogène <i>via</i> les éliciteurs M/P/DAMPs ...	26
2. La résistance non hôte : PAMP-triggered Immunity (PTI).....	32
a) Signalisation par les complexes de signalisation	32
▪ Modification des flux ioniques et activation des MAP-Kinases	33
▪ Production d'espèces réactives de l'oxygène	33
▪ Le monoxyde d'azote	36
b) La transmission du signal : implication des phytohormones	36
▪ L'acide salicylique.....	38
▪ L'acide jasmonique et l'éthylène.....	38
c) Mécanismes de défense de la plante.....	40
▪ Modification de la paroi végétale	41
▪ Activation des gènes de défense	43
MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES A L'ECHELLE RACINAIRE.....	45
I. Les racines : une voie d'entrée pour de nombreux organismes pathogènes	47
II. La défense racinaire : des mécanismes de défense spécifiques	48
1. Les cellules frontières : cellules bordantes et cellules apparentées aux cellules bordantes	48
2. Le piège extracellulaire : RET (Root extracellular Trap).....	50
3. Les ER-bodies	54
III. La défense racinaire : une réponse compartimentée	54

LES STIMULATEURS DE DEFENSES DES PLANTES (SDP) : UNE METHODE DE LUTTE ALTERNATIVE POUR LA PROTECTION DES CULTURES..... 69

1. Les SDP : définition, réglementation et mode d'action 71

IV. Étudier et évaluer l'efficacité de protection d'un SDP 73

1. Détecter les évènements précoces 73
 2. Analyse des évènements cellulaires et moléculaires associés à une induction des mécanismes de défense. 73

a) Étude des niveaux d'expression de gènes 73
 b) Activité enzymatique/Détection de protéines/Modification pariétale..... 74

3. Paramètres expérimentaux à prendre en compte pour l'évaluation de l'efficacité de protection d'un SDP. 74

a) Paramètres liés à la plante : 74
 b) Paramètres liés à la substance élicitrice 76
 c) Paramètres liés au bio-agresseur et au couple plante/pathogène..... 79

V. Les algues marines : une importante source de molécules SDP..... 81

DES ELICITEURS ISSUS DE MICROALGUES : NOUVELLE PISTE DE RECHERCHE ?..... 85

I. Les microalgues : une importante source de biomolécules..... 87

II. Une microalgue modèle : *Phaeodactylum tricornutum* 89

1. *Phaeodactylum tricornutum* : une diatomée atypique..... 90
 2. Les morphotypes fusiformes et triradiés : des morphotypes relativement similaires..... 92
 3. Le morphotype ovale : un morphotype qui semble plus adapté aux stress 94
 4. *Phaeodactylum tricornutum* : production de biomolécules 96

OBJECTIFS DE L'ETUDE 98

MATERIELS ET METHODES101

I. Production d'extraits issus de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*..... 103

1. Obtention des souches de *P. tricornutum* et des morphotypes..... 103
 2. Conditions de culture de *P. tricornutum* 103
 3. Production des extraits de microalgues 105
 a) Les homogénats d'algues broyées 105
 b) Obtention de résidus insolubles dans l'alcool (AIR) à partir de cellules de *P. tricornutum* 105

▪	Analyse de la composition monosaccharidique des AIR de <i>P. tricornutum</i> par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)	106
I.	Préparation des extraits AIR et des homogénats	107
1.	Les AIR	107
2.	Les homogénats de microalgues broyées	107
II.	Préparation du matériel végétal : Stérilisation des graines et conditions de culture in vitro	108
III.	Vérification de l'absence d'effet phyto-toxique des homogénats et des extraits AIR de <i>P. tricornutum</i> sur des plantes d'<i>A. thaliana</i> et de <i>P. sativum</i>	108
1.	Effets des homogénats et des extraits de microalgues sur le taux de germination	109
2.	Effets des homogénats et des extraits sur la longueur racinaire, la production de biomasse et le taux de chlorophylle.....	109
IV.	Étude de l'effet des homogénats et des extraits sur l'activation des défenses des plantes.	110
1.	Lignées transgéniques d' <i>A. thaliana</i> exprimant des protéines reportrices comme YFP et GUS sous le contrôle de différents promoteurs.....	111
a)	Caractérisation des lignées YFP	112
b)	Observation des lignées YFP	116
c)	Caractérisation des lignées GUS	116
d)	Coloration histochimique des lignées GUS	117
2.	Détection des ROS au niveau foliaire	117
3.	Détection des dépôts de callose dans le système racinaire et foliaire	119
4.	Étude des différents niveaux d'expression des gènes de défense par qRT-PCR.....	119
a)	Extraction et dosage des ARN totaux.....	119
b)	Réaction de rétrotranscription (RT) des ARN en ADNc	120
c)	Contrôle de la qualité de la RT par amplification PCR.....	120
d)	Oligonucléotides sélectionnés pour l'étude	124
▪	Choix des gènes	124
e)	Principe de la qRT-PCR.....	127
▪	Étude de l'efficacité des amorces sélectionnées.....	127

▪	Analyse des niveaux d'expression des gènes en réponse aux homogénats par qRT-PCR.....	129
V. Étude de la résistance des plantes d'<i>A. thaliana</i> et de <i>P. sativum</i> après traitement avec les homogénats de microalgues.		130
1.	Résistance au pathogène bactérien <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 chez <i>A. thaliana</i>	130
a)	Préparation de l'inoculum	130
b)	Préparation du matériel végétal.....	131
c)	Traitement et infection des plantes.....	131
2.	Résistance de <i>P. sativum</i> au pathogène fongique <i>M. pinodes</i>	131
a)	Préparation de l'inoculum	131
b)	Préparation du matériel végétal.....	133
▪	Test sur folioles ou stipules excisés maintenus en survie.....	133
▪	Test sur de jeunes plantes	133
VI. Fractionnement des homogénats cellulaires		136
RESULTATS		137
PARTIE I :		138
I. Tests préliminaires de détection de l'activité élicitrice de <i>P. tricornutum</i>.....		139
1.	Prendre en compte la réponse systémique pour améliorer l'efficacité des traitements.....	139
2.	Optimisation des conditions d'élicitation et des paramètres liés à l'utilisation des préparations : AIR et homogénats de cellules broyées	142
3.	Étude de l'effet stimulateur de défense des différents traitements sur des racines d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	142
4.	Étude de l'effet stimulateur de défense des différents traitements sur des feuilles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	149
a)	Élicitation foliaire.....	149
b)	Élicitation des plantules entières.....	150
II. Étude de l'impact phénotypique des différents traitements sur les plantules d'<i>A. thaliana</i>		152
Article I: Homogenates from the diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> are able to trigger plant immunity in <i>Arabidopsis thaliana</i>		156
III. Fractionnement de l'homogénat de cellules broyées.....		192

DISCUSSION	195
I. Mise au point des conditions de l'expérimentation	198
1. Le système racinaire : une nécessité de trouver de nouveaux marqueurs de défense.....	198
2. Étude de la réponse foliaire : choix de la méthode d'élicitation	200
3. Étude de l'impact des homogénats de cellules broyées de <i>P. tricornutum</i> et des morphotypes sur l'induction des défenses des plantes.....	201
a) Caractérisation des voies métaboliques.....	201
b) Étude de la protection induite par les homogénats cellulaires contre des phytopathogènes foliaires.....	204
4. Hypothèse quant au mode d'action des homogénats.....	210
a) Un éliciteur dérivé de la microalgue <i>P. tricornutum</i>	210
b) Interactions microalgues/bactéries	212
c) Les homogénats de la microalgue <i>P. tricornutum</i>	214
CONCLUSION & PERSPECTIVES	217
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	221

Synthèse bibliographique

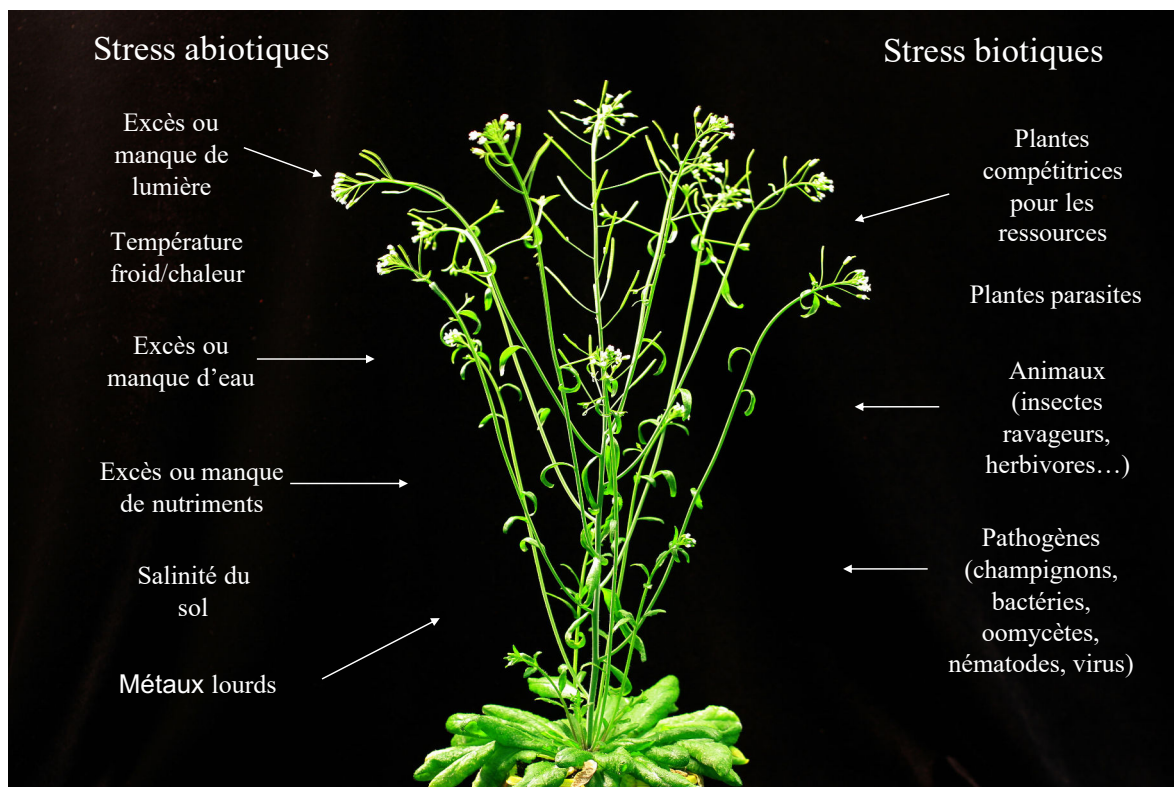


Figure 1 : Principaux facteurs abiotiques et biotiques pouvant altérer la croissance des plantes.

Les pertes de rendement peuvent être engendrées par de mauvaises conditions environnementales (stress abiotiques comme la sécheresse, le/la froid/chaueur, la carence en nutriments, l'excès ou le manque de lumière) mais également par l'attaque d'organismes nuisibles aux cultures (stress biotiques). Les stress biotiques incluent les plantes compétitrices pour les ressources ainsi que les plantes parasites de culture, les animaux nuisibles (insectes, herbivores, oiseaux...) et les organismes pathogènes (champignons, bactéries, virus...). D'après Oerke 2006.

Dans l'environnement, les plantes sont constamment exposées à plusieurs types de stress abiotiques (inadéquation des conditions environnementales) et biotiques (action d'agents infectieux) qui peuvent affecter leur croissance (**figure 1**) (Oerke 2006).

Dans un contexte de production agricole, ces stress peuvent impacter de manière significative les rendements agricoles et entraîner d'importantes pertes économiques. Dès son origine, l'agriculture, en concentrant certaines espèces végétales sur une même surface, a créé des conditions favorables au développement de maladies (Lepoivre 2003; Stukenbrock et McDonald 2008). Le développement d'une maladie peut être présentée comme étant une interaction entre un hôte (la plante), l'environnement et un agent pathogène. Cette interaction, aussi appelée « triangle de maladie », tient compte des facteurs nécessaires à l'apparition de la maladie :

- L'organisme pathogène doit être présent dans l'environnement et être capable de se multiplier pour infecter la plante. La capacité d'un agent infectieux à provoquer une maladie dépend de son pouvoir pathogène. Le pouvoir pathogène d'une espèce se décline selon deux notions : une notion d'agressivité qui renvoie au degré de dommages infligés à l'hôte par l'agent infectieux (composante quantitative) et la notion de virulence qui renvoie à la capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte spécifique (composante qualitative).
- L'organisme pathogène doit trouver un hôte susceptible de devenir malade. L'espèce végétale, le stade de développement de la plante au moment de l'attaque (organes jeunes ou matures), la prédisposition génétique (variété sensible/résistante) et l'état de stress sont des facteurs qui peuvent influencer la sensibilité des plantes aux maladies.
- L'interaction entre l'organisme pathogène et la plante doit se produire dans un environnement favorable pour permettre le développement d'une maladie. Les agents pathogènes ont besoin de conditions environnementales particulières pour leur développement (lumière, température, humidité...). Par exemple, certains champignons et bactéries nécessitent la présence d'une humidité relative élevée pour se développer. On peut notamment citer les oomycètes à l'origine de la maladie du mildiou (*Phytophthora sp.*) pour lesquels la présence d'un film d'eau (Corbaz 1990) est obligatoire pour leur développement.
- L'activité humaine semble également jouer un rôle prépondérant dans le développement de maladies. Dans l'optique d'une meilleure productivité, l'Homme a opté pour un système de production agricole intensif en privilégiant les systèmes monoculturaux au détriment de la

diversité génétique des espèces végétales (Roussel et al. 2004). Bien que les rendements aient fortement augmenté, l'homogénéisation des cultures favorise la propagation des maladies (Strange et Scott 2005). L'augmentation des échanges internationaux et les changements climatiques sont également des facteurs qui contribuent à l'émergence de maladies (Lefeuvre et al. 2010; Bebber, Ramotowski, et Gurr 2013).

Actuellement, au niveau mondial, 20 à 40% des pertes de récoltes sont occasionnées par des organismes phytopathogènes : bactéries, oomycètes, champignons, nématodes, virus (Savary et al. 2012, 2019). Toutefois, en tenant compte de la diversité microbienne de la phyllosphère (Lindow et Brandl 2003; Vorholt 2012) mais également des communautés de microorganismes abritées par la rhizosphère (Watt, Silk, et Passioura 2006; Mendes, Garbeva, et Raaijmakers 2013; Durán et al. 2018), une faible proportion d'organismes pathogènes parvient à envahir la plante hôte (Gomez-Gomez 2004b; Klarzynski et Fritig 2001). En effet, lorsque les conditions requises pour l'installation d'un pathogène sur une plante lui sont favorables, le pathogène doit être capable d'outrepasser différents systèmes de défense pour infecter la plante. Au cours de ces dernières années, des différences ont été mises en évidence concernant les stratégies de défense adoptées par les feuilles et par les racines. Toutefois, en comparaison avec les connaissances acquises sur les feuilles, les mécanismes de défense racinaires restent encore assez peu étudiés (Balmer et Mauch-Mani 2013; De Coninck et al. 2015). Le caractère moins accessible des racines par rapport aux feuilles *in vivo* en est la première explication. La seconde explication tient du fait que seulement 1% des microorganismes du sol sont cultivables et caractérisés *in vitro* (Singh et al., 2004).

Dans cette introduction, les mécanismes de défense foliaire puis racinaire seront traités dans des chapitres séparés.

Mécanismes de défense des plantes à l'échelle foliaire

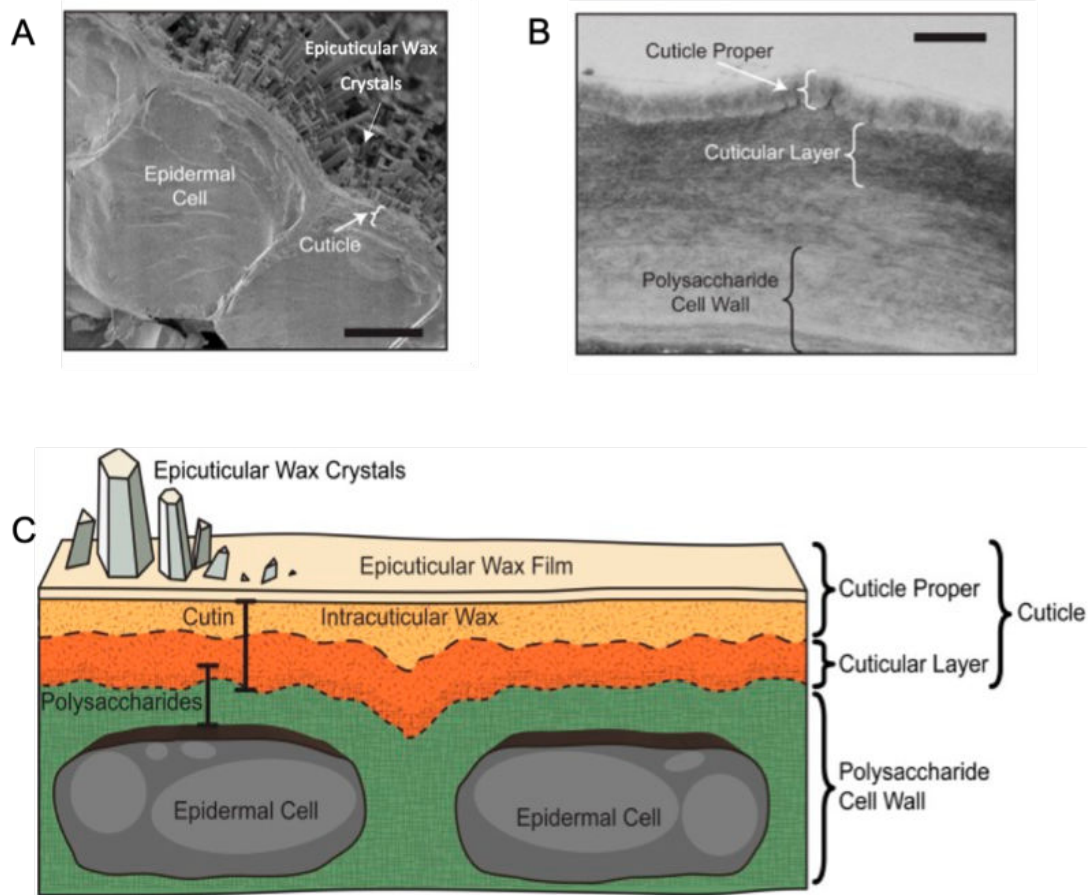


Figure 2 : Organisation structurale et biochimique de la cuticule.

(A) Photographie de la cuticule d'*Arabidopsis thaliana* prise au microscope électronique à balayage. Échelle = 5 μ m. (B) Photographie prise au microscope électrique à transmission de la cuticule d'*Arabidopsis thaliana*. Échelle = 500 nm. (C) Représentation schématique de la cuticule (Yeats et Rose 2013).

Deux systèmes de défense contre les organismes pathogènes existent chez la plante : le premier système de défense auquel sera confronté un agent pathogène est un système constitutif qui repose sur la présence naturelle, au sein de la plante, de barrières structurales et chimiques (Nobécourt 1946). Le second est un système de défense inductible basé sur l'activation de mécanismes de défense par la plante à la suite de la perception d'une attaque pathogène (Schwessinger et Zipfel 2008; Nicaise, Roux, et Zipfel 2009).

I. Un système de défense constitutif : les barrières naturelles

1. La cuticule : une barrière structurale et chimique complexe

Véritable interface entre les plantes et l'environnement puisque localisée à la surface des feuilles, la cuticule est la première barrière naturelle capable de bloquer ou de ralentir la progression d'un agent infectieux (Lecomte 2009). Recouverte d'un film de cire en surface (**figure 2A**), la cuticule, d'un point de vue microscopique, présente une couche externe et une sous-couche cuticulaire (**figure 2B**). La cuticule est composée de cutine (polyesters d'acides gras hydroxylés) enrobée dans une matrice de cires cuticulaires (composés lipidiques hydrofuges à longues chaînes carbonées) et de polysaccharides (Yeats et Rose 2013) (**figure 2C**). Plusieurs paramètres vont contribuer à l'efficacité défensive de cette barrière. La composition biochimique de cette barrière et plus particulièrement celle des cires est un facteur prépondérant pour la défense de la plante (Gauvrit 1996). La composition biochimique des cires est dépendante des espèces végétales (Jenks et Ashworth 1999). Les cires peuvent parfois contenir des groupements polaires qui apportent des fonctions intéressantes telles que des alcools, des acides, des aldéhydes ou des cétones (Jenks et Ashworth 1999). La présence de ces groupements impacte directement la virulence des organismes pathogènes fongiques (Wang, Chin, et Gianfagna 2000) et bactériens (Xiao et al. 2004). Par exemple, des composés phénoliques présents sur les cires du pommier peuvent inhiber la germination des conidies d'oïdium (Corbaz 1990). De manière inverse, d'autres composés, les aldéhydes en C₂₆ chez *Hordium vulgare* peuvent agir comme signal de reconnaissance chez l'organisme pathogène et favoriser le développement de structure infectieuse (appressorium) (Tsuba et al. 2002; Gniwotta 2005; Zabka et al. 2007) ainsi que la libération d'enzymes cutinolytiques (Wang et al. 2006). La quantité de cires produite est étroitement liée aux conditions environnementales de croissance de la plante (Jenks et Ashworth 1999) et module l'épaisseur de la cuticule. L'épaisseur de la cuticule et son caractère hydrophobe sont des caractéristiques physiques non négligeables dans la résistance à la pénétration du pathogène. Le caractère hydrophobe de la cuticule va influencer de manière négative l'adhésion de l'inoculum en réduisant la mouillabilité de surface (Müller et Riederer 2005).

2. Les trichomes au service de la défense des plantes.

Des excroissances épidermiques de formes diverses surplombent parfois la surface des organes aériens de certaines espèces végétales. Ces excroissances, appelées trichomes, jouent également un rôle constitutif dans la défense des plantes contre les agresseurs (Levin 1973). Elles sont classées en deux catégories : les trichomes glandulaires et les trichomes non glandulaires.

Les trichomes non glandulaires représentent une barrière physique pour les agresseurs des plantes. La densité et l'orientation de ces excroissances peuvent dissuader les insectes de s'y poser et rend l'accès à l'épiderme foliaire plus difficile pour les agents infectieux (Levin 1973).

Les trichomes glandulaires sont en plus une barrière chimique (Turner 2004) (**figure 3**).

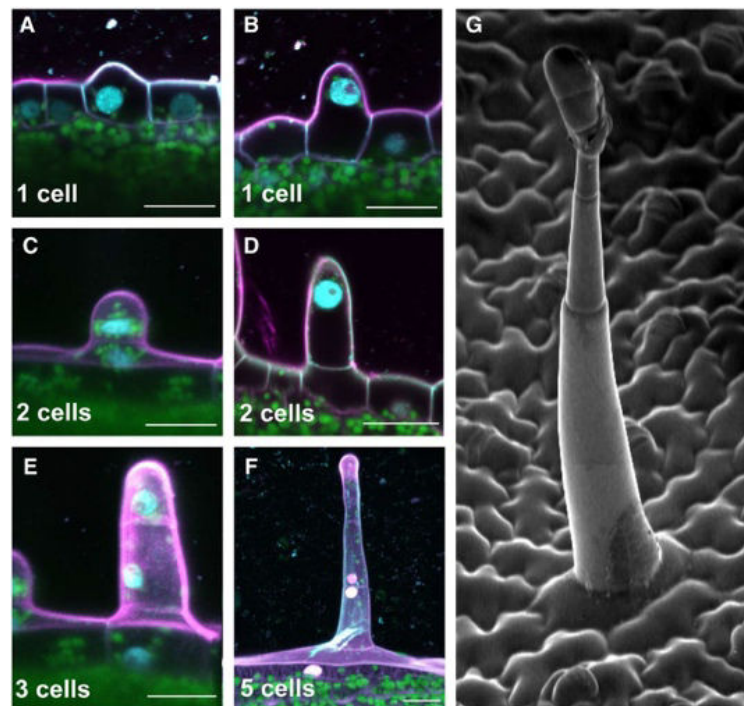


Figure 3 : Initiation et développement d'un trichome glandulaire chez *N. tabacum*.

Les photographies prises au microscope confocal montrent les premières étapes du développement d'un trichome glandulaire (A-F). Le nombre de cellules formant le trichome est indiqué pour chaque stade de développement. (A) Une cellule épidermique se différencie et forme une protubérance, (B) le noyau cellulaire migre vers l'extrémité de la protubérance et (C) la division cellulaire a lieu formant une structure composée de deux cellules (D). La cellule supérieure subit alors une division asymétrique, formant une grande cellule (qui formera la tige multicellulaire après plusieurs cycles de division cellulaire) et une petite cellule (qui donnera naissance à la tête glandulaire multicellulaire) (E-F). (G) Photographie prise au microscope électronique à balayage montrant l'architecture cellulaire typique d'un trichome glandulaire mature. Barres d'échelle = 20 μ m. Le magenta représente la paroi cellulaire colorée à l'iodure de propidium, le cyan représente les noyaux colorés par le 4',6-Diamidine-2'-phénylindole et le vert représente les chloroplastes par autofluorescence de la chlorophylle. (Huchelmann, Boutry, et Hachez 2017).

Les trichomes glandulaires sont très courants chez les dicotylédones et sécrètent une très grande diversité de métabolites secondaires : composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes (Wagner 1991). Ces métabolites peuvent avoir un effet gustatif et olfactif répulsifs, des propriétés antimicrobiennes. Ils peuvent aussi être toxiques ou paralysants pour les organismes pathogènes (Levin 1973; Wagner 1991). Ils peuvent être libérés dans l'atmosphère sous forme de composés organiques volatils (VOCs), sécrétés de manière constitutive à la surface des feuilles (Talley, Coley, et Kursar 2002) ; (Müller et Riederer 2005) ou libérés lors d'un choc mécanique (Levin 1973). De par leur position et leur production en métabolites secondaires, les trichomes font office d'une première ligne de défense à la surface des plantes.

Malgré la complexité des barrières physiques et chimiques que représentent les trichomes et la cuticule, certains organismes tels que les champignons peuvent synthétiser des enzymes capables de dégrader la cuticule. Ils sont alors confrontés à une seconde structure protectrice : la paroi végétale.

3. La paroi végétale : une structure complexe et dynamique

La paroi pecto-cellulosique est spécifique des cellules végétales. Cette paroi assure un rôle de soutien aux cellules lors de leur croissance (Cosgrove 2005) et elle constitue aussi une barrière mécanique impliquée dans la défense des plantes (Bacete et al. 2018; De Lorenzo, Ferrari, Giovannoni, et al. 2018). Chez les angiospermes eudicotylédones, la paroi primaire est de type I. Parmi les constituants majeurs de cette paroi, 90% des macromolécules sont des polysaccharides de type cellulose, hémicelluloses et pectines, le reste étant essentiellement des protéines et des composés phénoliques de type lignine (Dehors et al. 2019). Les polysaccharides forment une barrière rigide et difficilement attaquant. Leur dégradation requiert la présence d'enzymes spécialisées produites et sécrétées par les pathogènes (cellulases, hémicellulases, pectinases).

La cellulose, polysaccharide majoritaire des parois végétales (Cosgrove 2005), représente 15 à 30 % du poids sec de la paroi cellulaire primaire et 20 à 35 % des parois secondaires (Joseleau and Pérez 2016). Ce polysaccharide est constitué d'une longue chaîne linéaire de résidu $\beta(1,4)$ -D-glucose, qui dissociée forme des disaccharides de cellobiose (Joseleau and Pérez 2016). Dans la paroi, ce polysaccharide est retrouvé sous forme de micro-fibrilles paracrystallines qui sont elles-mêmes constituées de l'assemblage de 18 chaînes de cellulose (Vandavasi et al. 2016). Les micro-fibrilles sont synthétisées par un complexe enzymatique de 18 celluloses synthases de type A qui forment une rosette au niveau de la membrane plasmique (Kumar et

Turner 2015; Jarvis 2018). Les micro-fibrilles interagissent avec d'autres glycanes appelés hémicelluloses par le biais de liaisons hydrogène pour former le réseau cellulose-hémicellulose.

Les hémicelluloses se distinguent de la cellulose par leur squelette composé de résidus $\beta(1,4)$ -D-pyranose (glucose, xylose ou mannose) et de la présence de résidus branchés (fucose, galactose, arabinose, galactose) (Scheller et Ulvskov 2010). Différents types d'hémicelluloses peuvent être présents au sein des parois végétales (**figure 4A**). Chez les eudicotylédones, les xyloglucanes sont les hémicelluloses les plus abondantes (Cosgrove 2005). Les xyloglucanes sont constitués d'un squelette de $\beta(1,4)$ -D-xylose qui peut être substitué par des groupes de L-arabinose (Ara), d'acide glucuronique (GlcA) méthylé ou non. Le réseau formé par les connexions entre la cellulose et les hémicelluloses permet d'assurer la rigidité des tissus végétaux.

Au réseau pariétal, s'ajoutent les pectines, des polysaccharides très hydrophiles et riches en acide D-galacturonique (**figure 4B**) (Carpita, Ralph, et McCann 2015). Les pectines participent à l'organisation de la matrice végétale et jouent un rôle important dans la porosité de la paroi. Elles permettent également d'assurer la cohésion des cellules au sein de la lamelle moyenne. Les pectines sont les polysaccharides les plus complexes de la paroi végétale en raison d'une grande diversité structurale liée à leur composition en monosaccharides, leur degré d'estérification et la variabilité des liaisons covalentes qui peuvent se former. Elles sont principalement constituées d'homogalacturonanes (HG) et de rhamnogalacturonanes de type I (RG I) (Ridley, O'Neill, et Mohnen 2001). Les HG sont des chaînes d'homo-polymères d'acides $\alpha(1,4)$ -D-galacturonique (GalA), parfois méthyl-estérifiés, constitués d'environ 200 unités GalA (Carpita, Ralph, et McCann 2015). Lorsque deux chaînes d'HG sont constituées de résidus acide galacturonique non méthylés, celles-ci peuvent se lier entre elles, en présence de calcium, pour créer des structures dites en « boîte à œufs » (Peaucelle, Braybrook, et Höfte 2012). Il existe également deux types d'HG modifiés : le xylogalacturonane caractérisé par l'ajout de résidus xylose sur la chaîne GalA et le rhamnogalacturonane de type II (RG-II). Le RG-II est le polysaccharide le plus complexe d'un point de vue structural, puisqu'il est formé d'au moins une douzaine de monosaccharides différents et de plus d'une vingtaine de liaisons osidiques (Ridley *et al.*, 2001). Il comprend un squelette principal de résidus GalA qui peuvent porter quatre types de chaînes latérales complexes (Ridley, O'Neill, et Mohnen 2001) constituées de monosaccharides

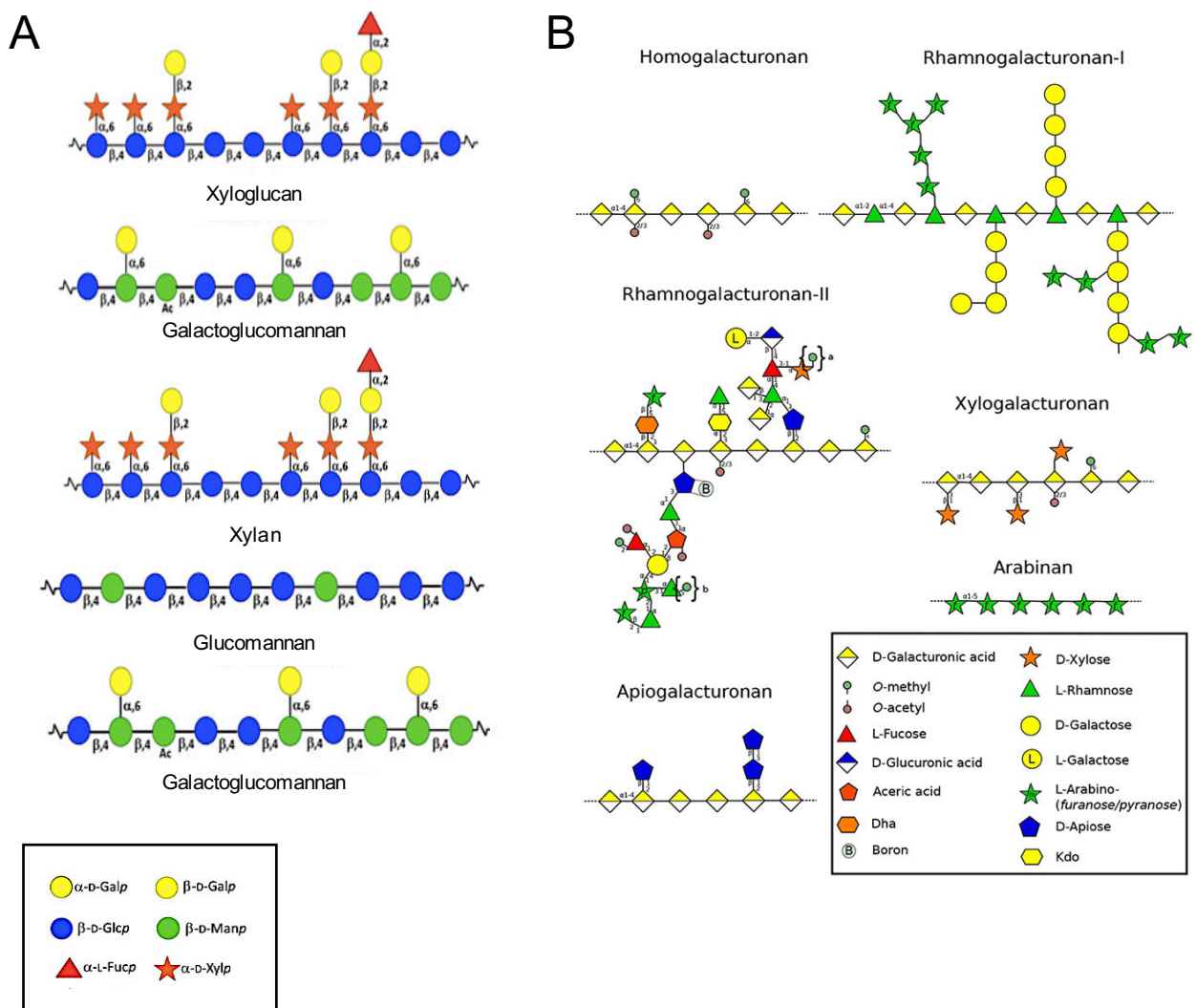


Figure 4 : Représentation des différents types d'hémicelluloses (A) et de pectines (B) présentes dans la paroi cellulaire des plantes terrestres selon la nomenclature des glycanes.

(A) Les hémicelluloses retrouvées dans la paroi primaire sont principalement les xyloglucannes, les xylannes et les galactoglucomannanes. Les hémicelluloses retrouvées dans la paroi secondaire sont les xylannes, les glucomannanes et les galactoglucomannanes (B) Les pectines sont constituées d'homogalacturonanes, de rhamnogalacturonanes de type I et des homogalacturonanes modifiés comprenant le rhamnogalacturonanes de type II et xylogalacturonanes (adapté de Joseleau et Pérez 2016 ; Dehors et al. 2019)

inhabituels, tels que le D-apiose (Api), le L-acerate (AceA), le 2-Ométhyl L-fucose, le 2-O-méthyl-D-xylose, le L-galactose, l'acide 2-keto-3-deoxy-D-lyxoheptulosarique (DHA) et le 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO) peuvent être présents (O'Neill et al. 2004; Dumont et al. 2016). L'ensemble de ces constituants forment un réseau résistant par le biais d'interactions covalentes et ioniques (Rashid 2016). La paroi cellulaire se compose également de protéines et de glycoprotéines qui se rajoutent aux polysaccharides (Vorwerk, Somerville, et Somerville 2004).

Les protéines structurales sont catégorisées en trois classes selon leur composition en acides aminés : les protéines riches en proline (PRPs), les protéines riches en glycine (GRPs) et les glycoprotéines riches en hydroxy-proline (HRGPs) telles que les extensines, les arabinogalactanes protéines (AGPs) et les lectines (Deepak et al. 2010; Showalter et Basu 2016). Les extensines jouent un rôle dans la défense contre les pathogènes en limitant leur pénétration par modification de l'organisation structurale et par renforcement de la paroi (Castilleux et al. 2018). Les AGP peuvent également favoriser l'adhésion des microorganismes bénéfiques (Vicré et al. 2005; Xie et al. 2012a) ou interagir avec le cycle infectieux d'oomycètes tels que *Aphanomyces euteiches* (Cannesan et al. 2012).

Trichomes, cuticule et paroi confèrent à la plante une résistance générale qualifiée de passive qui s'avère être efficace contre une grande majorité de pathogènes. Toutefois, certains agents pathogènes parviennent à outrepasser ces barrières naturelles, celles-ci n'étant pas complètement imperméables. Des organismes tels que les bactéries profitent notamment d'ouvertures naturelles (stomates, hydathodes, trichomes) (Gudesblat, Torres, et Vojnov 2009; Cerutti et al. 2017) (**figure 5**) et temporaires (blessures) pour pénétrer et proliférer dans l'apoplasme. Les bactéries peuvent également être transmises ou véhiculées par l'intermédiaire de vecteurs tels que les nématodes ou les insectes qui vont les injecter dans la plante grâce à des stylets perforateurs lorsqu'ils se nourriront de la sève (Hopkins 1989; Almeida et Purcell 2003). Les champignons peuvent aussi entrer dans l'organisme hôte au travers des cellules épidermiques ou par le biais de structures d'ancrage appelées appressoriums. L'appressorium exerce une pression mécanique sur l'organe ciblé et une grande diversité d'enzymes hydrolytiques peuvent être synthétisées (Esquerré-Tugayé, Boudart, et Dumas 2000). Ces enzymes, impliquées dans la dégradation des polymères pariétaux : cutinase, polygalacturonases, cellulases, xylanases, protéases favorisent la dégradation de la paroi (**figure 6**). De cette manière, le champignon va pouvoir forcer les barrières naturelles de la plante et puiser directement dans les cellules végétales, les réserves nutritives nécessaires à sa croissance (Jones et Dangl 2006 ; Catanzariti, Dodds, et Ellis 2007).

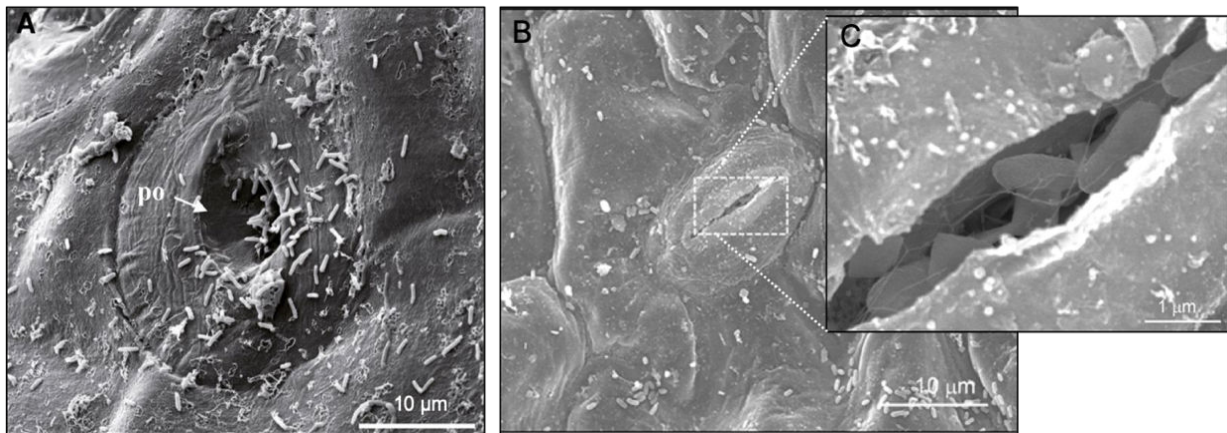


Figure 5 : Photographies prises au microscope électronique à balayage d'un hydathode (A) et d'un stomate foliaire (B-C) infectés par des cellules bactériennes.

(A) Après 3 jours d'infection, on observe un grand nombre de bactéries à l'intérieur du pore de l'hydathode (po) et sur la couche épidermique de la feuille de chou-fleur. (B) Après 6 heures d'infection, la bactérie *Shiga-toxigenic Escherichia coli* pénètre dans les feuilles d'épinards. Adapté de (Saldaña et al. 2011; Cerutti et al. 2017)

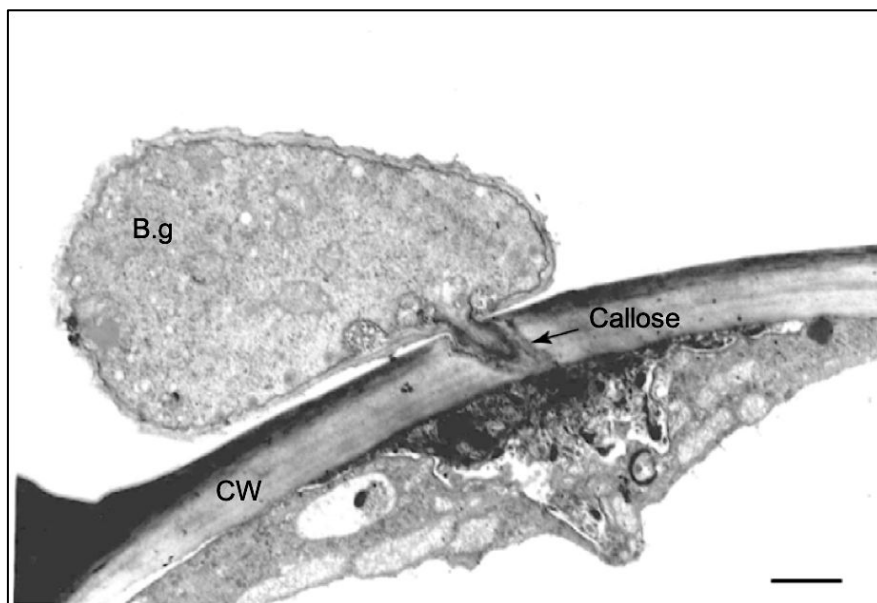


Figure 6 : Photographie prise au microscope électronique d'un champignon *Blumeria graminis* (B.g) pénétrant une cellule d'orge.

Sous l'action des enzymes hydrolytiques sécrétées par le champignon pathogène, la paroi (cw) est perforée. La plante synthétise alors un polymère de β (1-3)-glucane, appelé callose, au niveau des sites d'infections afin de colmater les orifices et renforcer la barrière pariétale (Vorwerk, Somerville, et Somerville 2004).

Lorsque les barrières constitutives se révèlent être inefficaces face aux pathogènes, les végétaux peuvent activer un système de défense induit. Pour cela, les plantes disposent d'un système immunitaire élaboré dans lequel la reconnaissance soit de molécules endogènes à la plante (Klarzynski et Fritig 2001; Boller et Felix 2009), soit de molécules constitutives d'agents non pathogènes (Henry, Thonart, et Ongena 2012) ou bien pathogènes (Chinchilla 2006; Gust et al. 2007; Nicaise, Roux, et Zipfel 2009), permettent l'activation de mécanismes de défense. Ces molécules, aussi appelées éliciteurs (Henry, Thonart, et Ongena 2012), vont être reconnues par des récepteurs membranaires. Ce système de surveillance permet alors à la plante d'induire des défenses spécifiques qui mettent en jeu des événements cellulaires complexes empêchant ainsi le développement du pathogène (réaction incompatible). En revanche, si les mécanismes de défense ne sont pas suffisants pour lutter contre l'agent pathogène, la plante est dite sensible : la maladie s'installe (réaction compatible).

II. Les systèmes de défense induits par la plante

1. La reconnaissance de l'agent pathogène *via* les éliciteurs M/P/DAMPs

La reconnaissance par la cellule hôte d'un éliciteur est une étape indispensable pour l'activation de mécanismes de défense (**figure 7**).

Il existe plusieurs types d'éliciteurs exogènes ou endogènes à la plante. Les éliciteurs exogènes issus d'organismes pathogènes sont référencés comme étant des Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) (Chinchilla 2006; Gust et al. 2007; Nicaise, Roux, et Zipfel 2009). Les PAMPs sont des composés structuraux très conservés (Jones et Dangl 2006) d'une espèce pathogène à l'autre puisqu'ils proviennent de constituants indispensables à leur survie (polysaccharides, protéines, lipides) (Postel et Kemmerling 2009). Ils sont aussi spécifiques d'une classe d'agent pathogène (bactéries, champignons) ce qui permet d'induire une discrimination de l'agent pathogène par la plante. Par exemple chez les champignons, des molécules issues de leurs parois, telles que la chitine, jouent le rôle d'éliciteurs (Zipfel et Felix 2005; Bittel et Robatzek 2007). Chez les bactéries, les PAMPs communément perçus par les plantes sont des molécules telles que la flagelline (flg22), le peptidoglycane (PGN), des protéines comme le facteur d'élongation EF-TU ou des lipopolysaccharides (LPS) (Millet et al. 2010; Mishra, Sharma, et Misra 2012).

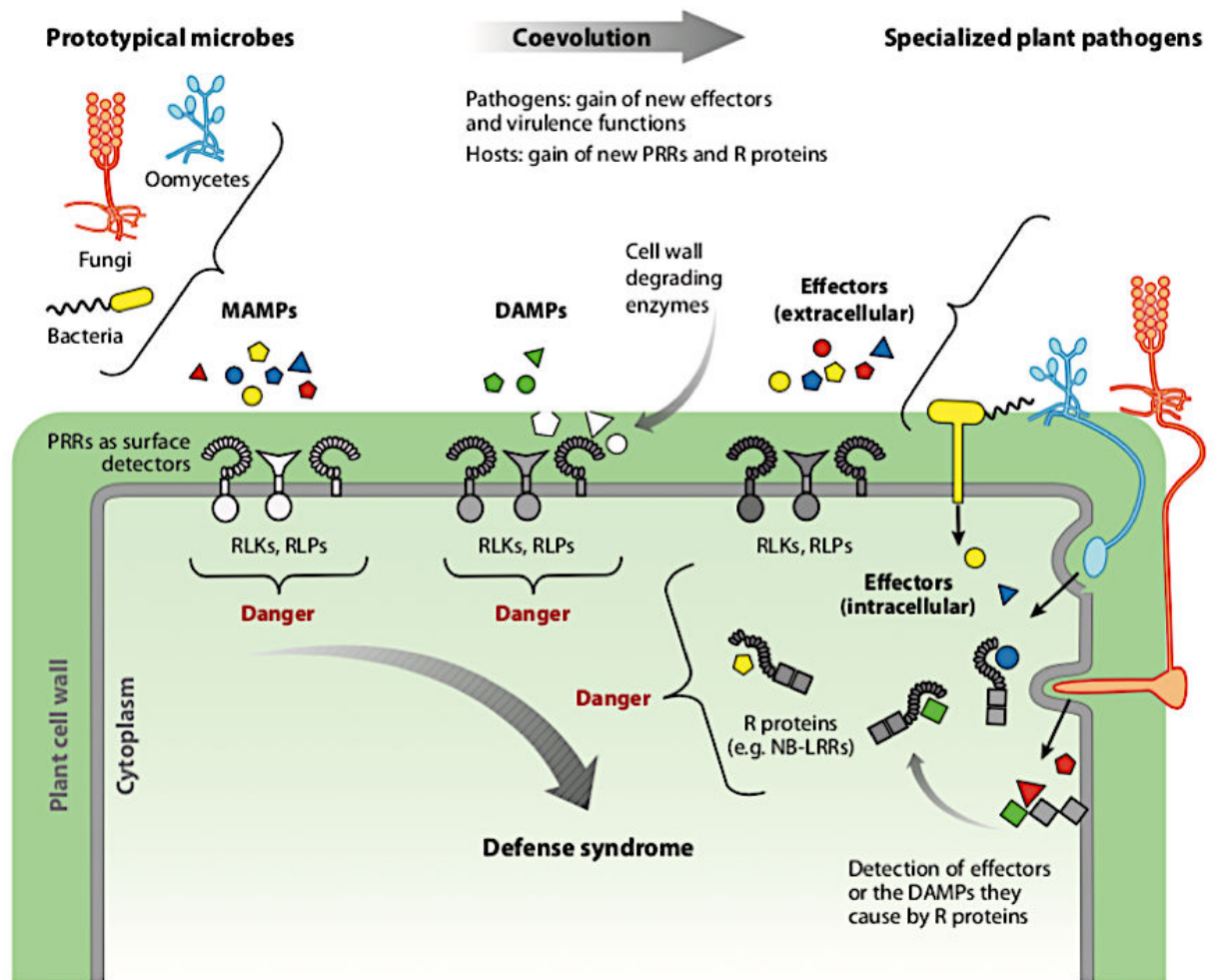


Figure 7 : Mécanismes de reconnaissance d'une attaque par un pathogène chez la plante.

Les éliciteurs exogènes ou endogènes à la plante sont perçus comme signal de danger par la plante et induisent des réactions de défense. Les éliciteurs exogènes MAMPs (pour Microbe-Associated Molecular Patterns) proviennent de microorganismes tels que des champignons, des oomycètes ou des bactéries. Les éliciteurs endogènes DAMPs (pour Damage-Associated Molecular Patterns) sont des molécules constitutives de la plante elle-même libérées à la suite d'action d'enzymes dégradantes provenant de l'organisme pathogène. Ces éliciteurs seront reconnus par des récepteurs protéiques de la plante PRRs (pour Pattern Recognizing Receptors) kinase de type RLK (pour Receptor-Like Kinase), de type RLP (pour Receptor-Like Protein) afin d'activer des mécanismes de défense. Au cours de l'évolution, les organismes pathogènes ont acquis de nouveaux facteurs de virulence (effecteurs) afin d'inactiver les mécanismes de reconnaissance des plantes. Toutefois, celles-ci ont acquis de nouveaux récepteurs ayant la capacité de se lier aux nucléotides : NB-LRR (Nucleotide Binding-site-Leucine-Rich Repeat) et sont capables de reconnaître ces effecteurs (Boller et Felix 2009).

Toutefois, l'ensemble de ces molécules constitutives peut également être retrouvé chez certains organismes bénéfiques telles que les bactéries favorisant la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) ou les champignons mycorhiziens (Song et al. 2010; Mauch-Mani et al. 2017; Stringlis et al. 2018). Le terme plus général MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) peut alors être employé pour désigner l'ensemble de ces molécules puisque MAMPs réfère à des molécules issues soit de microorganismes pathogènes ou bien de microorganismes bénéfiques (Postel et Kemmerling 2009). D'autres molécules, cette-fois-ci endogène à la plante peuvent aussi jouer le rôle d'éliciteur. Ces molécules libérées par la plante, lors de lésions tissulaires engendrées par une attaque pathogène (Klarzynski et Fritig 2001) mais aussi en réponse à un stress abiotique (Choi et Klessig 2016), sont nommées Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). La paroi végétale constitue une barrière physique à la pénétration des pathogènes mais elle assure aussi un rôle signalétique. Lorsque le pathogène commence à dégrader les polymères constituant la paroi de la plante *via* l'action des enzymes hydrolytiques, des fragments de polysaccharides (cellodextrines) ou des oligogalacturonides issus de pectine (Ferrari 2013; Benedetti et al. 2015) sont libérés et reconnus par des récepteurs spécifiques.

La détection des éliciteurs s'effectuent par des récepteurs protéiques majoritairement membranaires que l'on appelle les Pattern Recognizing Receptors (PRRs) (Gomez-Gomez 2004; Monaghan et Zipfel 2012; Newman et al. 2013; De Lorenzo, Ferrari, Cervone, et al. 2018). Chez les plantes, les PRRs reconnaissant les éliciteurs sont classés selon leur domaine ligand, leur localisation cellulaire et leur fonction. Il existe plusieurs familles de récepteurs : les récepteurs kinases (RLKs), les récepteurs protéiques extracellulaires (RLPs) et les récepteurs protéiques intracellulaires (NB-LRR) (Claverie et al. 2016; Saijo, Loo, et Yasuda 2018). Les récepteurs RLKs possèdent un domaine extracellulaire *N*-terminal dont le rôle est de détecter et d'interagir avec l'éliciteur et d'un domaine transmembranaire couplé à un domaine kinase cytoplasmique qui assurent la transduction du signal à l'intérieur de la cellule (Macho et Zipfel 2014). Les domaines extracellulaires des RLKs sont divers : ils peuvent être constitués d'un domaine lectine qui se lie à certains carbohydrates, d'une répétition de motifs leucine (LRRs) ou de motifs lysine (LysM) ou de domaine kinases associés à la paroi (Tor, Lotze, et Holton 2009). Les récepteurs RLPs sont caractérisés par un domaine extracellulaire LRR et d'une ancre membranaire *C*-terminale (Tor, Lotze, et Holton 2009) sans domaine kinase intracellulaire. Étant donné que les RLPs ne possèdent pas de domaine intracellulaire, ils fonctionnent en association avec un ou plusieurs RLKs afin de permettre la transduction du signal (Zipfel 2014). Pour être reconnu, les ligands doivent interagir avec leur récepteur par le biais d'interaction non covalente *via* des ponts

hydrogène ou des interactions hydrophobes (Hohmann, Lau, et Hothorn 2017). L'interaction entre un ligand et son récepteur peut aboutir à l'activation du récepteur par phosphorylation du domaine kinase ou à la formation d'un complexe avec un co-récepteur (Couto et Zipfel 2016).

L'un des éliciteurs les plus couramment utilisés pour étudier les mécanismes de défense puisque reconnu par une majorité de plantes, est la Flagelline 22 (flg22). La flg22 est un peptide de 22 acides aminés localisé au niveau de la région *N*-terminale du flagelle (Felix et al. 1999; Felix et Boller 2003). Cette région, très conservée au sein des espèces, est utilisée par les récepteurs des plantes comme site de reconnaissance (Gomez-Gomez 2004a; Felix et al. 1999). Chez *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* et chez *Solanum lycopersicum*, ce motif active les voies de défense *via* le RLK FLS2 (Flagellin sensitive 2) (Asai et al. 2002; Chinchilla 2006; Schwessinger et Zipfel 2008). Le récepteur RLK-FLS2 comprend un domaine extracellulaire constitué d'un peptide signal *N*-terminal de 28 LRR qui interagit avec la flg22 et d'un domaine intracellulaire de type kinase (Postel et Kemmerling 2009). Toutefois, il a été démontré que la reconnaissance de la flg22 est assurée par l'interaction du complexe des deux récepteurs FLS2 et BAK1 avec des protéines G (AtRGS1) (Schulze et al. 2010; Sun et al. 2013; Tunc-Ozdemir et al. 2016). Dans les secondes qui suivent l'interaction de la flg22 avec le domaine LRR de FLS2, une dimérisation du récepteur FLS2 avec son co-récepteur BAK1 est effectuée. Les domaines intracellulaires de type kinase du complexe FLS2/BAK1 se phosphorylent. Le récepteur BAK1 phosphorylé interagit ensuite avec un régulateur du complexe protéique G (AtRGS1) par le biais d'une interaction avec le récepteur RLK BIR1 qui va permettre la dissociation du complexe BIR1/AtRGS1 (Gao et al. 2009). La protéine AtRGS1 se phosphoryle et est endocytée ce qui permet l'activation du complexe protéique G par le biais d'échange de GDP en GTP (Urano et al. 2012). Le complexe protéique G activé se dissocie ce qui permet la production de ROS et de calcium (Ca^{2+}) (**figure 8**) (Tunc-Ozdemir et Jones 2017). Parallèlement, il existe des constituants qui sont reconnus de manière plus spécifique par des familles végétales (Felix et al. 1999) : le facteur d'élongation EF-TU et un dérivé de Flagelline (FlgII-28) en sont des exemples. EF-TU est l'une des protéines bactériennes les plus abondantes, elle est conservée avec plus de 90% de similarités de séquence entre différentes bactéries (Kunze 2004; Nicaise, Roux, et Zipfel 2009). Cette protéine est reconnue par les espèces de la famille des Brassicaceae telle que *Arabidopsis thaliana* (Jones et Dangl 2006; Kunze 2004; Zipfel et al. 2006) *via* le récepteur LRR-RLK EFR (Zipfel et al. 2006).

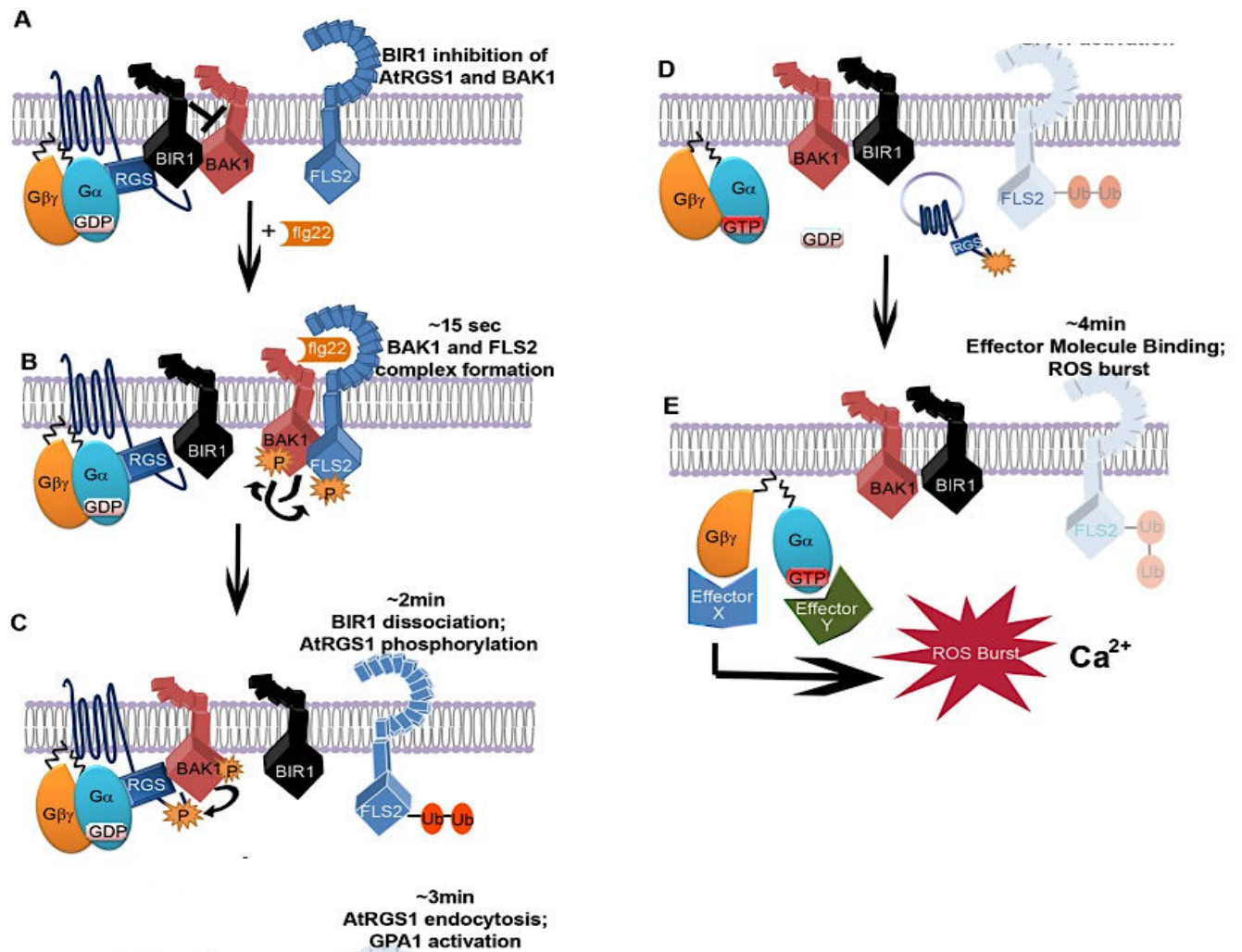


Figure 8 : Mécanismes de reconnaissance de la Flagelline 22 impliquant les récepteurs RLK FLS2/BAK1/BIR1 et le complexe protéique G.

(A) En l'absence de flg22, BAK1, BIR1, RSG1 sont associés avec le complexe de protéine G (G α G $\beta\gamma$). (B) Lorsque la flg22 est reconnue par FLS2, celui-ci forme un complexe avec BAK1 par le biais d'évènement de phosphorylation. (C) BIR1 se dissocie du complexe RSG1/G α G $\beta\gamma$ et BAK1 interagit avec RSG1 par phosphorylation. FLS2 est ubiquitinilé pour être dégradé. (D) RSG1 est endocytée ce qui permet l'activation du complexe protéique G. (E) Le complexe G se dissocie induisant la production de ROS et de calcium (Ca²⁺) (Tunc-Ozdemir et Jones 2017).

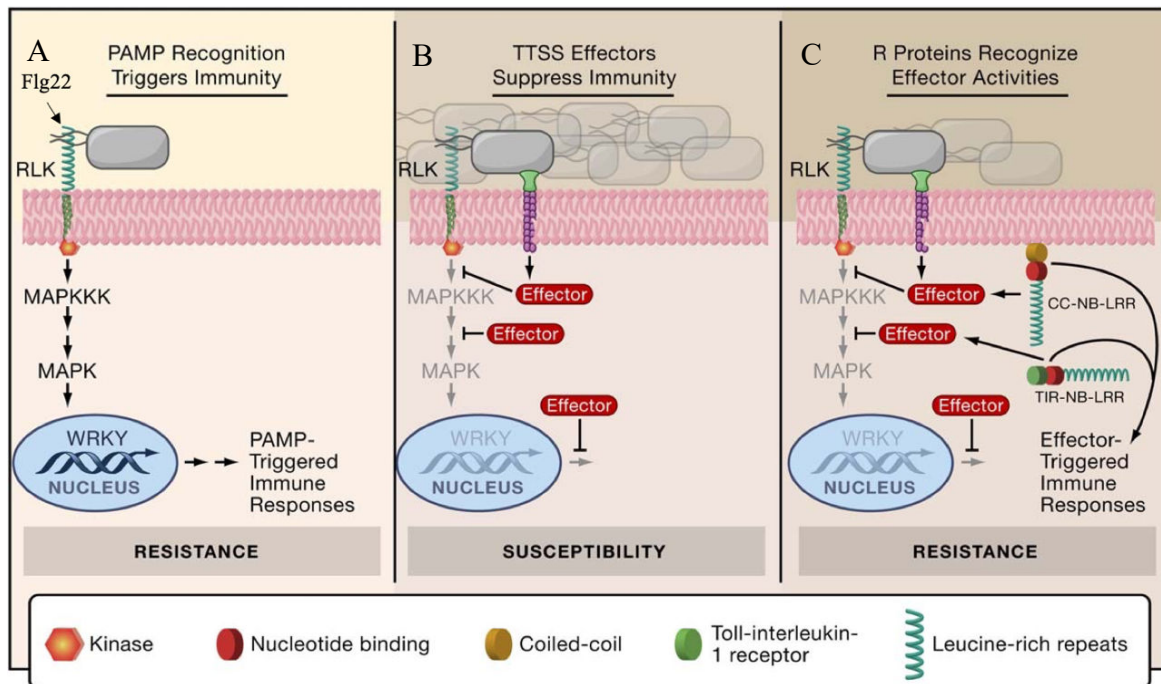


Figure 9 : Implication des différents récepteurs protéiques dans les mécanismes de résistance chez les végétaux.

(A) La reconnaissance d'éliciteurs issus d'organismes pathogènes (PAMPs) tel que la Flagelline22 (flg22) est assurée par des récepteurs membranaires (RLK). Cette reconnaissance engendre la transduction d'un signal vers le milieu intracellulaire par des étapes de phosphorylation protéique (MAPKKK, MAPK) et des modifications transcriptionnelles régies par les facteurs de transcription WRKY. L'ensemble de ces événements déclenche l'activation de la résistance innée ou PAMP-Triggered Immunity (PTI).

(B) Pour contourner cette résistance, les bactéries sécrètent dans le milieu intracellulaire des molécules appelées effecteurs capables d'inhiber la cascade signalétique à l'origine du déclenchement des mécanismes de défense. La plante devient susceptible à l'infection et les bactéries prolifèrent dans l'apoplaste.

(C) Des récepteurs protéiques intracellulaires (NB-LRR) reconnaissent les effecteurs ce qui permet de restaurer la résistance chez la plante (Effector-Triggered Immune responses) (Chisholm et al. 2006).

La reconnaissance est basée sur les 18 premiers acides aminés du coté *N*-terminal de la séquence protéique (Kunze 2004). FlgII-28 est une autre séquence protéique issue du flagelle bactérien qui semble reconnue de manière spécifique par le récepteur FLS3 (Hind et al. 2016) chez des espèces de l'ordre des Solanaceae telle que la tomate et la pomme de terre (Clarke et al. 2013; Veluchamy et al. 2014).

La perception d'éliciteurs de type M/P/DAMPs par les récepteurs PRRs induit une cascade signalétique à l'origine de l'activation d'une résistance basale appelée Pathogen/Pattern/PAMP-Triggered Immunity (PTI) ou immunité innée (Jones et Dangl 2006; Bigeard, Colcombet, et Hirt 2015) (**figure 9A**).

L'immunité innée est aussi définie comme résistance non-hôte puisque c'est un système de résistance non spécifique d'un agresseur donné. Toutefois au cours de l'évolution, certains agents pathogènes ont acquis de nouveaux facteurs de virulence leur permettant d'infecter les plantes en sécrétant une multitude de protéines capables d'inhiber la PTI (**figure 9B**). Ces protéines à l'origine de la virulence de l'agent pathogène sont appelées effecteurs et sont libérées directement à l'intérieur de la cellule. Les effecteurs alors présents dans le cytoplasme sont reconnus par une 3^{ème} catégorie de récepteurs : les récepteurs intracellulaires NB-LRR (nucleotide binding site–leucine-rich repeats) menant à l'activation d'une résistance plus spécifique appelée Effector-triggered immunity (ETI) ou immunité déclenchée (**figure 9C**).

2. La résistance non hôte : PAMP-triggered Immunity (PTI)

a) Signalisation par les complexes de signalisation

L'activation de la résistance basale (PTI) nécessite que des signaux soient générés, transportés et traduits afin d'activer les mécanismes de défense. Dès les premières heures de l'infection, l'interaction éliciteur/PRRs déclenche l'activation de voies signalétiques qui converge vers l'induction de gènes de défense au travers de l'émission d'un signal. La transmission de ce signal, générée en amont par les PRRs, implique plusieurs acteurs cellulaires dont le rôle est d'amplifier cette signalisation. Les événements biochimiques observés dans les premières minutes de l'interaction PRRs/éliciteurs incluent différents acteurs cellulaires qui seront développés ci-après.

▪ **Modification des flux ioniques et activation des MAP-Kinases**

La modification des flux ioniques est l'une des premières modifications intracellulaires mise en place par la plante en réponse à une attaque pathogène. La régulation de ces flux est contrôlée par des enzymes membranaires de type Ca^{2+} ATPase, H^+ ATPase et des canaux ioniques (Blumwald, Aharon, et Lam 1998) qui assurent le maintien du gradient électrochimique cellulaire nécessaire au transport transmembranaire des solutés. Les principales fluctuations observées en réponse à un éliciteur sont un influx d'ions calcium (Ca^{2+}) engendré par l'activation des canaux calciques, un influx de protons hydrogène (H^+) et un efflux d'ions potassium (K^+), chlorure (Cl^-) et sodium (Na^+) (Laberche 2010; Mishra, Sharma, et Misra 2012). La perturbation de ces flux ioniques engendre des phénomènes biophysiques (hyperpolarisation/dépolarisation de la membrane plasmique) (Blumwald, Aharon, et Lam 1998), changement de pH intra/extracellulaire) dont l'amplitude et la durée varient en fonction de l'éliciteur. Les ions Ca^{2+} jouent un rôle prépondérant de messenger secondaire pénétrant dans les compartiments cellulaires voisins (Mishra, Sharma, et Misra 2012; Toyota et al. 2018) et en activant un réseau protéique formé d'un ensemble de protéines kinases appelées Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) (He, Shan, et Sheen 2007). Les MAPKs forment un ensemble de 3 kinases constitué d'une MAPKK kinase (MAPKKK), d'une MAPK kinase (MAPKK) et d'une MAPK qui agissent en cascade par phosphorylations/déphosphorylations. Les MAPKKKs sont activées par phosphorylation des motifs sérine/thréonine en réponse à un stimulus extracellulaire. Leur activation engendre la phosphorylation des MAPKKs qui seront à leur tour activées et stimuleront l'activation des MAPKs selon le même processus de phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine (Cargnello et Roux 2011). Une fois activées, les MAPKs phosphorylées, vont-elles mêmes activer des facteurs de transcription de type WRKY et la phosphorylation de nombreuses protéines (Garcia-Brugger et al. 2006).

Parallèlement à ces événements précoces, l'interaction PRRs/éliciteurs induit également la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

▪ **Production d'espèces réactives de l'oxygène**

La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) constitue une réponse immédiate et générale à différents types de stress. Les ROS sont des sous-produits du métabolisme synthétisés dans plusieurs compartiments cellulaires (chloroplastes, mitochondries, peroxysomes, apoplaste) et dont les formes majoritaires sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$), les anions hydroxyles (HO^{\cdot}) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Leur

synthèse est induite lors d'interactions plante-pathogène mais également lors d'interactions avec des agents symbiotiques (Nanda et al. 2010) et en réponse à des stress abiotiques (Camejo, Guzmán-Cedeño, et Moreno 2016). Dans les minutes qui suivent la reconnaissance d'un éliciteur par les PRRs, les ROS sont produits par des NADPH oxydases membranaires (RBOHD) qui peuvent être activées par les complexes intracellulaires kinases des PRRs tels que BIK1 *via* phosphorylation (Lin et al. 2014; L. Li et al. 2014) ou par des protéines kinases dépendantes du calcium (CPKs) ou par les ions Ca^{2+} qui viennent interagir avec les motifs EF localisés au niveau de la région *N*-terminale des RBOHD (**figure 10**) (Kadota, Shirasu, et Zipfel 2015). En plus des RBOHD, d'autres protéines apoplastiques telles les peroxydases participent plus tardivement à la synthèse de ROS tels que H_2O_2 . Les ROS sont impliqués dans divers mécanismes de défense tels que la synthèse de composés antimicrobiens (Stulemeijer et Joosten 2008; Mishra, Sharma, et Misra 2012), le remodelage pariétal en oxydant et en précipitant les extensines (Rashid 2016; Castilleux et al. 2018) dans le but de bloquer l'entrée d'organismes pathogènes. Ils assurent également un rôle signalétique nécessaire à l'expression de certains gènes de défense et à l'ouverture/fermeture des stomates (Sharma et al. 2012; Kadota, Shirasu, et Zipfel 2015). Outre leur implication lors de la PTI, les ROS sont également impliqués dans des mécanismes de défense plus intenses mis en place par la plante lors de la résistance déclenchée (ETI). Parmi ces mécanismes, on peut citer la réponse hypersensible (HR) qui est l'un des mécanismes les plus visibles et les plus efficaces contre une infection pathogène de type biotrophe (Clos 2012) en permettant l'isolement spatial du pathogène. Cet isolement est rendu possible par le biais d'une importante production de ROS qui induit la mort programmée des cellules jouxtant le site d'infection empêchant ainsi la propagation de l'organisme biotrophe.

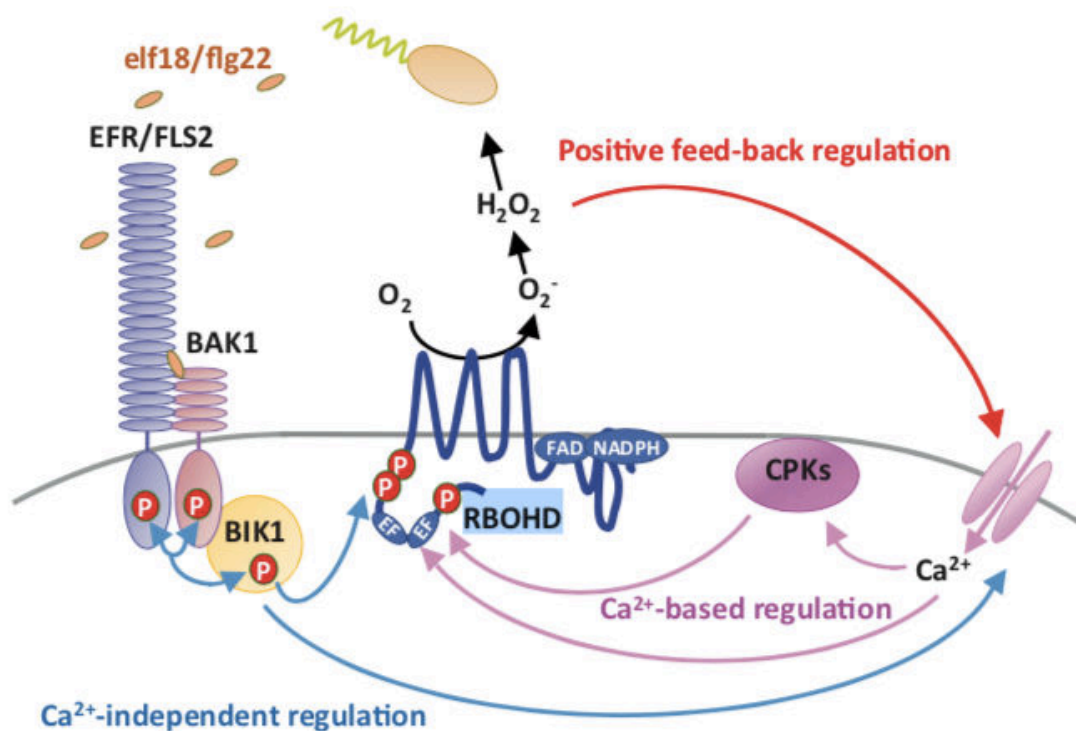


Figure 10 : Mécanisme de production d'espèces réactives de l'oxygène.

Lors de la perception d'un éliciteur tel que Elf18 ou flg22, les PRRs associés (EFR et FLS2 respectivement), forment un complexe avec le co-récepteur BAK1. L'activation du complexe (FLS2/BAK1 ou EFR/BAK1) par phosphorylation engendre la phosphorylation d'un autre complexe intracellulaire nommé BIK1 (Greeff et al. 2012). BIK1, une fois phosphorylé, possède une affinité de liaison avec les protéines kinases membranaires RBOHD et les phosphoryle. L'activation de RBOHD par phosphorylation engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). BIK1 active également les canaux calciques (Ca²⁺) ce qui provoque un influx de Ca²⁺ qui de manière directe ou indirecte (activation protéines kinases dépendantes du calcium CPK) va agir sur RBOHD via liaison de Ca²⁺ à un motif EF ou phosphorylation. En même temps, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit lui-même par RBOHD peut également déclencher une activation supplémentaire des canaux calciques (Ca²⁺) participant à la régulation de RBOHD et à la production de ROS (Kadota, Shirasu, et Zipfel 2015).

▪ **Le monoxyde d'azote**

Chez les plantes, les cellules végétales produisent du monoxyde d'azote (NO) lorsqu'elles sont confrontées à une attaque potentiellement pathogène (Romero-Puertas et al. 2004). Le NO est produit de manière simultanée aux ROS par une NAD(P)H nitrate réductase (NR) cytosolique dont la fonction primaire consiste en la réduction du nitrate en NO (Koen et al. 2013). Cette production a été observée en réponse à différents éliciteurs dans les tissus vasculaires de *Medicago trunculata* (Leitner et al. 2008). Bien que les mécanismes d'actions du NO reste encore à éclaircir, il a été démontré que le NO est un acteur essentiel dans la résistance aux stress biotiques. Des connexions entre les voies de signalisation impliquant des MAPKs, Ca^{2+} et les ROS ont pu être mises en avant (Romero-Puertas et al. 2004). En effet, il a été démontré que NO était capable d'activer des canaux calciques intracellulaires dont le fonctionnement contribue à une augmentation de Ca^{2+} (Lamotte 2004) et qu'il pouvait stimuler la production de ROS. NO est une molécule majeure dans la résistance contre les organismes pathogènes tel que *Pseudomonas syringae* DC3000 ou *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseoliocola* (Zeidler et al. 2004; Mur et al. 2019). Cette augmentation de résistance peut être expliquée par le fait que NO soit impliqué dans l'expression de gènes de défense, participe aux voies de biosynthèse d'hormones ainsi qu'à production de phytoalexines (**figure 11**) (Romero-Puertas et al. 2004; Koen et al. 2013; Wendehenne, Durner, et Klessig 2004).

b) **La transmission du signal : implication des phytohormones**

Le signal généré par les événements précoces, précédemment décrits, est ensuite relayé par la synthèse d'hormone(s) de défense. Une infection pathogène chez les plantes se traduit par une modification des balances hormonales cellulaires. La plante synthétise plusieurs phytohormones parmi lesquelles l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET), sont connues pour être impliquées dans la défense contre différents pathogènes. Ces molécules capables de diffuser de cellule en cellule permettent d'induire l'expression de gènes associés à la résistance aux bactéries pathogènes (Oliver et Ipcho 2004). Les plantes peuvent activer des voies de défenses distinctes en modulant leurs balances hormonales selon le mode trophique de l'organisme pathogène. Typiquement SA semble impliqué dans la résistance contre les pathogènes biotrophes qui tirent leur énergie des tissus végétaux vivants dont ils dépendent pour leur nutrition et leur propagation (Schulze-Lefert et Panstruga 2003). En revanche, les mécanismes activés par SA sont inefficaces contre les agents pathogènes nécrotrophes qui tirent leur énergie de cellules végétales mortes (van Kan 2006).

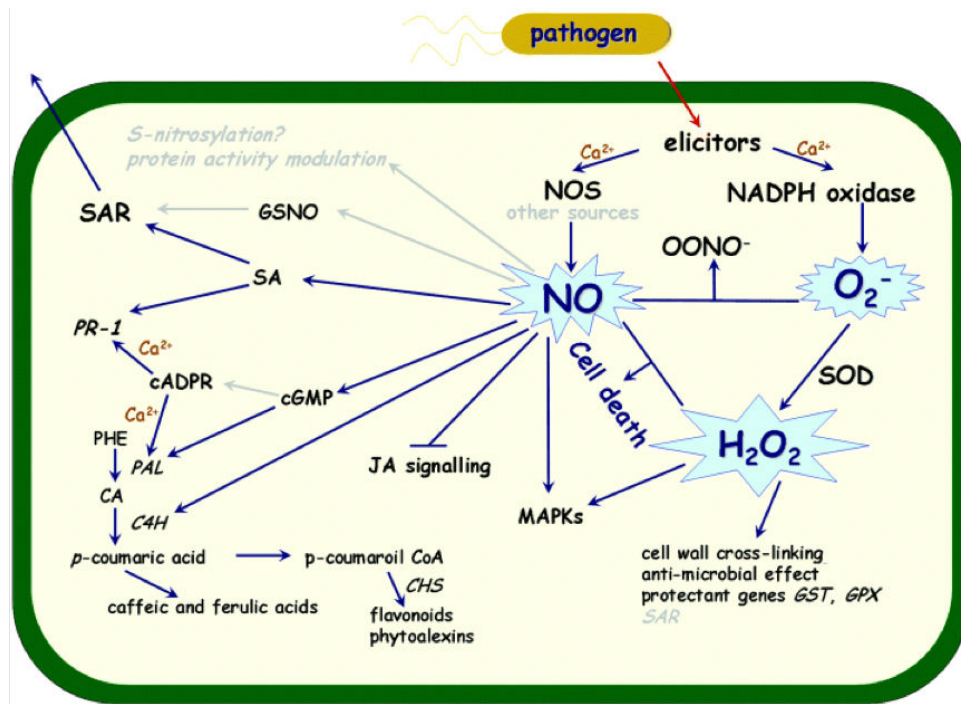


Figure 11 : Implication du monoxyde d'azote dans les mécanismes de défense à la suite d'une attaque par un agent pathogène.

Les flèches bleues indiquent les voies dans lesquelles est impliqué le NO. CHS, Chalcone synthase; C4H, acide cinnamique 4 hydroxylase; CA, acide cinnamique; Ca^{2+} , apport de calcium; cADPR, ribose cyclique ADP; cGMP cyclique; GPX, glutathion peroxydase; GSNO, S nitroso L glutathion; TPS, glutathion S transferase; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; HR, réponse hypersensible; JA, acide jasmonique; MAPK, protéine cinétique activée par les mitogènes; NO, oxyde nitrique; NOS, oxyde nitrique synthase; $ONOO^-$, peroxyde nitrique; PAL, phénylalanine ammoniac lyase; PHE, phénylalanine, protéines liées à la pathogénèse; SA, acide salicylique; SAR, résistance systémique acquise; SOD, superoxyde dismutase. Les flèches grises représentent les voies de fonctions et de synthèses potentielles du monoxyde d'azote (NO) et (Romero-Puertas et al. 2004)

JA semble alors privilégié dans la résistance contre les pathogènes nécrotrophes (Robert-Seilaniantz, Grant, et Jones 2011). Il est intéressant de noter que les deux voies activées par les hormones JA et SA sont très souvent antagonistes (**figure 12**). La signalisation générée par ces hormones aboutit à la production de composés antimicrobiens et favorise des renforcements pariétaux par remodelage de la paroi.

▪ L'acide salicylique

L'acide salicylique (SA) dérive de la phénylalanine *via* l'action de la phénylalanine ammonia lyase (PAL) (Dixon et al. 2002). Lors d'une interaction avec un organisme pathogène biotrophe, une accumulation de SA est observée au niveau du site d'infection. SA est une hormone clé dans l'établissement de la résistance locale (LAR) et systémique acquise (SAR). L'accumulation de SA participe à l'augmentation de la production de ROS en maintenant l'état activé des molécules phosphorylées qui contribuent à leur production. L'activation de la voie de signalisation dépendante de SA induit l'expression de certaines protéines PR (pathogenesis related) qui contribuent à la résistance locale face aux biotrophes (Zhang et al, 2013) telles que PR-1 qui est d'ailleurs considérée comme un marqueur de la voie de SA. SA joue aussi un rôle dans la SAR, une résistance plus générale à l'échelle de la plante entière y compris dans les organes non infectés. Cette résistance permet à la plante de mobiliser plus efficacement ses mécanismes de défense suite à l'attaque par un pathogène grâce à un système de « mémoire ». Pour cela, SA va diffuser dans les autres cellules de la plante par le biais du phloème et induire des changements d'expressions géniques dans les cellules saines de la plante. La SAR peut aussi être induite suite au traitement par des molécules purifiées issues d'autres organismes et par certains composés synthétiques (SA, acibenzolar-S-methyl (ASM), benzothiadiazole (BTH)) (cf chapitre 3). Une application exogène de SA engendre la même production de protéines PR que lors d'une infection pathogène au sein de la plante (Lawton et al. 1996). La résistance conférée par ce phénomène persiste dans le temps et est effective sur une multitude de plantes contre un large spectre de pathogènes incluant virus, bactéries, champignons et nématodes (Durrant et Dong 2004).

▪ L'acide jasmonique et l'éthylène

Lorsque la plante est infectée par des pathogènes nécrotrophes, la réponse immunitaire végétale passe par une autre voie de signalisation hormonale induisant la synthèse d'acide jasmonique (JA) et d'éthylène (ET).

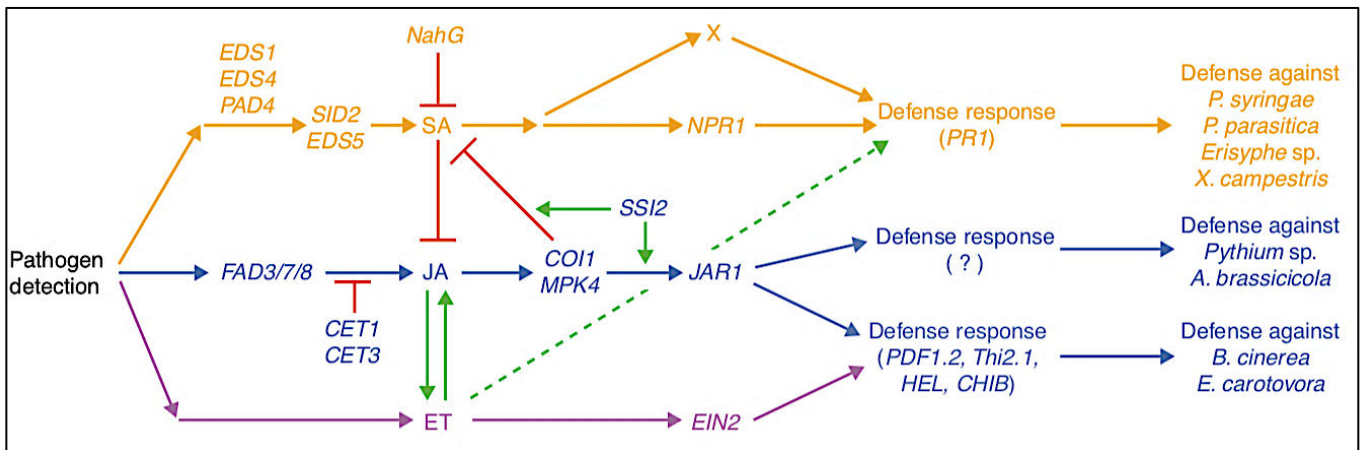


Figure 12 : Implication des différentes voies hormonales dans la défense contre des organismes pathogènes chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Des gènes tels que SID2 et EDS5 (également appelé ICS1) participent de manière directe à la synthèse de SA alors que des gènes tels que EDS1, EDS4, PAD4 régulent sa synthèse (idem pour JA avec les gènes FAD3/7/8. La biosynthèse des hormones SA, JA et ET induit la production de protéines régulatrices, telles que NPR1, JAR1 ou EIN2, qui seront à l'origine de l'activation des mécanismes de défense. SA a été reportée comme étant impliquée plus spécifiquement dans la défense contre les organismes biotrophes alors que ET et JA agissent plus spécifiquement dans la défense contre les organismes nécrotrophes. Il existe des interactions positives (flèches vertes) entre ET et JA qui agissent en synergie alors que les hormones SA et JA (flèches rouges) sont antagonistes dans les feuilles. La flèche verte pointillée indique les interactions positives potentielles entre les voies ET et SA (Kunkel et Brooks 2002).

Pour assurer leur reproduction et leur croissance, les nécrotrophes tuent les cellules végétales en sécrétant des toxines, les HSTs (Host-selective toxins), et des enzymes qui dégradent les polymères des parois cellulaires. Ils sont capables de stimuler une réponse hypersensible chez la plante en sécrétant des molécules similaires à celle de la HR favorisant ainsi une production de ROS et provoquant la mort des cellules qui entourent les cellules infectées (Kliebenstein et Rowe 2008). L'action des ROS sur la paroi est perçue comme un stress oxydatif qui engendre la libération des lipides membranaires tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique. Les acides gras libérés sont ensuite oxydés par les lipoxygénases (LOX) en hydroperoxydes. Les hydroperoxydes sont à l'origine de la synthèse de plusieurs molécules impliquées dans la défense comme JA ou des composés fongiques. Il existe de ce fait une corrélation directe entre le niveau de production de JA et de l'expression du gène *LOX*. L'activation de la voie JA induit également l'expression de gènes spécifiques comme le gène *PDF1.2* qui ne s'exprime qu'en l'absence de SA (Spoel, Johnson, et Dong 2007). ET est également une phytohormone qui s'accumule dans la plante en réponse à des stress abiotiques et biotiques. La synthèse d'ET consiste en trois étapes successives : la méthionine est convertie en *S*-adenosyl-méthionine (SAM) qui est ensuite convertie en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, le précurseur direct d'ET (Adie et al. 2007). Chez *A. thaliana*, la perception de flg22 induit une augmentation de l'expression des gènes *ACS* ce qui se traduit par une augmentation de la production en ET (Berens et al. 2017). Certaines protéines-PR sont directement inductibles par ET telles que PR-2, PR-3, PR-4 et PR-12 (Broekaert et al. 2006). De plus, ET et JA semble agir de manière synergique dans la défense contre les organismes nécrotrophes et participent à l'établissement d'une résistance induite (ISR) dans les tissus non infectés, de façon similaire à la SAR (Choudhary, Prakash, et Johri 2007; Bari et Jones 2009).

Les phytohormones SA et JA/ET peuvent également stimuler l'activation de la PTI lorsque celles-ci sont appliquées de manière exogène. Elles sont donc également considérées comme des éliciteurs.

c) Mécanismes de défense de la plante

La reconnaissance de l'agent pathogène *via* les éliciteurs et la transduction du signal conduit à la mise en place de diverses réactions de défense (Boller et Felix 2009) dont les produits directs ou indirects peuvent contribuer à l'arrêt du développement du pathogène. Les mécanismes de défense comprennent des modifications structurales et biochimiques de la paroi cellulaire, la synthèse de phytoalexines et de protéines PR qui vont agir de manière directe sur le pathogène.

Ces mécanismes de défense impliquent également l'activation de la transcription de gènes de défense (Thatcher, Anderson, et Singh 2005).

▪ **Modification de la paroi végétale**

La paroi végétale, en plus d'être une barrière physique puisque présente de manière constitutive dans la plante, est une barrière active. Les mécanismes de défense associés à la paroi sont de première importance lors de la résistance basale (PTI) (Hückelhoven 2007). Il a été montré précédemment que la paroi joue un rôle signalétique essentiel. Elle contient ses propres molécules signales (DAMPs) et de ce fait, elle est capable d'induire ses mécanismes de défense. En réponse à un agent pathogène, la plante peut induire le renforcement des parois dans le but de limiter l'entrée du pathogène dans les cellules (Thatcher, Anderson, et Singh 2005). Le renforcement pariétal est une réponse de défense qualifiée comme étant une réponse tardive puisque ce phénomène n'est visible que plusieurs heures après infection.

L'une des modifications anatomiques les plus courantes est la formation d'appositions, appelées papilles, entre la paroi et la membrane de la cellule au niveau de la zone de contact du pathogène (Voigt 2014; Ellinger et Voigt 2014). La formation de papilles se fait aussi au niveau des plasmodesmes des cellules saines qui jouxtent les zones nécrosées afin de confiner le pathogène aux points d'infections (Jongebloed et al. 2004). La callose, polymère de $\beta(1,3)$ -D-glucose, est un constituant majeur des papilles (Hückelhoven 2007). Elle s'accumule dans les plantes en réponse à des stress abiotiques et biotiques (Esquerré-Tugayé, Boudart, et Dumas 2000) et est visible plusieurs heures après réponse aux stress, le temps d'être synthétisée en quantités détectables (**figure 13**). La callose est d'ailleurs un indicateur fréquemment utilisé dans la mise en évidence de nouveaux éliciteurs de défense (McCann et al. 2012). Chez *Arabidopsis*, 12 gènes GSL (Glucan Synthase Like) ont pu être identifiés parmi lesquels figure le gène *GSL5* impliqué dans la synthèse de callose en réponse au stress biotique. Une étude complémentaire a d'ailleurs montré que le gène *GSL5* était exprimé en réponse à la Flagelline et que son expression était induite à 90% lors d'une élicitation par la chitine (Ellinger et Voigt 2014).

La paroi cellulaire peut aussi être renforcée par apparition de lignine, un polymère de monolignols résistant aux enzymes hydrolytiques des pathogènes (Miedes et al. 2014). Ce polymère permet à la plante d'augmenter sa résistance à la pression mécanique par exemple lors de la pénétration de l'appressorium fongique dans les cellules (Hückelhoven 2007). La lignine restreint la diffusion des toxines et des enzymes formant ainsi une barrière imperméable aux

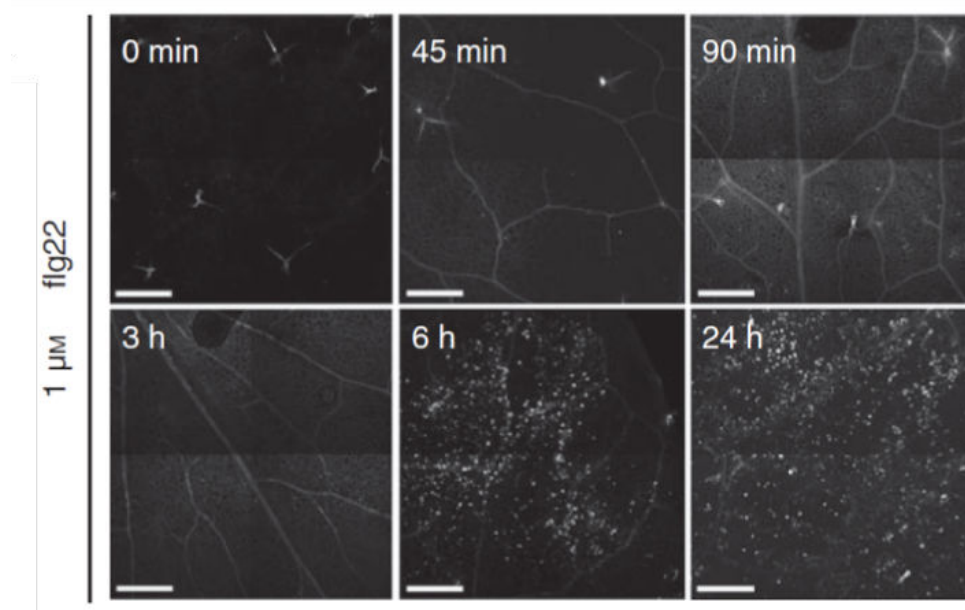


Figure 13 : Observation par microscopie à fluorescence des dépôts de callose, colorés à l’aniline bleue, sur des feuilles d’*Arabidopsis thaliana* suite à un traitement avec un éliciteur (flg22 1 µM).

Les données présentées sont issues de 3 expériences avec n=4 plantes (Ellinger et Voigt 2014).

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco ‘R’	Chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	Thaumatococin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco “lignin-forming peroxidase”	Peroxidase
PR-10	Parsley “PR1”	Ribonuclease-like
PR-11	Tobacco “class V” chitinase	Chitinase, type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown

Figure 14 : Caractérisation des différentes protéines PR en fonction de l’espèce végétale où elles ont été découvertes et en fonction de leurs propriétés « défensives ».

(Van Loon, Rep, et Pieterse 2006; Sels et al. 2008).

molécules néfastes produites par le pathogène. L'augmentation de la résistance mécanique de la paroi peut aussi s'effectuer *via* l'action des ROS qui activent la formation de jonctions entre les protéines riches en hydroxyproline créant ainsi un réseau résistant (Esquerré-Tugayé, Boudart, et Dumas 2000; Hückelhoven 2007; Deepak et al. 2010)

▪ Activation des gènes de défense

Lors de la réponse PTI, la plante active la transcription de nombreux gènes impliqués dans la restriction et le contrôle développemental du pathogène. Parmi ces gènes, on peut citer ceux qui codent pour la synthèse des protéines PR. Les protéines PR sont des protéines dont l'accumulation a été démontrée en conditions pathologiques (van Loon, Rep, et Pieterse 2006; Sels et al. 2008). Les protéines PR ont un effet à court terme et sont classées en plusieurs familles parmi lesquelles on distingue des glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) qui possèdent des activités enzymatiques capables de dégrader les parois cellulaires d'organismes fongiques et bactériens (**figure 14**). Les défensines (PR-12) et les thionines (PR-13) perméabilisent les parois d'organismes pathogènes et la réduction de l'élongation de l'hyphe (Zhang et al, 2013). Les inhibiteurs de protéases (PR-6) et les endoprotéinases (PR-7) inhibent l'activité de protéases pathogènes (Sels et al, 2008). Certaines protéines PR telles que PR-1 sont des protéines clés dans la défense contre des pathogènes biotrophes tels que *Pseudomonas syringae* et peuvent être caractéristiques d'une voie hormonale. PR-1, PR-2 et PR-5 sont dépendantes de la voie de SA. D'autres gènes codant pour la synthèse de molécules antimicrobiennes sont considérés comme participants actifs dans l'immunité végétale. Des protéines riches en cystéine, nommées défensines (PDF1.2), induisent la perméabilisation des membranes fongiques et la réduction de l'élongation de l'hyphe (Zhang et al, 2013). PR-3, PR-4 et PDF1.2 dépendent de la voie hormonale de JA. De la même façon, en réponse à une attaque pathogène, la synthèse de composés toxiques comme les phytoalexines est activée. Les phytoalexines sont des molécules lipophiles de faible poids moléculaire et antimicrobiennes qui s'accumulent aux sites d'infections pathogènes (Hammond-Kosack et Jones 2015). Chez *Arabidopsis thaliana*, la phytoalexine majoritaire est la camalexine et sa synthèse implique les cytochromes CYP79B2 et CYP71B15 (PAD3) (Glawischnig 2007). La camalexine joue un rôle important dans la défense en déstabilisant la membrane cellulaire des agents pathogènes (Zhou 1999). Sa production a été reportée suite à des infections bactériennes (*Pseudomonas syringae* DC3000) (Beets et al. 2012; N. Zhang et al. 2014), fongiques (*Plectosphaerella cucumerina*) (Denby, Kumar, et Kliebenstein 2004; Sanchez-Vallet et al. 2010) et en réponse à des infections causées par des oomycètes (Roetschi et al. 2001; Schlaeppli et al. 2010). D'autres phytoalexines telles que le resveratrol, la phytoalexine majeure de la vigne, peuvent être synthétisées à partir

de la voie des phénylpropanoïdes *via* l'enzyme clé : la phénylalanine ammonia lyase (PAL)
(Dixon et al. 2002).

Mécanismes de défense des plantes à l'échelle racinaire

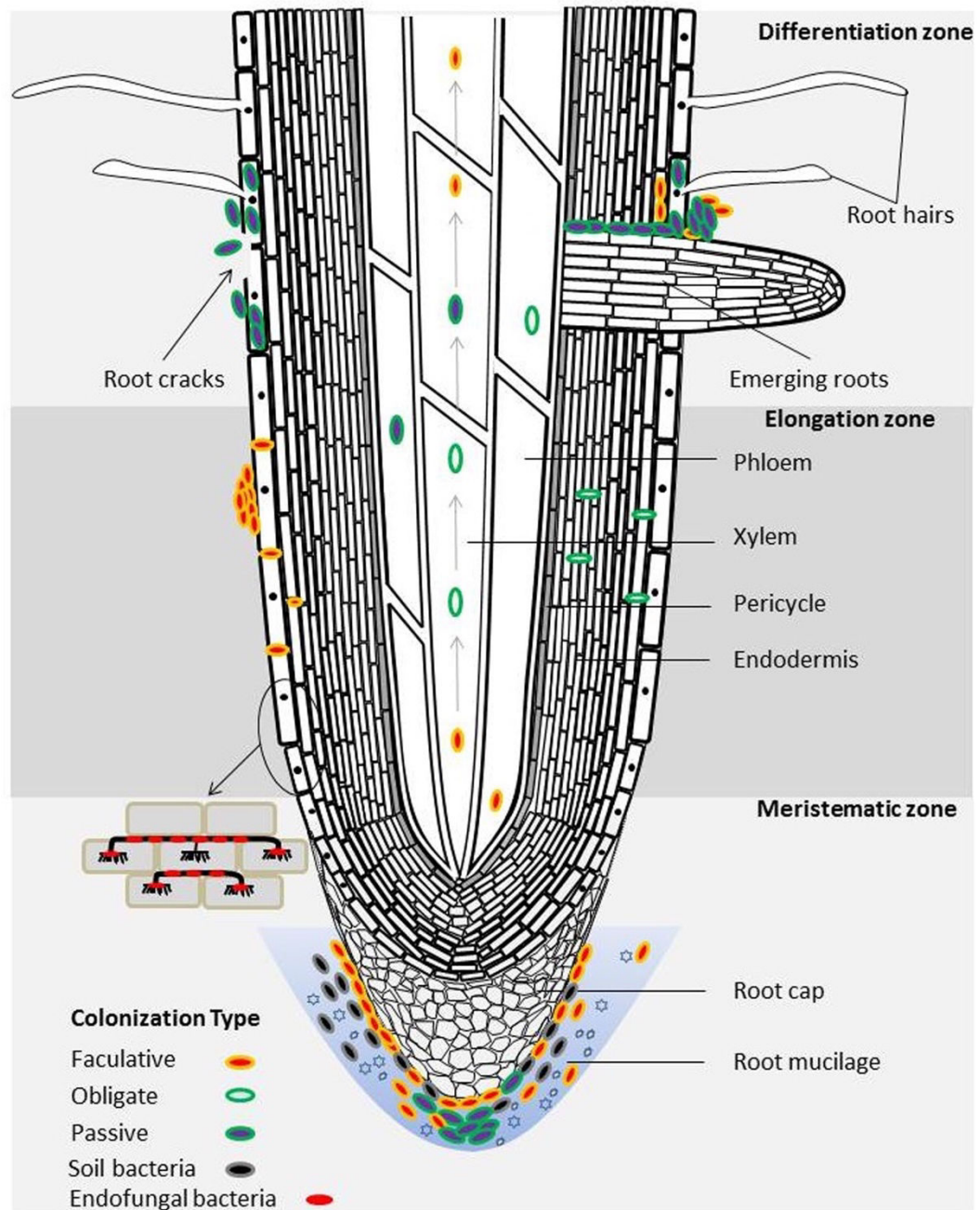


Figure 15 : Distribution des principales voies d’entrées pour les microorganismes bénéfiques et pathogènes dans la racine.

Les racines secondaires représentent la principale voie d’entrée. Les microorganismes peuvent ensuite migrer vers les parties aériennes de la plante via les vaisseaux conducteurs (xylème et phloème) (H. Liu et al. 2017).

Bien souvent, les études visant à comprendre les mécanismes de défense d'une plante sont restreintes à l'échelle foliaire. Pourtant des travaux récents ont montré l'importance des réponses racinaires dans les mécanismes de défense (Nalam, Shah, et Nachappa 2013). Les racines produisent de nombreux métabolites secondaires (Guo et Ge 2016) qui peuvent être transportés *via* le xylème jusqu'aux feuilles afin de les protéger contre des agressions pathogènes (S. Rasmann et Agrawal 2008). La nicotine, présente chez le tabac, en est un bon exemple (Kaplan et al. 2008). Les racines synthétisent également des précurseurs nécessaires à la synthèse de métabolites secondaires dans les feuilles. L'ombelliféron qui est le précurseur de plusieurs furocoumarines est par exemple produite dans les racines de *R. graveolens* avant d'être transportée jusqu'aux feuilles (Bezemer et al. 2004; Erb et al. 2009).

I. Les racines : une voie d'entrée pour de nombreux organismes pathogènes

La rhizosphère est une zone du sol formée et influencée par les racines par le biais des exsudats (Badri et al. 2009; Sasse, Martinoia, et Northen 2018; Olanrewaju et al. 2019). Cette zone est un important réservoir à microorganismes puisque 1 gramme de rhizosphère contient 10^6 à 10^9 bactéries, 10^5 à 10^6 champignons et 10^1 à 10^2 nématodes (Trevors 2010). En conséquence, les racines sont également une voie d'entrée pour de nombreux microorganismes bénéfiques et pathogènes (**figure 15**) (Santoyo et al. 2016; H. Liu et al. 2017).

Certains microorganismes profitent d'ouvertures naturelles présentes à la jonction des racines primaires et secondaires. D'autres, tel que *Verticillium longisporum* chez le colza, ciblent plus particulièrement les tissus jeunes localisés au niveau des racines II^{aires} ou au niveau de la zone d'élongation (Okubara et Paulitz 2005; Perrine-Walker et al. 2007). Les poils absorbants sont également une voie d'entrée privilégiée pour les bactéries *P. fluorescens* chez l'olivier (Prieto et al. 2009). D'autres pathogènes tels que *Fusarium oxysporum* sp. *Vasinfestum* et *Verticillium longisporum* entrent par les racines et infectent le système vasculaire aérien des plantes (Dowd, Wilson, et McFadden 2004; Iven et al. 2012). De plus certains pathogènes considérés comme étant des pathogènes « aériens » tels que *Colletotrichum graminicola* et *Magnaporthe grisea* sont capables d'infecter les racines (Sesma et Osbourn 2004; Sukno et al. 2008) pour coloniser les parties aériennes, bien que la progression de la maladie diffère entre les deux organes (Balmer et al. 2013; De Coninck et al. 2015). Dans les feuilles, le champignon *Colletotrichum graminicola* adopte un mode de vie hémibiotrophe tandis que dans la racine le mode de vie est uniquement biotrophe (Balmer et al. 2013). Les structures de pénétration sont également différentes entre les deux organes. Alors que dans les feuilles, les hyphes sont proéminents et aboutissent à la formation d'appressoriums qui pénètrent dans la cellule, dans la racine, les hyphes sont rampants

avec des structures de pénétration moins élaborées appelées hyphopodium (Sesma et Osbourn 2004; Balmer et al. 2013). Par ailleurs, bien que *Colletotrichum graminicola* soit capable d'infecter les deux organes, dans les feuilles les hyphes forment un réseau dense qui s'étend à l'ensemble des cellules contrairement aux racines où l'infection semble limitée à quelques cellules (**figure 16**) (Balmer et al. 2013).

Ces différences de comportement laissent ainsi suggérer que les racines emploient des mécanismes de défense différents de ceux observés dans les feuilles.

II. La défense racinaire : des mécanismes de défense spécifiques

Bien que les racines présentent des mécanismes de défense identiques à ceux observés dans les feuilles (ROS, callose, production de composés antimicrobiens et synthèse d'hormones) (Millet et al. 2010; De Coninck et al. 2015), ces organes ont également développé des mécanismes de défense spécifiques (De Coninck et al. 2015) tels que les cellules frontières, le piège extracellulaire (RET) et les corps du réticulum endoplasmiques (ER-bodies).

1. Les cellules frontières : cellules bordantes et cellules apparentées aux cellules bordantes

Les cellules frontières sont des cellules qui se détachent de l'apex racinaire en présence d'eau (**figure 17A-C**) (Hawes et al. 2000). La production et le détachement de ces cellules sont régulés par des signaux endogènes et environnementaux (Gunawardena et Hawes 2002; Driouich, Durand, et Vicre 2007). Les deux types principaux de cellules frontières sont les cellules bordantes (BC pour Border Cells) qui sont libérées de manière individuelle dans la rhizosphère (**figure 17 D**) (Hawes et al. 2000; Driouich, Durand, et Vicre 2007) et les cellules apparentées aux cellules bordantes (BLC pour Border Like-Cells) qui se différencient des BC par leur agrégation après séparation de l'apex (**figure 17 E**) (Vicre 2005; Driouich et al. 2010). L'ensemble cellulaire formé par les BC/BLC après détachement de l'apex sera désigné par le terme AC-DC (associated root cap derived cells) (Driouich et al. 2019). La forme et le nombre de cellules AC-DC libérées par l'apex racinaire dépend des espèces végétales (Hawes et al. 2002; Cannesan et al. 2011a; Plancot et al. 2013). Par exemple après une semaine de culture, *Arabidopsis thaliana* produit environ 130 BLC alors que le radis en produit 900 (Driouich et al. 2012). De façon similaire, le pois produit environ 3500 à 4500 BC (Hawes et al. 2002) alors que le bananier produit environ 5000 BC (Wuyts et al. 2006).

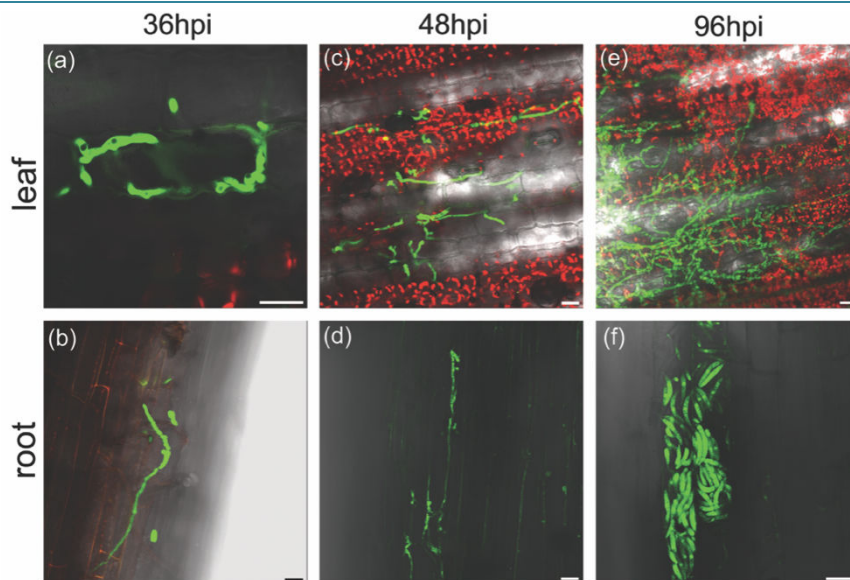


Figure 16 : Dynamique d'infection des feuilles et des racines de maïs par le champignon *Colletotrichum graminicola*.

Photographies, prises au microscope confocal à fluorescence, de feuilles (a, c, e) et de racines (b, d, f) de maïs infectées par *Colletotrichum graminicola*-GFP après 36 h (a, b), 48h (c, d), et 96h (e, f) d'infection. Dans les feuilles, les hyphes du champignon forment un réseau dense alors que dans les racines l'infection se limite à quelques cellules (Balmer et al. 2013).

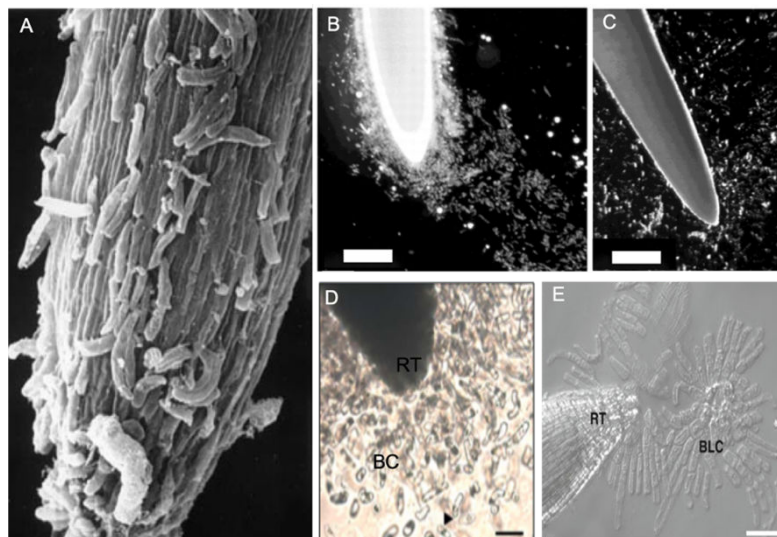


Figure 17 : Les cellules frontières (AC-DC) : détachement de l'apex et les deux types majoritaires d'AC-DC.

(A) Photographie prise au microscope électronique à balayage de l'apex racinaire de Pois montrant la présence d'AC-DC. (B) Lorsque l'apex est immergé dans l'eau, le mucilage absorbe instantanément l'eau et les AC-DC se détachent de l'apex dans les secondes qui suivent. (C) Après quelques minutes, toutes les AC-DC se sont dispersées dans le milieu environnant. (D) Chez *Arabidopsis thaliana*, les cellules frontières de type BLC (Border-like cells) restent attachées les unes aux autres après séparation de l'apex. (E) Chez *Pisum sativum*, les cellules frontières de type BC (Border cells) sont libérées de manière individuelle. RT : apex ; Barres d'échelle : (B-C) = 1 mm ; (D-E) = 20 μ m. (Wen et al. 2008; Cannesan et al. 2011a; Driouich et al. 2013; Hawes, McLain, et al. 2016)

Même si les AC-DC se détachent de l'apex racinaire, ces cellules restent viables et métaboliquement actives pendant plusieurs jours et peuvent même être cultivées *in vitro* (Hawes et Pueppke 1987; Vicré et al. 2005; Plancot et al. 2013). Les AC-DC sont capables de répondre à des stress abiotiques (Zhao, Misaghi, et Hawes 2000; Miyasaka et Hawes 2001; Cai et al. 2011) et biotiques (Zhao, Schmitt, et Hawes 2000; Driouich et al. 2013) en augmentant leur nombre (**figure 18A-18B**) (Curlango-Rivera et al. 2010). En plus d'assurer un rôle de barrière physique, elles participent de manière active à la défense contre de nombreux organismes pathogènes (bactéries, champignons, nématodes, oomycètes) (**figure 18C-18D**) (Hawes et Pueppke 1987; Goldberg, Hawes, et Stanghellini 1989; Zhao, Schmitt, et Hawes 2000; Gunawardena et Hawes 2002; Cannesan et al. 2011a). En effet, après leur libération, les AC-DC conservent une activité de sécrétion de divers composés qui s'ajoutent à ceux libérés par la racine (Wen et al. 2007). L'ensemble de ces sécrétions porte le nom d'exsudats racinaires et forme le mucilage.

2. Le piège extracellulaire : RET (Root extracellular Trap)

Des études ont montré que le mucilage est formé par divers constituants tels que des molécules antimicrobiennes (Gunawardena et Hawes 2002; Wen et al. 2007; Hawes, Allen, et al. 2016), des métabolites secondaires comprenant des phytoalexines (Bais et al. 2006), des polysaccharides de type pectines (Durand et al. 2009), AGP (Cannesan et al. 2011a), extensines (Castilleux et al. 2018). La présence d'ADN extracellulaire (ADNex) ainsi que d'histones de types H4 ont également été mis en évidence dans les sécrétions racinaires du Pois (**figure 19A**) (Wen et al. 2006). Les exsudats qui constituent le mucilage sont impliqués dans de nombreuses fonctions. Ils permettent la solubilisation de certains minéraux, nutriments organiques et inorganiques pour une meilleure assimilation de ces éléments par la racine (Meier, Finzi, et Phillips 2017; Canarini et al. 2019) et limitent la toxicité de certains métaux lourds comme l'aluminium (Cai et al. 2011; Cai et al. 2013; Hawes, McLain, et al. 2016).

Les exsudats permettent à la plante de moduler la composition de la microflore rhizosphérique (Bais et al. 2006; Sasse, Martinoia, et Northen 2018; Hu et al. 2018). Ils peuvent favoriser le recrutement d'organismes bénéfiques tels que des champignons mycorhiziens et des bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Bacteria) en agissant comme molécules signal ou comme molécules attractives (Rasmann et Turlings 2016). De manière inverse, ils peuvent agir comme molécules inhibitrices de croissance ou comme molécules répulsives contre les organismes pathogènes (Baetz et Martinoia 2014). L'ensemble constitué par le mucilage et les AC-DC forme ainsi un réseau protecteur autour de la racine (Driouich et al. 2013).

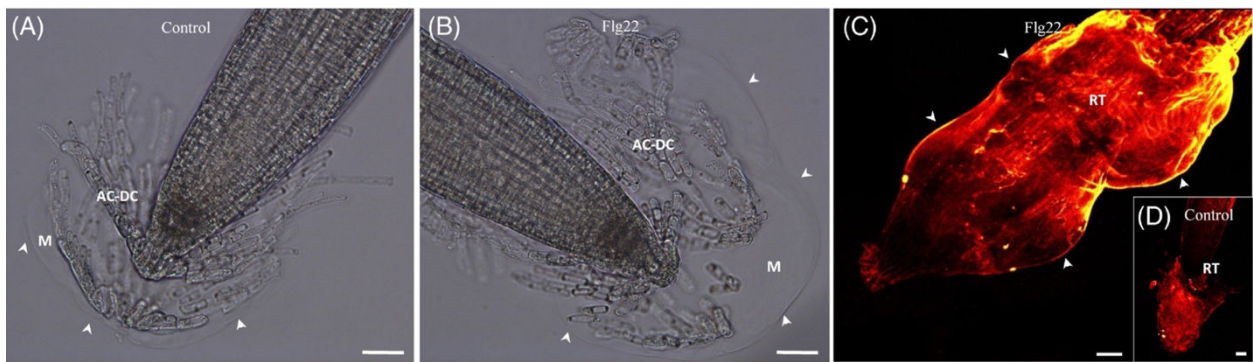


Figure 18 : Observations microscopiques du RET formé par les AC-DC et le mucilage chez *Arabidopsis thaliana* en conditions non élicitées (A-D) et élicitées (B-C) avec la flg22.

En conditions élicitées (B), le nombre de cellules frontières (AC-DC) est plus important par rapport aux racines non élicitées (A). La présence d'un mucilage plus épais (flèches blanches) en conditions élicitées est également à noter (B). Les extensines, glycoprotéines qui participent au renforcement de la paroi cellulaire en réponse aux stress biotiques (Castilleux et al. 2018), font également partie intégrante du RET. Par le biais de l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre des extensines (JIM11), il est possible de mettre en évidence un remodelage des extensines en réponse à une élicitation (C) (marquage fluorescent plus important) par rapport à des racines non élicitées (D). Barres d'échelle = 50 µm (Driouich et al. 2019).

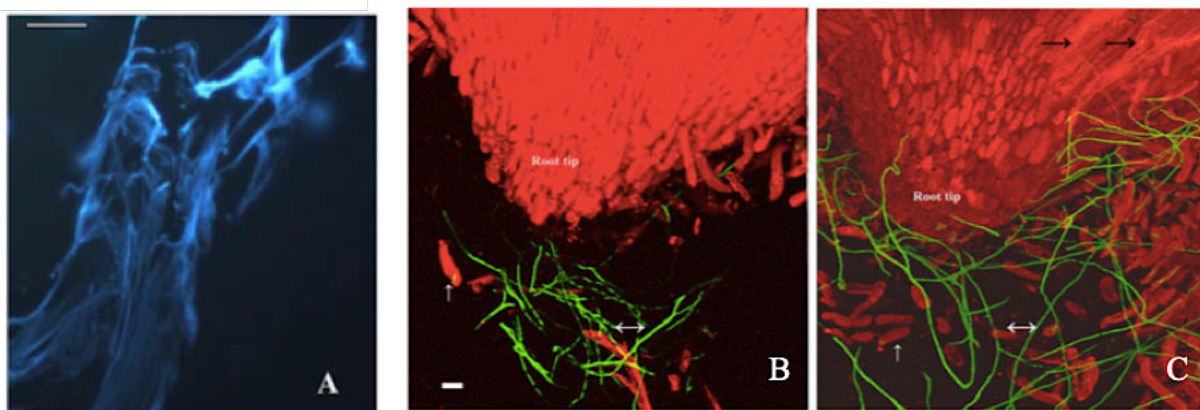


Figure 19 : Mise en évidence de la présence d'ADN extracellulaire et de son implication dans la défense lors de l'interaction *N. haematococca/Pisum sativum*.

(A) Mise en évidence de l'ADN extracellulaire par coloration au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). (B) La croissance des hyphes fongiques (vert) est limitée et à distance de l'apex racinaire (rouge). Les hyphes ne pénètrent pas l'apex racinaire. Les cellules bordantes détachées de l'apex sont indiquées par la flèche blanche. (C) Dans les racines traitées avec de la DNase, les hyphes du champignon sont denses et pénètrent l'apex racinaire. Le nombre de cellules bordantes est plus élevé. Les photographies ont été prises au microscope confocal après 36h d'inoculation. Barres d'échelle = 20 µm (Wen et al. 2009)

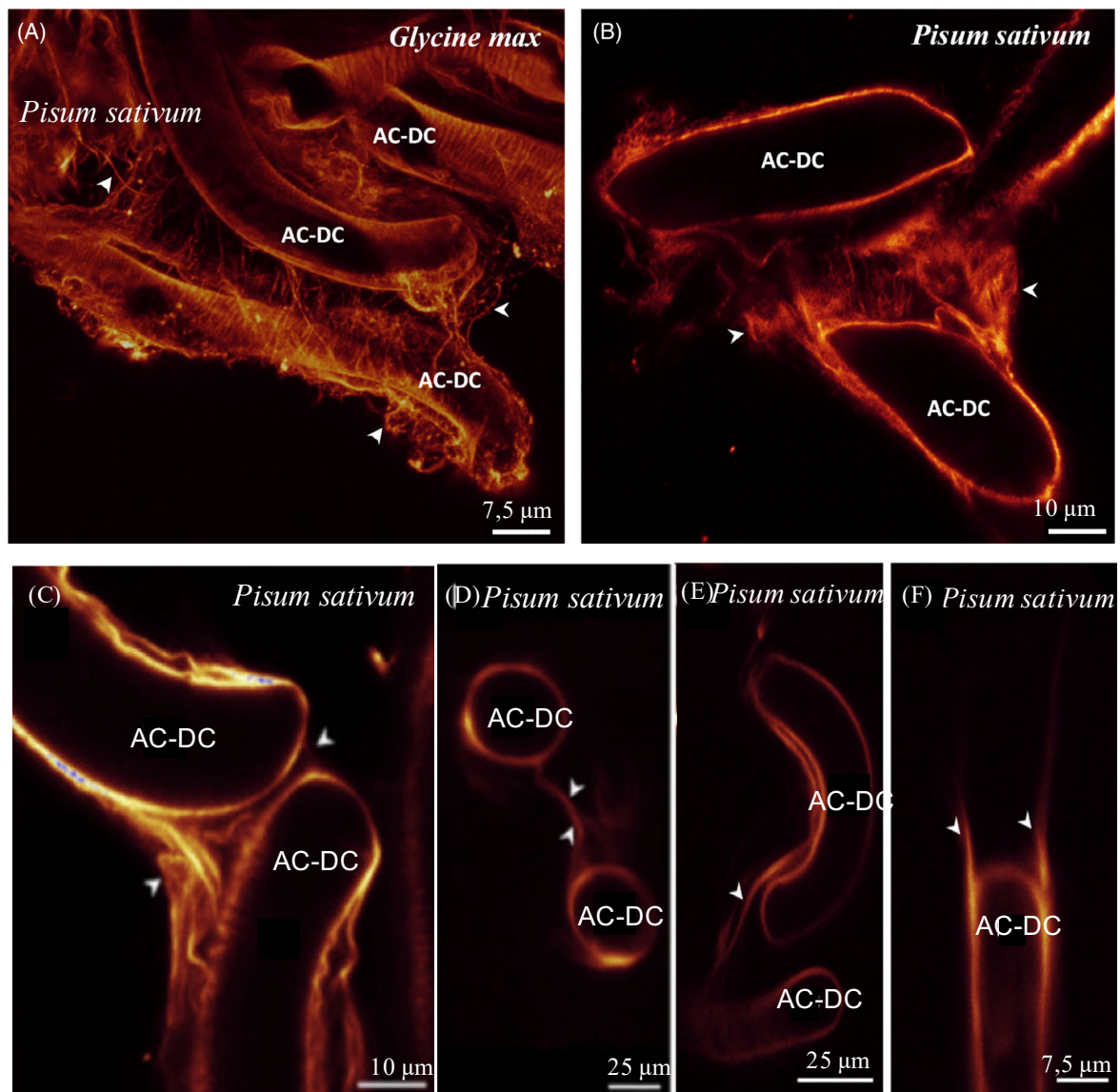


Figure 20 : Mise en évidence des ponts moléculaires de xyloglucane entre les cellules bordantes (AC-DC).

Les ponts moléculaires (flèches blanches) sont observés chez plusieurs espèces telles que le Soja (A) et le Pois (B-C-D-E-F) et sont constitués par des polysaccharides tels que le xyloglucane (A-B-C) et la cellulose (D-E-F) (Ropitiaux et al. 2019). Le xyloglucane a été mis en évidence par l'anticorps monoclonal LM15 tandis que la cellulose est mise en évidence par l'utilisation de la sonde Direct red23 (Ropitiaux et al. 2019).

Il a récemment été proposé que ce réseau pouvait agir de manière similaire au modèle du Neutrophil Extracellular Trap (NET) des mammifères. Par analogie de structure et de fonction un modèle regroupant les AC-DC et leur sécrétion a été développé : le Root Extracellular Trap (RET) (Driouich et al. 2013). Le NET et le RET présentent des propriétés moléculaires et fonctionnelles communes. Ils contiennent tous les deux des composants similaires liés à la défense comprenant des protéines antimicrobiennes, de l'ADN et des histones qui sont capables de capturer, immobiliser et détruire les agents pathogènes avec lesquels ils entrent en contact (Driouich et al. 2019).

L'ADN extracellulaire libéré par les AC-DC contribue à la résistance contre les champignons pathogènes en limitant la croissance des hyphes fongiques (**figure 19 B**). Cet effet est empêché en présence de DNase (**figure 19 C**) (F. Wen et al. 2009). De façon similaire, les protéoglycanes tels que les AGP (arabino-galactan proteins) possèdent des propriétés antimicrobiennes (Nguema-Ona et al. 2013). Les AGP provoquent l'enkystement des zoospores d'*A. euteiches* empêchant leur germination *in vitro* (Cannesan et al. 2012). Ceci pourrait alors expliquer le faible pourcentage d'infection observé dans les apex racinaires de pois traités par des AGP (Cannesan et al. 2012). Les AGP seraient également impliqués dans des mécanismes de reconnaissance et d'attachement des bactéries à la surface racinaire. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'attraction des bactéries bénéfiques du genre *Rhizobium sp* semble influencée par la présence d'AGP (Gaspar 2004; Vicré et al. 2005) en favorisant l'attachement des bactéries sur la racine (Xie et al. 2012b). De manière surprenante, il a également été démontré que les AC-DC pouvaient sécréter des molécules attractives pour des organismes pathogènes (Zhao, Schmitt, et Hawes 2000). Attirés par les sécrétions des AC-DC, les nématodes peuvent être temporairement immobilisés ce qui permet à l'apex racinaire de continuer sa croissance et ainsi d'échapper aux nématodes (Zhao, Schmitt, et Hawes 2000; Hawes et al. 2000). Les zoospores de *Pithium dissotocum* et *Pythium catenulatum* sont également attirées par les AC-DC et vont les infecter de façon privilégiée. Toutefois après germination des zoospores, leur cycle de développement sera stoppé protégeant ainsi l'apex racinaire (Goldberg, Hawes, et Stanghellini 1989). La structure et le maintien du RET sont assurés par un réseau de polysaccharides et de glycoprotéines tels que les homogalacturonanes (Durand et al. 2009), le xylogalacturonane, la cellulose (Ropitiaux et al. 2019) ou les extensines (Castilleux et al. 2018).

La notion de RET, d'abord développée chez les plantes produisant des BLC, a récemment été renforcée par la découverte de la présence de ponts moléculaires entre les BC (Ropitiaux et al. 2019). En effet, bien que les BC semblent indépendantes les unes des autres, elles sont en

réalité reliées entre elles par des ponts moléculaires constitués de xyloglucane et de cellulose (**figure 20 A-F**) (Ropitiaux et al. 2019). La présence de ces connexions laisse ainsi penser que les BC forment, tout comme les BLC, un réseau cohésif et protecteur autour de la racine.

3. Les ER-bodies

Les corps du réticulum endoplasmique (ER-bodies) sont des structures de forme fusiforme (5-10 μm) majoritairement retrouvées chez les plantes de l'ordre des Brassicacées. Ces structures peuvent être présentes dans les tissus foliaires en réponse à un stress (Matsushima 2002) ou dans certains tissus foliaires de manière constitutive (Nakazaki et al. 2019). La production des ER-bodies est également inductible en réponse à un traitement au méthyl-jasmonate. Contrairement aux feuilles, ces organites sont constitutifs dans la racine et ne sont pas répartis de manière homogène (Matsushima 2002). Ils sont absents de la zone de quiescence, de la stèle et de l'endoderme (Nakano et al. 2014; Gotté et al. 2016). L'abondance de ces structures dans les racines suggèrent que les ER-bodies jouent un rôle majeur dans la défense racinaire contre les stress biotiques et abiotiques. Les ER-bodies sont constitués de β -glucosidases (BGLU) (Nakano et al. 2014), qui lorsque les cellules sont endommagées, forment un complexe enzymatique par association avec la protéine PYK10. Le complexe BGLU/PYK10 va permettre la formation de composés antimicrobiens tels que la scopolétine. Ce complexe serait également impliqué dans le métabolisme des glucosinolates à l'origine de la synthèse de composés toxiques pour les agents pathogènes tels que la camalexine (Nakano et al. 2017; Singh 2017).

III. La défense racinaire : une réponse compartimentée

Les organismes pathogènes infectent de façon privilégiée les zones les plus sensibles de la racine comme les tissus jeunes de la zone d'élongation ou de la zone de différenciation. Des zones spécialisées dans la défense de la racine ont été mises en évidence : c'est le cas du RET et des AC-DC qui sont localisés au niveau de l'apex racinaire et des ER-bodies qui ne sont pas répartis de façon homogène au sein de la racine. Des travaux ont récemment démontré l'existence d'une réponse plus spécialisée et compartimentée dans cet organe (Millet et al. 2010; Cannesan et al. 2011b; Poncini et al. 2017). L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'une synthèse bibliographique publiée sous forme d'une revue dans *Frontiers in Plant Sciences* en novembre 2018.



Plant Immunity Is Compartmentalized and Specialized in Roots

Coralie Chuberre^{1,2}, Barbara Plancot^{1,2}, Azeddine Driouich^{1,2}, John P. Moore³, Muriel Bardor^{1,2,4}, Bruno Gügi^{1,2*†} and Maïté Vicré^{1,2*†}

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale EA4358, Rouen, France, ² Fédération de Recherche "NORVEGE"- FED 4277, Rouen, France, ³ Department of Viticulture and Oenology, Faculty of AgriSciences, Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch University, Matieland, South Africa, ⁴ Institut Universitaire de France, Paris, France

Roots are important organs for plant survival. In recent years, clear differences between roots and shoots in their respective plant defense strategies have been highlighted. Some putative gene markers of defense responses usually used in leaves are less relevant in roots and are sometimes not even expressed. Immune responses in roots appear to be tissue-specific suggesting a compartmentalization of defense mechanisms in root systems. Furthermore, roots are able to activate specific defense mechanisms in response to various elicitors including Molecular/Pathogen Associated Molecular Patterns, (MAMPs/PAMPs), signal compounds (e.g., hormones) and plant defense activator (e.g., β -aminobutyric acid, BABA). This review discusses recent findings in root defense mechanisms and illustrates the necessity to discover new root specific biomarkers. The development of new strategies to control root disease and improve crop quality will also be reviewed.

Keywords: elicitor, systemic acquired resistance, root immunity, root border cells, environment

INTRODUCTION

In the natural environment, plants are continuously exposed to diverse pathogens that affect crop production and food security. In the last decade, considerable progress has been made to understand the molecular and cellular interactions between pathogens and plants (Lai and Mengiste, 2013; Zhang et al., 2013). The cell wall represents the first line of plant defense acting as a preformed barrier against pathogen invasion. Activation of inducible defense reactions is based on the plant's ability to detect the presence of microorganisms through the recognition of highly conserved molecular patterns called MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns). These conserved patterns are foreign as they derive directly from either non-pathogenic microorganisms (Henry et al., 2012) or from pathogenic microorganisms, e.g., bacterial flagella (Chinchilla, 2006), peptidoglycan (Gust et al., 2007), fungal chitin (Zipfel and Felix, 2005). These pathogenic derived patterns are commonly referred to as PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Plants also recognize endogenous signals released by the plant itself, under pathogen pressure (Klarzynski and Fritig, 2001) or during abiotic stress (Choi and Klessig, 2016). These biotic and abiotic stress related patterns are called DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Boller and Felix, 2009). All of these molecular patterns, also known as general elicitors (Henry et al., 2012), are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) present at the cell surface (Newman et al., 2013; De Lorenzo et al., 2018). In this review, the generic term elicitor refers to any compound that triggers plant responses in various ways: MAMPs/PAMPs/DAMPs, signaling compounds (salicylic acid,

OPEN ACCESS

Edited by:

Simone Ferrari,
La Sapienza University of Rome, Italy

Reviewed by:

Marc Libault,
University of Oklahoma, United States
Maria J. Pozo,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), Spain

*Correspondence:

Bruno Gügi
bruno.gugi@univ-rouen.fr
Maïté Vicré
maite.vicre@univ-rouen.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 15 June 2018

Accepted: 31 October 2018

Published: 28 November 2018

Citation:

Chuberre C, Plancot B,
Driouich A, Moore JP, Bardor M,
Gügi B and Vicré M (2018) Plant
Immunity Is Compartmentalized
and Specialized in Roots.
Front. Plant Sci. 9:1692.
doi: 10.3389/fpls.2018.01692

methyl-jasmonate), priming agents and plant defense activators (PDAs) used for agricultural practices (e.g., β -aminobutyric acid, BABA). The perception of such elicitors triggers the activation of a non-host resistance known as Pathogen- or Pattern-Triggered Immunity (PTI) (Jones and Dangl, 2006; Bigeard et al., 2015). PTI contributes to host defense against a broad range of pathogens. The current knowledge around plant immunity is predominantly focused on the aerial part of the plant. However, the root is the organ that encounters the highest microorganism density and diversity being within the rhizosphere (Torsvik and Ovreas, 2002; Jacobs et al., 2011). In this review, we aim to provide new insights regarding root immune system responses to PAMPs. Furthermore, the ability of pathogen mimicking molecules, referred as PDAs on stimulating root defense mechanisms will be discussed.

THE ROOT SYSTEM AS A MAJOR SITE FOR MICROBE ENTRY

The rhizosphere is highly enriched in microorganisms with up to 10^6 – 10^9 bacteria, 10^5 – 10^6 fungi and 10^1 – 10^2 nematodes per gram of soil (Watt et al., 2006; Mendes et al., 2013). These organisms can be either beneficial, such as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Beneduzi et al., 2012), or pathogenic, such as *Fusarium* spp. Soil-borne such as *Fusarium*, *Pythium*, or *Phytophthora* infect the roots of a variety of crops resulting in significant economic losses. Thus, roots represent an important opportunistic entryway for a number of soil pathogens. Pathogens can penetrate roots through natural apertures present at the junction between the main and lateral roots such as epidermal cracks (Perrine-Walker et al., 2007) or through young growing tissues which lack secondary cell walls (Okubara and Paulitz, 2005). Amongst pathogenic organisms, vascular pathogens penetrate the root system to infect and cause symptoms within the aerial parts of host plants such as their leaves. For example, the fungus *Colletotrichum graminicola*, responsible of maize anthracnose is able to infect roots even though it is generally not considered to be a root disease pathogen (Sukno et al., 2008). In rice, the fungus *Magnaporthe grisea* (Sesma and Osbourn, 2004), typically thought to be a foliar pathogen, was able to spread from infected roots to leaves. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Verticillium longisporum* infect root vascular tissue (Dowd et al., 2004) and moves upwards to the foliage (Iven et al., 2012). It is therefore essential for roots to detect soil pathogens and initiate defense responses to limit pathogen infection and spread. Although root infections have a negative impact on crop production (Okubara and Paulitz, 2005), most plant defense studies are focused on leaves (Balmer and Mauch-Mani, 2013) rather than on roots. To date, only few investigations are dedicated to root defenses as root systems are more complex to study because of their general inaccessibility. In addition, soil-borne microorganisms are not easily culturable *in vitro*. Less than 1% of soil microorganisms are currently characterized and culturable under laboratory conditions (Singh et al., 2004).

PAMPS RECOGNITION IN ROOTS

Recent studies have highlighted that roots are able to perceive the presence of pathogens and induce the PTI response. Induction of defense mechanisms is shown to occur in response to a wide range of elicitors including the flagellin-derived peptide elicitor Flagellin22 (Flg22), fusaric acid, peptidoglycan (PGN), Methyl-jasmonate (MeJA) and extracts from *Pectobacterium atrosepticum* (Millet et al., 2010; Plancot et al., 2013; Gotté et al., 2015, 2016; Koroney et al., 2016). Treatment with Flg22 was shown to enhance resistance to microbial invasion in roots by inducing reactive oxygen species (ROS) accumulation, callose deposition and the production of antimicrobial compounds during PTI response (Millet et al., 2010; Tran T.M. et al., 2016). These defense responses clearly show that root cells are able to perceive elicitors, suggesting the presence of cell-surface receptors.

To confirm the existence of MAMPs/PAMPs receptors, the root responses were investigated in an Arabidopsis *fls2* mutant lacking a functional Flg22 receptor. The PTI response to Flg22 was completely abolished in the *fls2* mutant confirming the existence of specific PRRs in Arabidopsis roots (Gómez-Gómez and Boller, 2000; Gómez-Gómez, 2004; Robatzek et al., 2006; Millet et al., 2010). It has been shown that all Arabidopsis root tissues, including the root-cap derived border-like cells (BLCs), have the capacity to activate immune responses (Plancot et al., 2013; Wyrsh et al., 2015). This suggests that Flg22 receptor (FLS2) is present in all root tissues. Further studies demonstrated significant differences in the expression of the gene *FLS2* in various root tissues (Beck et al., 2014). Indeed, intensity of the responses observed was more pronounced within the inner root tissues believed to be due to enriched receptor distribution and density in the endodermis and stele cells (Beck et al., 2014; Wyrsh et al., 2015). However, even if the *FLS2* promoter activity is mainly present in the root stele, the expression of *FLS2* expanded to cortical and epidermal cell layers when roots are grown under non-sterile or biotic stress conditions (Beck et al., 2014; Wyrsh et al., 2015). Moreover, *FLS2* expression is also shown to be regulated in a developmental-dependent manner (Beck et al., 2014). For example, the *FLS2* promoter activity is highly expressed in primordia and in growing lateral roots. However when these lateral roots reach a mature developmental stage, the *FLS2* expression became restricted to the vascular cylinder of the developing lateral roots (Beck et al., 2014). Therefore, these findings suggest that the expression of MAMPs receptors are limited and restricted to the most vulnerable sites for pathogen entryway. Activation of PTI was therefore induced only when PAMPs perception recognizes a significant specific threat to the plant itself. This is especially true when MAMPs/PAMPs are detected in the pericycle or in the vascular system. However, PAMPs perception by roots was also reported to differ depending on the elicitor type (e.g., fusaric acid, chitin or mycelium extract from *Fusarium oxysporum*) (Millet et al., 2010; Plancot et al., 2013) and according to the specific plant species under study (Tran T. et al., 2016).

In the rhizosphere, roots are constantly exposed to MAMPs. Therefore, roots need to distinguish between microbial “friend or foe,” i.e., recognizing beneficial microbes from pathogenic microbes. It is thus necessary that the root system modulates the defense responses that are associated with their recognition in order to avoid a constant and energetically expensive activation of the PTI. Consequently, beneficial microbes have to escape recognition by the root receptors in order to establish root interactions. One hypothesis is that *FLS2* expression in roots can be sufficiently low to allow beneficial bacteria to colonize root tissue without triggering PTI defense responses (Millet et al., 2010). Both beneficial and pathogen micro-organisms are able to modulate root immune responses suggesting a fine-tuned molecular dialog. Such interaction is complex because it involves the interactions with beneficial microbes, which the plant must encourage without threatening its own survival. Interactions between microbiota and roots were recently well reviewed in Hacquard et al., 2017. For more details, the readers are invited to refer to this paper.

PTI RESPONSES IN ROOTS

Previous studies performed in roots indicated that PTI includes molecular events such as the production of ROS (Poncini et al., 2017), transcriptional reprogramming (Boller and Felix, 2009; Millet et al., 2010), callose deposition (Millet et al., 2010) and modified extensin distribution within the cell wall (Ribeiro, 2006; Wojtasik et al., 2011; Plancot et al., 2013; **Figure 1A**). Phytohormones including salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethylene (ET), are also implicated in root defense against pathogens (Tytgat et al., 2013; Papadopoulou et al., 2018). However, the antagonistic interactions of the two hormones JA and SA reported in leaves did not always follow the infection process in, for example, the roots of *Arabidopsis thaliana* (Badri et al., 2008; Attard et al., 2010). In addition, the regulation of defense genes by hormonal elicitation was reported to be organ-specific and differed both quantitatively and qualitatively between aerial and below ground organs in the non-model plants *Brassica oleracea* and *Brassica rapa* (Tytgat et al., 2013; Papadopoulou et al., 2018). Differences regarding the diversity and levels of antimicrobial compound produced occur between roots and leaves suggesting that different regulation mechanisms exist for defense in roots. For example in rice, the expression of typical defense-related genes such as pathogenesis related-proteins (PR-1, PR-10) are rapidly, but transiently, transcribed during the early stages of root infection whereas in leaves the same transcripts continue to accumulate to high levels during later stages of infection (Marcel et al., 2010). Consequently, PR-1 which is a characteristic salicylic acid (SA) marker highly expressed in *Arabidopsis* leaves, is found to be produced at very low concentrations in maize (Balmer et al., 2013) and rice (Marcel et al., 2010) in response to pathogen attack. In *B. rapa*, PR-1 shows also differential regulation in response to hormonal elicitation in both organs (Papadopoulou et al., 2018) confirming that shoots and roots can adopt specific defense responses (Tytgat et al., 2013). Other important proteins

controlling plant responses to pathogen are found in leaves such as JA markers (plant defensin: PDF1.2), ET markers (aminocyclopropane-carboxylate oxidase myrosinase binding protein: ACCO), glucosinolate markers (enzyme involved in glucosinolate biosynthesis: CYP79B2). However, these same biomarkers are not significantly induced in *Arabidopsis* roots (Badri et al., 2008; Attard et al., 2010; Lyons et al., 2015) suggesting they are leaf specific. Taking glucosinolate biosynthesis marker genes as an example we consider their differential expression in roots versus leaves. Glucosinolates are major nitrogen and sulfur containing secondary metabolites that alleviate biotic and abiotic stress in plant species belonging to Brassicaceae (Martinez-Ballesta et al., 2013; Augustine and Bisht, 2015). As compared to leaves, JA induces glucosinolate biosynthesis genes very weakly in roots as glucosinolates are found to be constitutively present in the below ground organs (i.e., roots) of *B. oleracea* (Tytgat et al., 2013). It is suggested that the constitutive high levels of glucosinolates in roots is an efficient approach to counteract rhizosphere pathogen attack versus an inducible synthesis approach. Similarly, the Endoplasmic Reticulum (ER)-bodies are reported to be constitutively produced in roots of *Arabidopsis thaliana* whereas their formation in leaves is only found upon wounding or MeJA treatment (Matsushima, 2002). ER-bodies are organized into network structures that accumulate defense proteins such as β -glucosidase (Nakano et al., 2014). In stress-free conditions, ER-bodies are reported to occur in roots (Nakano et al., 2014, 2017). However, these root ER-bodies are not uniformly formed and have been reported to be absent in some tissues including the quiescent zone, the endodermis and the stele (Gotté et al., 2015). Interestingly, exogenous application of JA or MeJA in roots were shown to have an effect on both the morphology and enzymatic activity of the ER-bodies (Gotté et al., 2015). Such data suggest that ER-bodies are part of the PTI response in roots. Based on these studies, there is a need to carefully select specific gene markers, both according to the plant species and the organs (e.g., aerial or belowground organs) under investigation.

TISSUE-SPECIFIC RESPONSES IN ROOTS

Many pathogens are reported to infect their hosts through specific regions of the root termed root zones (RZs) (Gunawardena and Hawes, 2002; Oren et al., 2003; Cannesan et al., 2011). This suggests that root tissues differ in their susceptibility to pathogens and therefore their inherent resistance capacities. For example, spatiotemporal events in tomato roots are important to limit *Ralstonia solanacearum* from spreading and infecting the entire plant (Caldwell et al., 2017). In pea, *Aphanomyces euteiches* infection is restricted in roots suggesting the existence of tissue specific responses (Cannesan et al., 2011). The differential sensitivities found in root tissues can be partially explained by the spatial localization of pisatin, a phytoalexin that accumulates in response to pathogen infection. It was shown that pisatin accumulates mainly in RZs that escaped pathogen infection [e.g., root cap cells (RC) and differentiation zone (DZ)].

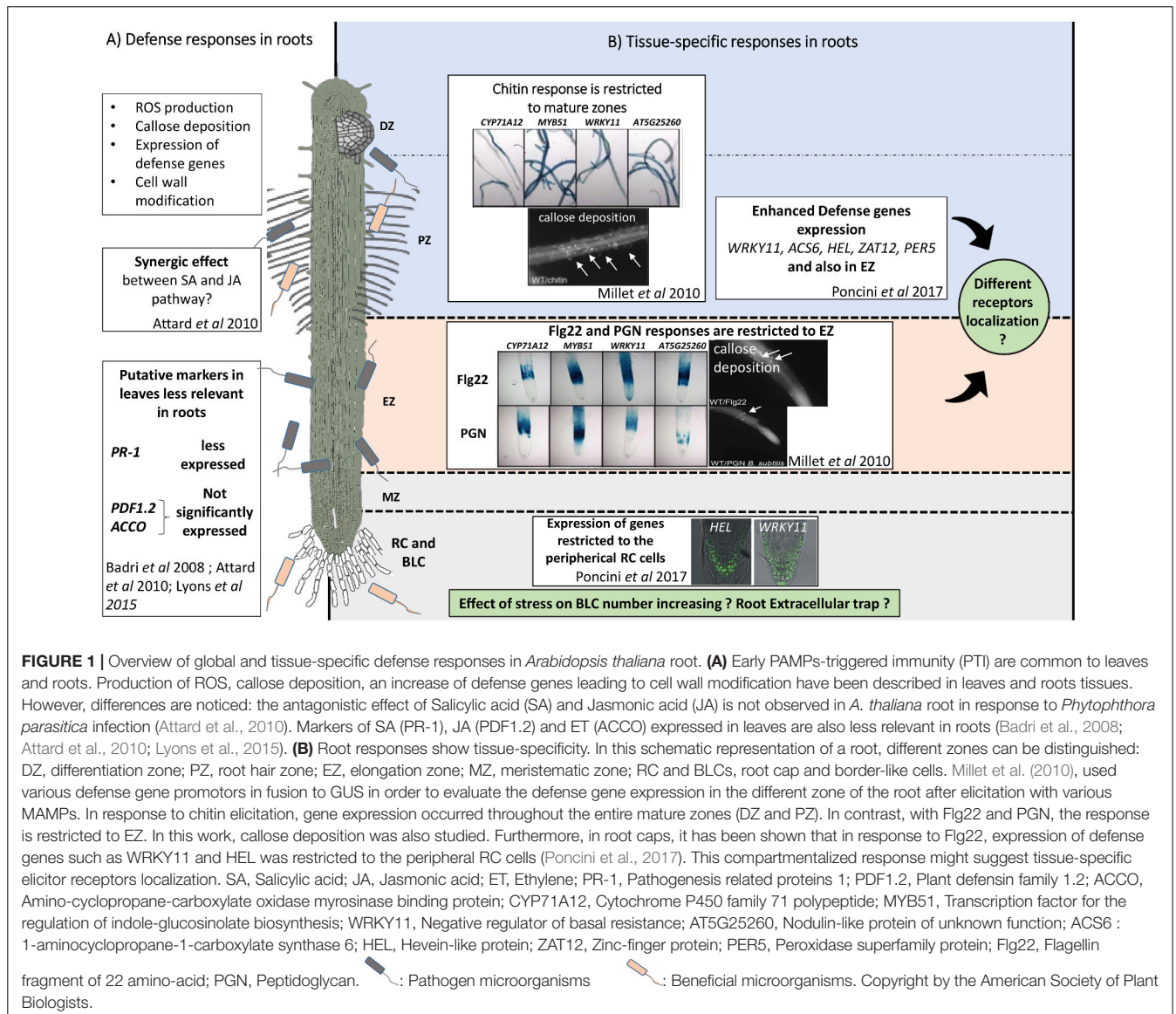


FIGURE 1 | Overview of global and tissue-specific defense responses in *Arabidopsis thaliana* root. **(A)** Early PAMPs-triggered immunity (PTI) are common to leaves and roots. Production of ROS, callose deposition, an increase of defense genes leading to cell wall modification have been described in leaves and roots tissues. However, differences are noticed: the antagonistic effect of Salicylic acid (SA) and Jasmonic acid (JA) is not observed in *A. thaliana* root in response to *Phytophthora parasitica* infection (Attard et al., 2010). Markers of SA (PR-1), JA (PDF1.2) and ET (ACCO) expressed in leaves are also less relevant in roots (Badri et al., 2008; Attard et al., 2010; Lyons et al., 2015). **(B)** Root responses show tissue-specificity. In this schematic representation of a root, different zones can be distinguished: DZ, differentiation zone; PZ, root hair zone; EZ, elongation zone; MZ, meristematic zone; RC and BLCs, root cap and border-like cells. Millet et al. (2010), used various defense gene promoters in fusion to GUS in order to evaluate the defense gene expression in the different zone of the root after elicitation with various MAMPs. In response to chitin elicitation, gene expression occurred throughout the entire mature zones (DZ and PZ). In contrast, with Flg22 and PGN, the response is restricted to EZ. In this work, callose deposition was also studied. Furthermore, in root caps, it has been shown that in response to Flg22, expression of defense genes such as WRKY11 and HEL was restricted to the peripheral RC cells (Poncini et al., 2017). This compartmentalized response might suggest tissue-specific elicitor receptors localization. SA, Salicylic acid; JA, Jasmonic acid; ET, Ethylene; PR-1, Pathogenesis related proteins 1; PDF1.2, Plant defensin family 1.2; ACCO, Amino-cyclopropane-carboxylate oxidase myrosinase binding protein; CYP71A12, Cytochrome P450 family 71 polypeptide; MYB51, Transcription factor for the regulation of indole-glucosinolate biosynthesis; WRKY11, Negative regulator of basal resistance; AT5G25260, Nodulin-like protein of unknown function; ACS6 : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6; HEL, Hevein-like protein; ZAT12, Zinc-finger protein; PER5, Peroxidase superfamily protein; Flg22, Flagellin fragment of 22 amino-acid; PGN, Peptidoglycan. : Pathogen microorganisms : Beneficial microorganisms. Copyright by the American Society of Plant Biologists.

Pisatin concentration is however significantly lower in the more susceptible elongation zone (EZ) (Cannesan et al., 2011). The greater susceptibility of the root EZ is explained by the youth of elongating cells which have not fully developed protective tissue such as their epidermis barrier (Wyrsh et al., 2015). Thus, innate immunity responses appeared to be enhanced in EZs as compared to the other parts of the root system (Millet et al., 2010; Poncini et al., 2017). In *Arabidopsis* roots, Flg22 or PGN are elicitors derived from bacteria that trigger callose deposition in the EZ (Millet et al., 2010; Figure 1B). The expression of defense genes such as the cytochrome P450 *CYP71A12* and the transcription factor MYB51, that are involved in the biosynthesis compound toxic to pathogens, are activated after Flg22 treatment in EZs (Millet et al., 2010). These genes are also expressed in response to root-knot nematodes in EZs (Teixeira et al., 2016). In contrast, in response to chitin, an elicitor derived from fungal

cell walls, *CYP71A12*, *MYB51* expression and callose deposition was observed in all mature parts of the RZ (Millet et al., 2010). In addition, early MAMP-signaling marker WRKY11 and the ROS markers ZAT12 and PER5 were also reported to be mainly induced in the EZ and DZ (Poncini et al., 2017). Indeed, YFP marker fusion constructs expressed in the EZ were only visible in the epidermal layer without elicitor treatment and expressed in the central tissues few hours after elicitor treatment (e.g., pMYB51::YFP_N and pZAT12::YFP_N). Whereas in the root tip, YFP fluorescence was restricted to the peripheral root cap cells (e.g., pWRKY11::YFP_N and pHEL::YFP_N) (Poncini et al., 2017). These data suggest that PTI induction can be restricted to specific root tissue zones that are critical for successful infection by invading pathogen (Millet et al., 2010; Teixeira et al., 2016).

Newly generated tissues are preferential zones of infection by soil pathogens. However, most of the nascent root tips

remain uninfected even if other root tissues develop lesions (Wen et al., 2006). Indeed, the root tip inoculated with *Nectria haematococca* remained devoid of infection whereas the EZ was almost entirely infected. (Gunawardena and Hawes, 2002). This root tip tissue-specific resistance is correlated spatially with the presence of border cells (BCs) surrounding the root cap periphery (Driouich et al., 2013; Koroney et al., 2016). These BCs, which are individually separated from the root tip immediately after water contact (Hawes et al., 2000) are embedded in a thick mucilage and respond to both biotic (Driouich et al., 2013) and abiotic stresses (Miyasaka and Hawes, 2001; Cai et al., 2011). Several studies have demonstrated that BCs act as a physical and chemical barrier to fungi (Gunawardena and Hawes, 2002; Cannesan et al., 2011), bacteria (Hawes and Pueppke, 1987), zoospores (Goldberg et al., 1989), and nematodes infection (Zhao et al., 2000). These studies suggest a special role for the root cap and associated tissues in plant defense (Hawes et al., 2016; Tran T.M. et al., 2016). Therefore, it was suggested that BCs act as “sentries” providing specialized protection of the root cap and root meristems (Plancot et al., 2013). Root BCs were shown to attract pathogens such as oomycetes and nematodes (*via* chemotaxis) in order to subsequently neutralize them using antimicrobial mucilage traps (Zhao et al., 2000; Hawes et al., 2016). It is reported that root BCs attract zoospores (Zhao et al., 2000) to stimulate their germination and thereby blocking their mycelial growth by so doing preventing root infection from happening (Hawes et al., 2016). The interaction between root BCs and soil-borne microbes varies according to the plant species and the micro-organisms present. For example, root BCs from pea (*Pisum sativum*) are colonized by *Agrobacterium tumefaciens* whereas BCs from oat produce a mucilage which blocks and excludes bacteria from the BCs surface (Hawes et al., 2000). In addition, BCs were shown to synthesize and to secrete antimicrobial compounds (Driouich et al., 2013) such as phytoalexins, glycans/polymers and defense proteins that are able to fight against pathogens (Hawes et al., 2016). Arabinogalactan proteins (AGP) extracted from pea root cap and BCs prevent *in vitro* zoospores germination of *A. euteiches*. This could explain the reduced infection of the root cap that is observed compared to other RZs (Cannesan et al., 2012). Furthermore, the presence of extracellular DNA was reported within the mucilage surrounding the root BCs forming a Root Extracellular Trap (RET) by analogy with the Neutrophil Extracellular Trap (NET) in mammals (Driouich et al., 2013; Hawes et al., 2016; Tran T.M. et al., 2016). Additionally, it was demonstrated that BCs are also implicated in active induced defense strategies. Pathogens and/or elicitors cause an increase in the number of the BCs released into the rhizosphere as well as an enhanced secretion of metabolites by these cells (Curlango-Rivera et al., 2010; Cannesan et al., 2011). As a consequence of these studies, one can speculate that BCs activate defense mechanisms in greater intensity even before roots perceive MAMPS.

Interestingly, the plant model *A. thaliana* releases atypical BCs that do not separate individually but remain attached to each other and to the root cap. Due to this particular organization and mode of detachment, these cells are termed root border-like cells (BLCs). BLCs have recently been implicated in root defense but

their functioning *in planta* is still unknown. However, Plancot et al., 2013 demonstrated that BLCs from *A. thaliana* are able to perceive MAMPS and activate defense responses by producing ROS as well as callose deposition. These findings suggest that BLCs are probably specifically involved in root defense in a similar manner to the root BCs.

STIMULATION OF ROOT DEFENSE

The growing need for more sustainable and environmentally safe agricultural practices requires the development of new agronomic approaches. In this context, the use of natural plant defense activators (or PDAs) has emerged as an effective and eco-friendly approach to agriculture (Benhamou and Rey, 2012; Delaunoy et al., 2014). Upon infection, plants can also induce through molecular mechanisms systemic acquire resistance (SAR) in response to biotic and abiotic stimuli. This acquired resistance allows for a faster and stronger induction of defense pathways in response to subsequent pathogens. The plant is therefore “semi-permanently activated” for any further interactions with pathogenic organisms. PDAs are either small compounds or polymers that precondition the plant against further or other diseases and/or pathogen attack. When applied to plants, PDAs mimics pathogen aggression and trigger defense responses similar to those induce upon infection. The efficacy of PDAs relies on their ability to stimulate the plant defense systems mainly. They have little to no direct effect on pathogens themselves and so unlike pesticides avoid generating selective pressures on plant pathogen populations. Although, some PDAs such as chitosan can have some direct effects on certain pathogens (El Hassni et al., 2004) it seems in general this is not commonly observed for most PDAs. Overall PDAs represent good substitutes for conventional pesticides in food crops and have contributed to the growing research area of environmentally friendly “plant care” industries. Many commercially available compounds, when applied as foliar sprays act as inducers of plant defense and their efficiency has been demonstrated in field trial studies (Pichyangkura and Chadchawan, 2015; Malerba and Cerana, 2016). A list of such molecules used in field crops can be found in the review written by Thakur and Sohal (2013). These examples reflect the great interest in PDAs for controlling plant diseases using foliar applications whereas relatively few studies have focused on root treatments. Two main reasons could explain this discrepancy: (1) the complexity and difficulty of PDAs applications in soil and (2) the inability to control root bioavailability toward PDAs.

PDAs have been shown to induce strong and rapid defense responses when applied to roots. Several authors report the enhanced resistance to pathogens after root treatment with PDAs. This enhanced resistance in treated plants can be associated with various cellular and molecular defense responses (Badri et al., 2008; Table 1). Roots responded to several elicitors with ROS production characterized by a rapid release of H₂O₂ observed in the apoplast of various plant species (Zambounis et al., 2012). Activation of several enzyme activities implicated in ROS production (Nars et al., 2013), cell wall reinforcement

TABLE 1 | Elicitors (including signaling compounds, priming agents and PDAs) that have been shown to induce plant defense after root treatment on different plant species.

Elicitors used	Species	Effects on roots	Application method	Reference
PLANT DEFENSE ACTIVATORS				
Acibenzolar-s-methyl(ASM)	<i>Citrus paradisi x Poncirus trifoliata</i>	- Reduced disease severity of citrus canker - PR-proteins production	Soil drench	Francis et al., 2009
Benzothiadiazole (BTH)	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Reduction of nematode infestation	Root-dip or soil drench	Molinari and Baser, 2010
	<i>Gossypium hirsutum</i>	- ROS and PR-proteins production	Seedling immersion	Zambounis et al., 2012
	<i>Fragaria ananassa Duchense</i> <i>Carica papaya</i>	- Comparable <i>Podosphaera aphanis</i> disease control to foliar treatment - Expression of defense-related enzymes - Reduction of <i>Phytophthora palmivora</i> symptoms - Increase of genes expression	Soil drenching Root drench	Pertot et al., 2009 Zhu et al., 2003
Chitin oligosaccharide (CO)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- ROS production - Defense-related gene expression	Not indicated	Nars et al., 2013
Chitosan	<i>Lycopersicon esculentum</i>	- Cell wall reinforcement	Immersion of root fragment	Mandal and Mitra, 2007
	<i>Solanum melongena L.</i>	- Cell wall reinforcement - Increase of phenolic content	Immersion of root fragment	Mandal, 2010
	<i>Medicago truncalata</i>	- ROS production - Induction of defense-associated genes	Not indicated	Nars et al., 2013
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- ROS production - Defense-related gene expression	Not indicated	Nars et al., 2013
	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Phenolic content increase - Reduced symptoms and disease incidence with <i>R. solanacearum</i> - Enzymes activity increase	Hydroponic culture	Mandal et al., 2013
	<i>Phoenix dactylifera L.</i>	- Increase of phenolic content - Changes in <i>Fusarium oxysporum</i> morphology - Increase of enzyme activity	Root injection	El Hassni et al., 2004
	<i>Glycine max</i>	- Reduction of <i>P. pachyrhizi</i> disease severity	Root drench	Srivastava et al., 2011
SIGNALING COMPOUNDS				
Hexanoic acid	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Protection against <i>Botrytis cinerea</i> - callose deposition in leaves	Hydroponic culture	Vicedo et al., 2009
Isonicotinic acid (INA)	<i>Citrus paradisi x Poncirus trifoliata</i>	- Reduced disease severity of citrus canker - PR-proteins production	Soil drench	Francis et al., 2009
Jasmonic acid (JA)	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Phenolic content increase - Enzymes activity increase	Hydroponic culture	Mandal et al., 2013
	<i>Phoenix dactylifera L.</i>	- Enhanced <i>Fusarium oxysporum</i> resistance - Enzymes activity increase - ROS production	Root injection	Jaiti et al., 2009
	<i>Beta vulgaris L.</i>	- Synthesis of PR proteins, regulatory proteins, secondary metabolite biosynthetic enzymes, plant cell wall modifying proteins -Reduction of <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium claviforme</i> and <i>Phoma betae</i> disease symptoms	Submerssion of roots	Fugate et al., 2012, 2017
Methyl salicylate (MeSA)	<i>Solanum melongena L.</i>	- Cell wall reinforcement - Increase of phenolic content	Immersion of root fragment	Mandal, 2010
	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Reduction of nematode infestation	Root-dip or soil drench	Molinari and Baser, 2010
Methyl-Jasmonate (MeJA)	<i>Helianthus annuus L.</i>	- Increase in the activity of ROS implicated enzymes - ROS production (H ₂ O ₂)	Seedling immersion	Parra-Lobato et al., 2009
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- Increase of phytochemical exudation - Gene expression modification	Seedling immersion	Badri et al., 2008

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Elicitors used	Species	Effects on roots	Application method	Reference
	<i>Solanum melongena</i> L.	- Cell wall reinforcement - Increase of phenolic content	Root fragment immersion	Mandal, 2010
	<i>Gossypium hirsutum</i>	- ROS production - PR-proteins production	Seedling immersion	Zambounis et al., 2012
	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	- Anthocyanin accumulation	Roots were soaked in MeJA solution	Góraj-Koniariska et al., 2015
Nitric oxide (NO)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- Increase of phytochemical exudation - Gene expression modification	Seedling immersion	Badri et al., 2008
Salicylic acid (SA)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- Increase of phytochemical exudation - Gene expression modification	Seedling immersion	Badri et al., 2008
	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Increase of the defense enzyme activity - Enhanced resistance against <i>Fusarium oxysporum</i> infection	Root feeding	Mandal et al., 2009
	<i>Solanum melongena</i> L.	- Cell wall reinforcement - Increase of phenolic content	Immersion of root fragment	Mandal, 2010
	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Increase of SA content - Increase of enzymes activity - Reduce of disease symptoms	Hydroponic culture	Mandal et al., 2009
	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Phenolic content increase - Reduced symptoms and disease incidence with <i>R. solanacearum</i> - Enzymes activity increase	Hydroponic culture	Mandal et al., 2013
	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Protection against <i>Botrytis cinerea</i> - Callose deposition in leaves	Hydroponic culture	Vicedo et al., 2009
	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Reduction of nematode infestation	Root-dip or soil drench	Molinari and Baser, 2010
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	- Synthesis of PR-proteins - Induce PR-1 gene expression - Resistance against <i>A. solani</i>	Hydroponic vessels	Spletzer and Enyedi, 1999
PRIMING AGENT				
BABA	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Protection against <i>Botrytis cinerea</i> - Callose deposition in leaves	Hydroponic culture	Vicedo et al., 2009
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- Enhanced resistance to <i>A. brassicicola</i> and <i>P. cucumerina</i> - Enhanced levels of resistance against <i>A. brassicicola</i> and <i>P. cucumerina</i> - Enhanced resistance to <i>P. cucumerina</i> and <i>A. brassicicola</i> - Callose deposition in leaves	Soil drench	Ton and Mauch-Mani, 2004

(Mandal et al., 2009, 2013) and the production of antimicrobial compounds (Francis et al., 2009) have been reported following elicitor application (Table 1). In addition, different metabolic profiles are observed depending on the molecules being tested (Badri et al., 2008). These differences might be explained by cell specific transport mechanism that is induced in relation to the applied PDAs (Badri et al., 2008). For example, SA differentially regulates potassium, calcium, sulfate, ammonium as well as Major Facilitator Superfamily (MFS) and Multi-Antimicrobial Extrusion protein (MATE) transporters (Badri et al., 2008). Whereas MeJA was shown to differentially regulate MATE, an H⁺ ATPase pump, a sugar transporter and a metal transporter (Badri et al., 2008). Thus, root treatment with PDAs result in enhanced resistance to pathogens *via* the SAR mechanisms (Mandal et al., 2009). Furthermore, some molecules act differently as compared to elicitors, these are named priming agents. Activation of defense mechanisms under pathogen free-conditions is energetically taxing and competes with normal plant

growth and development processes (Martinez-Medina et al., 2016). Priming does not induce the direct activation of defense mechanisms but activates defense signal pathways in plant cells without affecting plant growth (Aranega-Bou et al., 2014). For example, inactive mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are typical defense signaling molecules that accumulate during priming. These molecules will be deployed when the plant is exposed to a pathogen or elicitor stress exposure (Beckers et al., 2009; Conrath, 2011) leading to a faster defense response. Beta-aminobutyric acid (BABA) is a well-known priming agent that potentiates (i.e., primes) SA-dependent defense responses in leaves and in roots (Zimmerli et al., 2000, Table 1). Elicitors including priming agents can induce both plant SAR. Such treatments can provide good substitute for pesticides in agriculture because they induce defense mechanisms in both treated and non-treated organs (Mandal et al., 2009; Myresiotis et al., 2014). Moreover, it was recently demonstrated that SAR is transmissible through the root system from SAR-triggered plants

to their neighboring plants when treated with benzothiadiazole (BTH) (Song et al., 2010; Cheol Song et al., 2016). These results provide novel insights that can help in the development of new strategies for enhancing root defense capacities and also effectively inducing resistance against plant pathogens in target crops.

METHODS OF APPLICATION AND PDAS EFFICACY

The use of PDAs is often controversial because of their variable efficiency as compared to pesticides which show a direct toxic action on the pathogenic organism. Although PDAs are effective in controlled laboratory conditions, efficacy in the field remains dependent on numerous factors (extrinsic and intrinsic). Variability can often be related directly to the specific PDAs used (**Figure 2A**). Chemical properties of the active compound are non-negligible parameters for efficacy. For example, biological activity of oligosaccharides like laminarin, a well-studied algal elicitor known to induce resistance, is highly dependent on their structures and degree of polymerization (Trouvelot et al., 2014). In addition, a chemical modification of sulphated laminarin, showed that the number of sulfate groups could influence its efficiency to induce plant defense responses (Menard, 2004, 2005; Gauthier et al., 2014). Indeed, the sulfate groups have been shown to protect the molecular core against enzymatic degradation (Menard, 2005). For an extensive review on the structure/activity relationships of carbohydrates see Trouvelot et al. (2014). It is also essential to consider the amount of product provided per plant, the time span for absorption and the application method used. The effect of the particular product used may be different if root uptake occurs from aqueous solutions or from the soil environment (Jakab et al., 2001). For example, induction of resistance to root-knot nematode in tomatoes was enhanced when SA was provided to plants as a soil drench rather than as root-dip (Molinari and Baser, 2010). Whereas the opposite occurred with Acibenzolar-S-methyl (ASM) treatments (Molinari and Baser, 2010; **Table 1**). The use of BABA for example as a soil drench is better tolerated by Arabidopsis without the deleterious effects of high concentrations used in foliar spray format (Jakab et al., 2001). The number of applications should also be considered in relation to the method of application (McGrann et al., 2017). When applied as a soil drench protective resistance lasts much longer as compared to a foliar spray (Francis et al., 2009). Similarly, when BION is applied as a soil drench it is a more efficient in its ability to reduce club-root development in brassica crops compared to applying it as a foliar spray (McGrann et al., 2017). PDAs efficiency (**Figure 2B**) is also dependent on the specific plant species being treated (Walters et al., 2013). In lettuce and cucumber, SA behaves as a phytotoxin by reducing root and shoot length (Pramanik et al., 2000) whereas in tomato, SA potentiates resistance (Molinari and Loffredo, 2006; Molinari and Baser, 2010). Environmental conditions can also affect plant vigor by reducing its capacity to trigger defense mechanisms and thereby impact PDAs bioavailability. A case in point would be leaching of PDAs due to excessive rain (**Figure 2C**). Furthermore,

soil properties and composition modulate the expression level of resistance of the plant and its response to PDAs treatment. For example, in tomato it was demonstrated that when SA was mixed with humic acid the induced resistance was more pronounced than when SA was provided alone (Molinari and Baser, 2010). The rhizosphere is highly enriched in microorganisms that can interact with PDAs in multiple ways. We can hypothesize that some of these microbes can degrade the PDAs *via* hydrolytic enzyme action resulting in a lower quantity that is bioavailable to the plant. However, to date, the role of microorganisms on the PDAs bioavailability remains unclear.

One of the most important challenges to the use of PDAs is their effective assimilation into the host (Paris et al., 2016). It should not be forgotten that the developmental stage of the treated organ, i.e., the root, is also an essential parameter to consider. With age, the root cortex becomes dry, corky and impermeable thus reducing PDAs absorption. To be recognized by the host, a PDAs must first be recognized by a receptor. As for Flg22, these receptors should be located within the inner layer of the endodermis. However, different root tissues can act as natural barriers reducing PDAs efficiency. Once absorbed by root, the molecule can migrate *via* the apoplastic or symplastic pathways. The apoplastic pathway involves cell wall transport. Therefore, the cell wall itself can block natural diffusion of PDAs into the cell and between associated compartments. For example, the exodermis is a thick and suberized barrier, which varies in degree depending on the species and age of the plant concerned. These properties might contribute to reducing the apoplastic transport of water and solutes. In contrast, molecules can migrate in the root using the symplastic pathway that allows for direct transport through the cytoplasm cells *via* the presence of plasmodesmata. Then, molecules can thus migrate from the rhizodermis cells through the cortex into the endodermis. Cortical parenchyma thickness thus have an impact on PDAs efficiency by dispersing molecules and lowering their final concentrations. The endodermis, which is another natural selective barrier, forces molecules to cross *via* symplastic flow due to the presence of casparian strip. The casparian strip is characterized by cell walls containing suberin and sometimes lignin. Due to its cell wall composition, the casparian strip regulates the apoplastic pathways acting as a filter which blocks solutes diffusion between the cortex and the vascular tissues. As a consequence, molecules must cross root endodermal cells. Therefore, the endodermis and the exodermis constitute tight barriers preventing the natural diffusion of molecules. Consequently, receptor localization in the root is at the core of PDAs efficiency in triggering plant defense responses. Therefore, we hypothesize here that these structures might participate in the variable and limited efficacy of PDAs root applications (**Figure 2C**).

CONCLUDING REMARKS AND FUTURE PROSPECTS

To date, root immunity is far from being fully understood and so many questions remain regarding mechanisms at the cellular

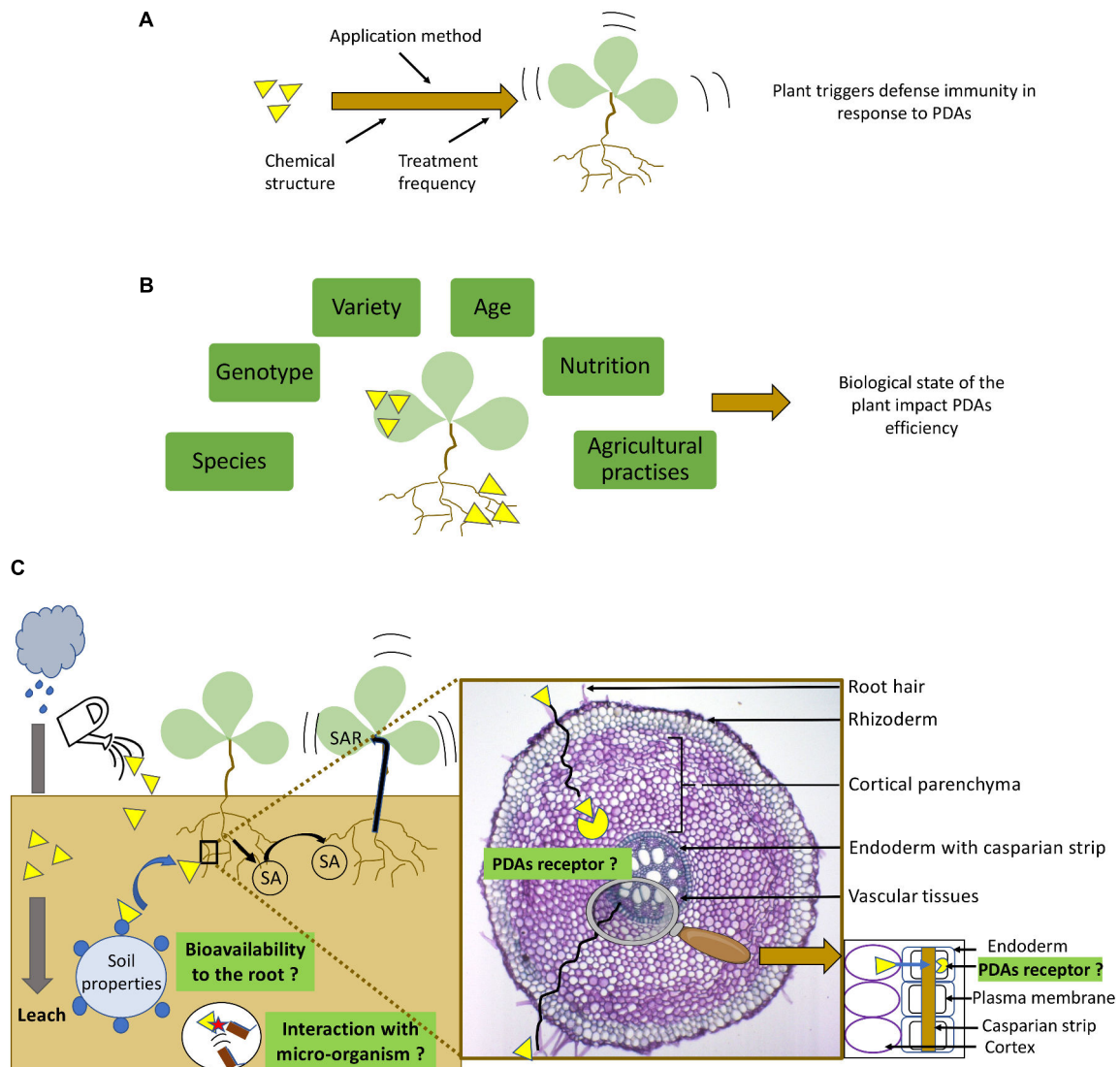


FIGURE 2 | Overview of factors influencing plant defense stimulator (PDA) efficiency in roots. **(A)** PDA efficiency to trigger plant defense depends mainly on their chemical structure, on the application method and on treatment frequency. **(B)** Physiological state of the plant impact PDA efficiency (Walters et al., 2013). PDA effect can be different depending on species, plant genotype/variety, age of the plants and their vigor that depends on nutrition and agricultural practices. **(C)** In the environment, PDA efficiency are dependent of physical and biological factors. For example, rain or irrigation can induce PDA leaching. Soil properties and composition can improve PDA bioavailability (e.g., humic acid) (Molinari and Loffredo, 2006; Molinari and Baser, 2010). Some microorganisms can degrade the PDA via hydrolytic enzymes. When PDA is absorbed by the plant, different root tissue can act as natural barrier reducing PDA efficiency. As a consequence, receptor localization in the root is at the core of PDA efficiency to trigger plant defense responses. However, it has to be noticed that once PDA trigger plant responses, roots can release signal molecules such as salicylic acid (SA) (Cheol Song et al., 2016) to induce plant defense in neighboring plant and in non-treated organs such as leaves consisting in the systemic acquire resistance (SAR). : Plant defense activators : Plant defense activators receptors : salicylic acid : Interaction of plant defense activator with microorganisms

and molecular levels. Interestingly, root defense response to elicitors and/or pathogen attacks exhibit tissue specificity. How such compartmentalization occurs in root defense as compared to leaves is still unclear. Is it due to distinct localization of signal receptors or only due to differences in the amplitude of responses in each tissue? One of the specificities of the root system is to release 100s and 1000s of living BCs in the surrounding environment. Due to their localization at the interface between root and soil, BCs are particularly important in root defense

against pathogens. *A. thaliana* produces atypical BCs, so-called root border like-cells (BLCs) that remain attached to each other. Although the function of root BCs in root defense has been reported for different plant species, the exact function of root BLCs remains to be clearly determined. In *A. thaliana*, root BLCs were shown to perceive MAMPs and display defense mechanisms responses. These findings suggest that root BLCs are key elements in the root defense mechanism. Although BLCs production appear to be constitutively produced, no information

is available regarding their formation and release upon biotic stress. Do they also produce specific defense molecules to form a root extracellular trap? Recent studies have confirmed that environmental signals can override the control of BCs production from pea roots. Such characteristic properties in BCs offers new and highly attractive prospects for the development of new defense strategies against pathogens. Thus, an exogenous treatment could increase the production of BCs and/or BLCs in order to cover and protect the elongation zone known to be the most sensitive to pathogens penetration. In this context, recent studies have demonstrated the potential of PDAs to trigger immunity in roots. Sometimes, such root treatments appear to be more efficient compared to foliar sprays. However, as compared to leaves, the efficiency of such elicitation in roots is dependent on multiple factors that influence the degree of induced resistance achieved, thus explaining why such treatment are still of limited use. Among these factors, soil properties associated with micro-organisms might undoubtedly impact PDAs bioavailability at the root level. Moreover, PDAs have to be recognized by receptors to trigger root defense. Although

studies have reported strong activation of defense mechanisms after PDAs treatment, their receptor localization and mechanisms associated with the compartmentalized of defense in response to the elicitor remain unclear. Understanding the complex regulation of plant defense mechanisms and factors impacting PDAs efficiency is therefore of critical importance in order to develop novel methods for disease prevention and prevention of disease spread.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The co-authors contribute to the writing of the review.

FUNDING

This work was supported by La Région de Normandie, la Structure Fédérative de Recherche "Normandie Végétale" (FED 4277), the University of Rouen Normandy.

REFERENCES

- Aranega-Bou, P., de la O Leyva, M., Finiti, I., García-Agustín, P., and González-Bosch, C. (2014). Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Front. Plant Sci.* 5:488. doi: 10.3389/fpls.2014.00488
- Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre, N., and Keller, H. (2010). The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol.* 187, 449–460. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03272.x
- Augustine, R., and Bisht, N. C. (2015). Biotic elicitors and mechanical damage modulate glucosinolate accumulation by co-ordinated interplay of glucosinolate biosynthesis regulators in polyploid *Brassica juncea*. *Phytochemistry* 117, 43–50. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.05.015
- Badri, D. V., Loyola-Vargas, V. M., Du, J., Stermitz, F. R., Broeckling, C. D., Iglesias-Andreu, L., et al. (2008). Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytol.* 179, 209–223. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02458.x
- Balmer, D., de Papajewski, D. V., Planchamp, C., Glauser, G., and Mauch-Mani, B. (2013). Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. *Plant J.* 74, 213–225. doi: 10.1111/tbj.12114
- Balmer, D., and Mauch-Mani, B. (2013). More beneath the surface? Root versus shoot antifungal plant defenses. *Front. Plant Sci.* 4:256. doi: 10.3389/fpls.2013.00256
- Beck, M., Wyrshch, I., Strutt, J., Wimalasekera, R., Webb, A., Boller, T., et al. (2014). Expression patterns of flagellin sensing 2 map to bacterial entry sites in plant shoots and roots. *J. Exp. Bot.* 65, 6487–6498. doi: 10.1093/jxb/eru366
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., et al. (2009). Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online* 21, 944–953. doi: 10.1105/tpc.108.062158
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., and Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1044–1051. doi: 10.1590/S1415-47572012000600020
- Benhamou, N., and Rey, P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes?: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. II. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection* 92, 24–35. doi: 10.7202/1013299ar
- Bigeard, J., Colcombet, J., and Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant* 8, 521–539. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.022
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Cai, M.-Z., Wang, F.-M., Li, R.-F., Zhang, S.-N., Wang, N., and Xu, G.-D. (2011). Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. *J. Inorg. Biochem.* 105, 966–971. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.04.004
- Caldwell, D., Kim, B.-S., and Iyer-Pascuzzi, A. S. (2017). *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology* 107, 528–536. doi: 10.1094/PHYTO-09-16-0353-R
- Cannesan, M. A., Durand, C., Burel, C., Gangneux, C., Lerouge, P., Ishii, T., et al. (2012). Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination. *Plant Physiol.* 159, 1658–1670. doi: 10.1104/pp.112.198507
- Cannesan, M. A., Gangneux, C., Lanoue, A., Giron, D., Laval, K., Hawes, M., et al. (2011). Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Ann. Bot.* 108, 459–469. doi: 10.1093/aob/mcr177
- Cheol Song, G., Sim, H.-J., Kim, S.-G., and Ryu, C.-M. (2016). Root-mediated signal transmission of systemic acquired resistance against above-ground and below-ground pathogens. *Ann. Bot.* 118, 821–831. doi: 10.1093/aob/mcw152
- Chinchilla, D. (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell Online* 18, 465–476. doi: 10.1105/tpc.105.036574
- Choi, H. W., and Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol.* 16:232. doi: 10.1186/s12870-016-0921-2
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* 16, 524–531. doi: 10.1016/j.tplants.2011.06.004
- Curlango-Rivera, G., Duclos, D. V., Eboho, J. J., and Hawes, M. C. (2010). Transient exposure of root tips to primary and secondary metabolites: impact on root growth and production of border cells. *Plant Soil* 332, 267–275. doi: 10.1007/s11104-010-0291-8
- De Lorenzo, G., Ferrari, S., Cervone, F., and Okun, E. (2018). Extracellular DAMPs in plants and mammals: immunity, tissue damage and repair. *Trends Immunol.* doi: 10.1016/j.it.2018.09.006 [Epub ahead of print].
- Delaunais, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., et al. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4837–4846. doi: 10.1007/s11356-013-1841-4
- Dowd, C., Wilson, I. W., and McFadden, H. (2004). Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with

- Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 654–667. doi: 10.1094/MPML.2004.17.6.654
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Vicré-Gibouin, M., and Hawes, M. (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 489–495. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.010
- El Hassni, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Barka, E. A., and El Hadrami, I. (2004). Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 195–204.
- Francis, M. I., Redondo, A., Burns, J. K., and Graham, J. H. (2009). Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 283–292. doi: 10.1007/s10658-008-9415-x
- Fugate, K. K., de Oliveira, L. S., Ferrareze, J. P., Bolton, M. D., Deckard, E. L., and Finger, F. L. (2017). Jasmonic acid causes short- and long-term alterations to the transcriptome and the expression of defense genes in sugarbeet roots. *Plant Gene* 9, 50–63. doi: 10.1016/j.plgene.2016.12.006
- Fugate, K. K., Ferrareze, J. P., Bolton, M. D., Deckard, E. L., and Campbell, L. G. (2012). Postharvest jasmonic acid treatment of sugarbeet roots reduces rot due to *Botrytis cinerea*, *Penicillium claviforme*, and *Phoma betae*. *Postharvest Biol. Technol.* 65, 1–4. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.10.005
- Gauthier, A., Trouvelot, S., Kelloniemi, J., Frettinger, P., Wendehenne, D., Daire, X., et al. (2014). The sulfated laminarin triggers a stress transcriptome before priming the SA- and ROS-dependent defenses during grapevine's induced resistance against *Plasmopara viticola*. *PLoS One* 9:e88145. doi: 10.1371/journal.pone.0088145
- Goldberg, N. P., Hawes, M. C., and Stanghellini, M. E. (1989). Specific attraction to and infection of cotton root cap cells by zoospores of *Pythium dissotocum*. *Can. J. Bot.* 67, 1760–1767. doi: 10.1139/b89-223
- Gómez-Gómez, L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol. Immunol.* 41, 1055–1062. doi: 10.1016/j.molimm.2004.06.008
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5, 1003–1011. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80265-8
- Góraj-Koniarska, J., Stochmal, A., Oleszek, W., Młodoch, J., and Saniewski, M. (2015). Elicitation of anthocyanin production in roots of *Kalanchoe blossfeldiana* by methyl jasmonate. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 57, 141–148. doi: 10.1515/abcsb-2015-0007
- Gotté, M., Bénard, N., Kiefer-Meyer, M.-C., Jaber, R., Moore, J. P., Vicré-Gibouin, M., et al. (2016). Endoplasmic reticulum body-related gene expression in different root zones of *Arabidopsis* isolated by laser-assisted microdissection. *Plant Genome* 9. doi: 10.3835/plantgenome2015.08.0076
- Gotté, M., Ghosh, R., Bernard, S., Nguema-Ona, E., Vicré-Gibouin, M., Hara-Nishimura, I., et al. (2015). Methyl jasmonate affects morphology, number and activity of endoplasmic reticulum bodies in *Raphanus sativus* root cells. *Plant Cell Physiol.* 56, 61–72. doi: 10.1093/pcp/pcu141
- Gunawardena, U., and Hawes, M. C. (2002). Tissue specific localization of root infection by fungal pathogens: role of root border cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 1128–1136. doi: 10.1094/MPML.2002.15.11.1128
- Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H. D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., et al. (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 282, 32338–32348. doi: 10.1074/jbc.M704886200
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., and Schulze-Lefert, P. (2017). Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 565–589. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035623
- Hawes, M., Allen, C., Turgeon, B. G., Curlango-Rivera, G., Minh Tran, T., Huskey, D. A., et al. (2016). Root border cells and their role in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 143–161. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100140
- Hawes, M. C., Gunawardena, U., Miyasaka, S., and Zhao, X. (2000). The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sci.* 5, 128–133. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01556-9
- Hawes, M. C., and Pueppke, S. G. (1987). Correlation between binding of *Agrobacterium tumefaciens* by root cap cells and susceptibility of plants to crown gall. *Plant Cell Rep.* 6, 287–290. doi: 10.1007/BF00272000
- Henry, G., Thonart, P., and Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16, 257–268.
- Iven, T., König, S., Singh, S., Braus-Stromeier, S. A., Bischoff, M., Tietze, L. F., et al. (2012). Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol. Plant* 5, 1389–1402. doi: 10.1093/mp/sss044
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Lipka, V., et al. (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiol.* 156, 726–740. doi: 10.1104/pp.111.17.6446
- Jaiti, F., Verdeil, J. L., and El Hadrami, I. (2009). Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenol oxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 84–90. doi: 10.1016/j.pmp.2009.09.005
- Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J.-P., et al. (2001). β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 29–37. doi: 10.1023/A:1008730721037
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Klarzynski, O., and Fritig, B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci.* 324, 953–963. doi: 10.1016/S0764-4469(01)01371-3
- Koroney, A. S., Plasson, C., Pawlak, B., Sidikou, R., Driouich, A., Menu-Bouaouiche, L., et al. (2016). Root exudate of *Solanum tuberosum* is enriched in galactose-containing molecules and impacts the growth of *Pectobacterium atrosepticum*. *Ann. Bot.* 118, 797–808. doi: 10.1093/aob/mcw128
- Lai, Z., and Mengiste, T. (2013). Genetic and cellular mechanisms regulating plant responses to necrotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 505–512. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.014
- Lyons, R., Stiller, J., Powell, J., Rusu, A., Manners, J. M., and Kazan, K. (2015). *Fusarium oxysporum* triggers tissue-specific transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 10:e0121902. doi: 10.1371/journal.pone.0121902
- Malerba, M., and Cerana, R. (2016). Chitosan effects on plant systems. *Int. J. Mol. Sci.* 17:E996. doi: 10.3390/ijms17070996
- Mandal, S. (2010). Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 8038–8047. doi: 10.5897/AJB10.984
- Mandal, S., Kar, I., Mukherjee, A. K., and Acharya, P. (2013). Elicitor-induced defense responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. *Sci. World J.* 2013, 1–9. doi: 10.1155/2013/561056
- Mandal, S., Mallek, N., and Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 642–649. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.03.001
- Mandal, S., and Mitra, A. (2007). Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 201–209. doi: 10.1016/j.pmp.2008.02.003
- Marcel, S., Sawers, R., Oakeley, E., Angliker, H., and Paszkowski, U. (2010). Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 22, 3177–3187. doi: 10.1105/tpc.110.078048
- Martínez-Ballesta, M., Moreno, D., and Carvajal, M. (2013). The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in *Brassica*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11607–11625. doi: 10.3390/ijms140611607
- Martínez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M., Pozo, M. J., et al. (2016). Recognizing plant defense priming. *Trends Plant Sci.* 21, 818–822. doi: 10.1016/j.tplants.2016.07.009
- Matsushima, R. (2002). An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130, 1807–1814. doi: 10.1104/pp.009464
- McGrann, G. R. D., Yoxall, T., Paterson, L. J., Taylor, J. M. G., Birmipilis, I. G., Walters, D. R., et al. (2017). Control of light leaf spot and clubroot in brassica crops using defence elicitors. *Eur. J. Plant Pathol.* 148, 447–461. doi: 10.1007/s10658-016-1103-7
- Menard, R. (2004). β -1,3 glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 16, 3020–3032. doi: 10.1105/tpc.104.024968

- Menard, R. (2005). Defense and resistance-inducing activities in tobacco of the sulfated β -1,3 glucan PS3 and its synergistic activities with the unsulfated molecule. *Plant Cell Physiol.* 46, 1964–1972. doi: 10.1093/pcp/pci212
- Mendes, R., Garbeva, P., and Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 634–663. doi: 10.1111/1574-6976.12028
- Millet, Y. A., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D., et al. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell* 22, 973–990. doi: 10.1105/tpc.109.069658
- Miyasaka, S. C., and Hawes, M. C. (2001). Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiol.* 125, 1978–1987. doi: 10.1104/pp.125.4.1978
- Molinari, S., and Baser, N. (2010). Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. *Crop Prot.* 29, 1354–1362. doi: 10.1016/j.cropro.2010.07.012
- Molinari, S., and Loffredo, E. (2006). The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 69–78. doi: 10.1016/j.pmp.2006.07.001
- Myresiotis, C. K., Vryzas, Z., and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2014). Enhanced root uptake of acibenzolar-S-methyl (ASM) by tomato plants inoculated with selected *Bacillus* plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Appl. Soil Ecol.* 77, 26–33. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.01.005
- Nakano, R. T., Pislewski-Bednarek, M., Yamada, K., Edger, P. P., Miyahara, M., Kondo, M., et al. (2017). PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 89, 204–220. doi: 10.1111/tpj.13377
- Nakano, R. T., Yamada, K., Bednarek, P., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2014). ER bodies in plants of the *Brassicales* order: biogenesis and association with innate immunity. *Front. Plant Sci.* 5:73. doi: 10.3389/fpls.2014.00073
- Nars, A., Rey, T., Lafitte, C., Vergnes, S., Amatya, S., Jacquet, C., et al. (2013). An experimental system to study responses of *Medicago truncatula* roots to chitin oligomers of high degree of polymerization and other microbial elicitors. *Plant Cell Rep.* 32, 489–502. doi: 10.1007/s00299-012-1380-3
- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., and Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 4:139. doi: 10.3389/fpls.2013.00139
- Okubara, P. A., and Paulitz, T. C. (2005). “Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective,” in *Root Physiology: from Gene to Function*, eds H. Lambers and T. D. Colmer (Dordrecht: Springer), 215–226. doi: 10.1007/1-4020-4099-7_11
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., and Sharon, A. (2003). Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1695–1701. doi: 10.1128/AEM.69.3.1695-1701.2003
- Papadopoulou, G. V., Maedicke, A., Grosser, K., van Dam, N. M., and Martínez-Medina, A. (2018). Defence signalling marker gene responses to hormonal elicitation differ between roots and shoots. *AoB Plants* 10:ly031. doi: 10.1093/aobpla/ply031
- Paris, F., Krzyaniak, Y., Gauvrit, C., Jamois, F., Domergue, F., Joubès, J., et al. (2016). An ethoxylated surfactant enhances the penetration of the sulfated laminarin through leaf cuticle and stomata, leading to increased induced resistance against grapevine downy mildew. *Physiol. Plant.* 156, 338–350. doi: 10.1111/ppl.12394
- Parra-Lobato, M. C., Fernandez-Garcia, N., Olmos, E., Alvarez-Tinaut, M. C., and Gómez-Jiménez, M. C. (2009). Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sunflower seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 66, 9–17. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.01.002
- Perrine-Walker, F. M., Prayitno, J., Rolfe, B. G., Weinman, J. J., and Hocart, C. H. (2007). Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *J. Exp. Bot.* 58, 3343–3350. doi: 10.1093/jxb/erm181
- Pertot, I., Fiamingo, F., and Elad, Y. (2009). Evaluation of disease control provided by the sar-inducer benzothiadiazole (bion) in strawberry. *Acta Hort.* 807, 739–744. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.807.111
- Pichyangkura, R., and Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 49–65. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.031
- Plancot, B., Santaella, C., Jaber, R., Kiefer-Meyer, M. C., Follet-Gueye, M.-L., Leprince, J., et al. (2013). Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiol.* 163, 1584–1597. doi: 10.1104/pp.113.222356
- Poncini, L., Wyrsh, I., Dénervaud Tendon, V., Vorley, T., Boller, T., Geldner, N., et al. (2017). In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS One* 12:e0185808. doi: 10.1371/journal.pone.0185808
- Pramanik, M. H. R., Nagai, M., Asao, T., and Matsui, Y. (2000). Effects of temperature and photoperiod on phytotoxic root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) in hydroponic culture. *J. Chem. Ecol.* 26, 1953–1967. doi: 10.1023/A:1005509110317
- Ribeiro, J. (2006). The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes. *J. Exp. Bot.* 57, 2025–2035. doi: 10.1093/jxb/erj153
- Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20, 537–542. doi: 10.1101/gad.366506
- Sesma, A., and Osbourn, A. E. (2004). The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431, 582–586. doi: 10.1038/nature02880
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., and Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends Microbiol.* 12, 386–393. doi: 10.1016/j.tim.2004.06.008
- Song, Y. Y., Zeng, R. S., Xu, J. F., Li, J., Shen, X., and Yihdego, W. G. (2010). Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal networks. *PLoS One* 5:e13324. doi: 10.1371/journal.pone.0013324
- Spletzer, M. E., and Enyedi, A. J. (1999). Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* 89, 722–727. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.9.722
- Srivastava, P., George, S., Marois, J. J., Wright, D. L., and Walker, D. R. (2011). Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean: effects on growth and development. *Crop Prot.* 30, 726–732. doi: 10.1016/j.cropro.2011.02.023
- Sukno, S. A., Garcia, V. M., Shaw, B. D., and Thon, M. R. (2008). Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 823–832. doi: 10.1128/AEM.01165-07
- Teixeira, M. A., Wei, L., and Kaloshian, I. (2016). Root-knot nematodes induce pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* roots. *New Phytol.* 211, 276–287. doi: 10.1111/nph.13893
- Thakur, M., and Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochem.* 2013, 1–10. doi: 10.1155/2013/762412
- Ton, J., and Mauch-Mani, B. (2004). β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant J.* 38, 119–130. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2004.02028.x
- Torsvik, V., and Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240–245. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00324-7
- Tran, T., Chen, S., and Wang, X. (2016). Root assays to study pattern-triggered immunity in plant-nematode interactions. *Eur. J. Plant Pathol.* 147, 955–961. doi: 10.1007/s10658-016-1053-0
- Tran, T. M., MacIntyre, A., Hawes, M., and Allen, C. (2016). Escaping underground nets: extracellular DNases degrade plant extracellular traps and contribute to virulence of the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* 12:e1005686. doi: 10.1371/journal.ppat.1005686
- Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., et al. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front. Plant Sci.* 5:592. doi: 10.3389/fpls.2014.00592
- Tytgat, T. O. G., Verhoeven, K. J. F., Jansen, J. J., Raaijmakers, C. E., Bakx-Schotman, T., McIntyre, L. M., et al. (2013). Plants know where it hurts: root and shoot jasmonic acid induction elicit differential responses in *Brassica oleracea*. *PLoS One* 8:e65502. doi: 10.1371/journal.pone.0065502
- Vicedo, B., Flors, V., de la O Leyva, M., Finiti, I., Kravchuk, Z., Real, M. D., et al. (2009). Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato

- plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1455–1465. doi: 10.1094/MPMI-22-11-1455
- Walters, D. R., Ratsep, J., and Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* 64, 1263–1280. doi: 10.1093/jxb/ert026
- Watt, M., Silk, W. K., and Passioura, J. B. (2006). Rates of root and organism growth, soil conditions, and temporal and spatial development of the rhizosphere. *Ann. Bot.* 97, 839–855. doi: 10.1093/aob/mcl028
- Wen, F., VanEtten, H. D., Tsapralis, G., and Hawes, M. C. (2006). Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiol.* 143, 773–783. doi: 10.1104/pp.106.091637
- Wojtasik, W., Kulma, A., Kostyn, K., and Szopa, J. (2011). The changes in pectin metabolism in flax infected with *Fusarium*. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 862–872. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.03.002
- Wyrsh, I., Domínguez-Ferreras, A., Geldner, N., and Boller, T. (2015). Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in *Arabidopsis fls2* mutants. *New Phytol.* 206, 774–784. doi: 10.1111/nph.13280
- Zambounis, A. G., Kalamaki, M. S., Tani, E. E., Paplomatas, E. J., and Tsaftaris, A. S. (2012). Expression analysis of defense-related genes in cotton (*Gossypium hirsutum*) after *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* infection and following chemical elicitation using a salicylic acid analog and methyl jasmonate. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30, 225–234. doi: 10.1007/s11105-011-0335-0
- Zhang, Y., Lubberstedt, T., and Xu, M. (2013). The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *J. Genet. Genomics* 40, 23–35. doi: 10.1016/j.jgg.2012.11.003
- Zhao, X., Schmitt, M., and Hawes, M. C. (2000). Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior. *Phytopathology* 90, 1239–1245. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.11.1239
- Zhu, Y. J., Qiu, X., Moore, P. H., Borth, W., Hu, J., Ferreira, S., et al. (2003). Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63, 237–248. doi: 10.1016/j.pmpp.2004.03.003
- Zimmerli, L., Jakab, G., Mettraux, J.-P., and Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12920–12925. doi: 10.1073/pnas.230416897
- Zipfel, C., and Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 353–360. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.004

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Chuberre, Plancot, Driouich, Moore, Bardor, Gügi and Vicié. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Les stimulateurs de défenses des plantes (SDP) : une méthode de lutte alternative pour la protection des cultures

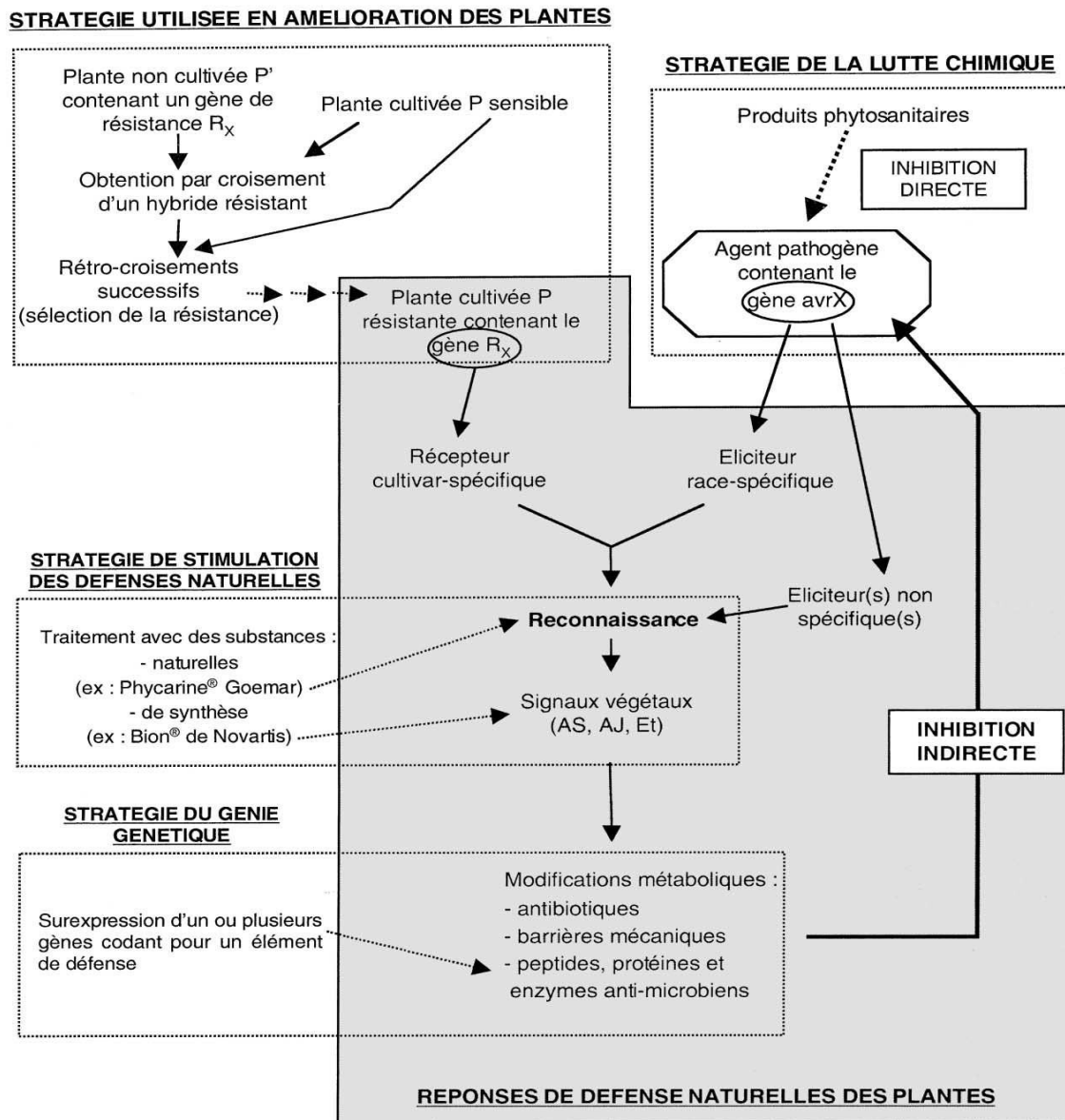


Figure 21 : Stratégies employées pour la protection des plantes.

La lutte chimique permet l'inhibition directe de l'organisme pathogène en ciblant une ou plusieurs cibles (blocage de la division cellulaire, inhibition d'activités enzymatiques, inhibiteurs métaboliques) tandis que l'amélioration génétique consiste à sélectionner des gènes de résistance (gène R_x) par croisements dirigés et sélection des meilleures variétés. L'amélioration génétique peut également inclure la surexpression d'un gène codant pour un élément de défense. Lorsqu'un organisme pathogène sera détecté par la plante *via* les éliciteurs spécifiques (gène avrX), la reconnaissance gène pour gène (Gène R_x/avrX) pourra mener au déclenchement d'une résistance spécifique appelée Effector-Triggered Immunity (ETI). Une autre méthode consiste en la stimulation des défenses naturelles de la plante *via* utilisation d'éliciteur (Bion®). Ces éliciteurs miment l'attaque d'un organisme pathogène et induisent les mécanismes de reconnaissance et de signalisation à l'origine du déclenchement de modifications métaboliques (renforcement des barrières mécaniques, production d'antibiotique). L'ensemble de ces réponses immunitaires pourra mener à l'induction d'une résistance plus générale appelée Pattern-Triggered Immunity (PTI). Rendre la plante résistante permettra l'inhibition indirecte de l'organisme pathogène (Klarzynski et Fritig 2001).

Plusieurs stratégies sont utilisées pour protéger les plantes contre des bio-agresseurs (**figure 21**). L'amélioration génétique consiste à sélectionner des gènes de résistance par croisements dirigés et la sélection des meilleures variétés. Ces gènes de résistance sont directement impliqués dans la résistance déclenchée (ETI) de la plante. La lutte chimique permet l'inhibition directe des organismes pathogènes des plantes en ciblant une ou plusieurs cibles de l'agent pathogène (blocage de la division cellulaire, inhibition de l'activité enzymatique...). Toutefois ces deux méthodes de lutte deviennent de moins en moins efficace en raison de l'apparition de phénomène de résistance chez les organismes pathogènes. Une autre méthode consiste à stimuler les défenses de la plante par utilisation d'éliciteur. Cette technique va permettre l'activation de la résistance basale (PTI) en l'absence de pathogène. Le terme éliciteur a longtemps été utilisé pour désigner toute molécule issue d'un organisme pathogène et susceptible d'induire la production de phytoalexines (Darvill et Albersheim 1984). Cependant, suite à la découverte de nouvelles molécules comme les DAMPs capables d'induire d'autres réactions de défense, le terme a dû être élargi. Les éliciteurs font partie d'un groupe très diversifié et désignent toute molécule susceptible d'induire une réaction de défense chez la plante (M/P/DAMPs ; SA, JA). Toutefois, une autre catégorie d'éliciteurs destinés à l'agriculture suscite l'intérêt de nombreuses recherches : ce sont les stimulateurs de défense des plantes (SDP). Dans un contexte de réductions des intrants, l'utilisation de ces molécules, qui concilient environnement et agriculture apparaissent comme particulièrement attrayantes.

1. Les SDP : définition et mode d'action

Les SDP sont des éliciteurs utilisables pour induire une résistance chez les plantes cultivées (RMT élicitra 2018). Les SDP désignent toute substance (naturelle ou de synthèse) ou tout micro-organisme qui, appliqué à une plante, est capable de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée face à des maladies ou des ravageurs (RMT élicitra 2018). Contrairement aux pesticides, les SDP n'ont pas d'action directe sur les organismes pathogènes. Ils vont au contraire, mimer l'action d'une attaque pathogène afin d'induire la résistance basale (PTI) de la plante. Les SDP induisent, dans la plante, des changements métaboliques identiques à ceux naturellement activés lors d'une attaque pathogène (flux d'ions ou ROS, induction de l'expression de gènes) et ils contribuent, de ce fait, à la mise en place des défenses. La découverte de ces molécules donne lieu à l'émergence d'un nouveau concept : celui de la vaccination végétale. La vaccination végétale consiste à mettre en contact la plante avec une molécule capable d'activer ses défenses. La plante ainsi « vaccinée » sera plus rapide dans la mise en place de ses défenses lors d'une attaque pathogène ultérieure.

Les SDP se classent en quatre grandes catégories (RMT élicitra 2018) :

1. Les SDP « hormonaux » qui peuvent apporter jusqu'à 90% de protection. L'un des plus utilisés est le benzothiadiazole (BTH) commercialisé sous le nom de BION®. C'est un analogue de SA. D'autres hormones telles que le méthyl-jasmonate et le méthyl-salicylate induisent également un état de résistance aux plantes.
2. Les MAMPs/DAMPs purifiés, comme la laminarine (β -glucanes), le chitosane et les oligopeptides commercialisés sous le nom de Vacciplant®, Chitoprotect® et Bastid® respectivement.
3. Les extraits de plantes/algues (extrait d'*Ascophyllum nodosum*, extrait de Fenugrec) ou de microorganismes (*Bacillus subtilis*) dont le ou les principes actifs ne sont pas bien encore identifiés.
4. Les composés inorganiques (phosphonate de potassium)

Il est également important de noter qu'il existe une catégorie particulière de SDP nommés les potentialisateurs. Les potentialisateurs, tel que l'acide β -aminobutyrique (BABA), permettent l'induction des premières étapes de résistance sans déclencher la production de molécules spécialisées dans la défense des plantes. Leur application engendre essentiellement une accumulation de MAPKs. La plante se trouve alors dans un état d'alerte ce qui lui permet de mobiliser son énergie pour son développement plutôt que pour la mise en place des mécanismes de défense inutile à ce stade. En revanche, lors de la présence d'un pathogène, une réponse plus rapide et plus efficace de la plante sera mise en place pour lutter contre le pathogène. Il est à noter que certains éliciteurs, lorsqu'ils sont appliqués à faible dose ou en fonction de l'espèce végétale, peuvent se comporter comme des potentialisateurs (Menard 2004; Gauthier et al. 2014).

IV. Étudier et évaluer l'efficacité de protection d'un SDP

L'induction des défenses, en réponse à l'application d'un traitement SDP, peut être évaluée selon plusieurs méthodes qui tiennent compte des différents événements métaboliques associés à la mise en place de l'immunité végétale.

1. Détecter les événements précoces

La perception d'un SDP par la plante induit des événements précoces détectables dès les premières minutes. Il s'agit de phénomènes tels que des changements de pH, une polarisation de la membrane cellulaire, une production de ROS, des flux entrants de calcium et l'activation de la cascade de phosphorylation/déphosphorylation des MAPKs. Ces événements précoces ne peuvent en aucun cas suffire à démontrer l'efficacité d'un SDP. L'activation de la production de ROS et de la cascade MAPK sont des événements très sensibles qui ne sont pas forcément corrélés à la mise en place des défenses (RMT élicitra 2018). Par exemple la production de ROS est également une réponse aux conditions environnementales (Sharma. et al. 2012) et peut être activée lors d'une simple manipulation du matériel végétal. L'étude de ces paramètres doit donc être complétée par l'étude d'événements plus spécifiques comme l'activation de l'expression de gènes impliqués dans les réactions de défense.

2. Analyse des événements cellulaires et moléculaires associés à une induction des mécanismes de défense.

a) Étude des niveaux d'expression de gènes

L'analyse de l'expression de gènes est une méthode couramment utilisée pour l'étude de l'efficacité d'un SDP. Dans un premier temps, les molécules susceptibles de présenter une activité élicitrice peuvent être sélectionnées en testant leur activité sur des plantes transformées dont le promoteur de gènes de défense est associé à un gène rapporteur (Millet et al. 2010; Poncini et al. 2017). Les gènes rapporteurs peuvent être des gènes codant pour des protéines fluorescentes (GFP : green fluorescent protein, YFP : Yellow fluorescent protein) ou codant des enzymes dont l'action provoque l'apparition d'un produit fluorescent ou coloré en fonction du chromogène utilisé (*luc*: luciférase (jaune-vert ; *gus* : gène de la β -glucuronidase (bleu), *lacZ* : gène de la β -galactosidase (bleu)). Cette méthode peu coûteuse et rapide permet le criblage de nombreuses molécules à potentiel SDP. Lorsque le nombre de molécules d'intérêts est réduit, une méthode complémentaire peut être utilisée dans le but d'identifier et de caractériser le mode d'action du traitement. Cette méthode qui repose sur la technique de qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) permet de quantifier le niveau d'expression de gènes

cibles impliqués dans des voies métaboliques de défenses telles que celle de PR-1 ou de LOX (cf. chapitre 1) dans les extraits de plantes traitées.

b) Activité enzymatique/Détection de protéines/Modification pariétale

Il est possible d'étudier l'accumulation de protéines de défense suite à un traitement SDP (RMT élicitra 2018). Plusieurs méthodes sont disponibles : si la protéine ciblée est une enzyme, on peut mesurer son activité enzymatique sinon il est possible de détecter la présence d'une protéine grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. L'application d'un SDP peut aussi engendrer une modification de la paroi cellulaire. Des dépôts de callose peuvent être observés, après coloration, en microscopie photonique à fluorescence.

3. Paramètres expérimentaux à prendre en compte pour l'évaluation de l'efficacité de protection d'un SDP.

En France, le Réseau Mixte Technologique (RMT) Élicitra, co-animé par Arvalis-Institut du végétal, Végénov et l'Inra vise à comprendre, développer et promouvoir les stratégies basées sur le traitement des plantes avec des éliciteurs (RMT élicitra 2018). L'un des objectifs de ce réseau est d'identifier les stratégies d'évaluation et d'utilisation des éliciteurs. Deux de leurs ouvrages : « Guide méthodologique d'évaluation de l'efficacité des Stimulateurs de défense des plantes » publié en 2013 et « Les stimulateurs de défense des plantes : Panorama et solutions d'avenir » publié 2018, permettent de décrire la méthodologie générale et les paramètres importants que les expérimentateurs doivent prendre en compte pour évaluer l'efficacité de protection des SDP. Ces paramètres vont être présentés ci-après.

a) Paramètres liés à la plante :

Le choix de l'espèce végétale est important car l'efficacité des SDP peut varier selon l'espèce (Walters, Ratsep, et Havis 2013; Chuberre et al. 2018) et la variété. C'est notamment le cas pour la tomate (Sharma, Butz, et Finckh 2010), l'orge de printemps (Walters et al. 2011), la pomme de terre (Liljeroth et al. 2010) et le riz (Li et al. 2014). De plus, le stade de croissance d'un organe peut influencer l'état de résistance. Chez la vigne, la laminarine sulfatée est moins efficace contre le mildiou sur les jeunes feuilles que sur les feuilles matures (Steimetz et al. 2012). De manière inverse, chez la tomate, l'efficacité du BABA semble diminuer en fonction de l'âge des feuilles (Sharma, Butz, et Finckh 2010). Si les stomates, les trichomes (Paris et al. 2016)

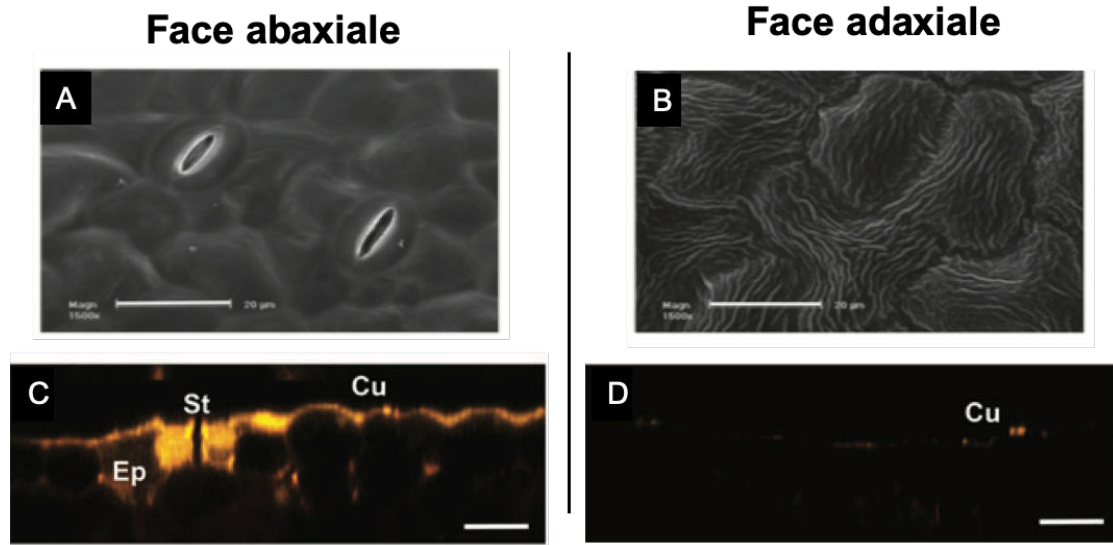


Figure 22 : Localisation des stomates de *Vitis vinifera L.* et impact de l'assimilation de laminarine sulfaté en fonction des faces foliaires traitées.

(A-B) Photographies prises au microscope électronique à balayage montrant la présence de stomate sur la face inférieure (abaxiale) (A) et leur absence sur la face supérieure (adaxiale) (B) d'une feuille de *Vitis vinifera L.* (C-D) Photographies prises au microscope balayage laser à deux photons présentant les différences d'assimilation de la laminarine sulfaté associé à un tensioactif (Dehscofix 0,1%) après application d'une goutte de 1 µL sur la face abaxiale (C) ou adaxiale (D). St : stomate, Ep : cellule épidermique, Cu : cuticule. Barres d'échelle : 20 µm. Adapté de Paris et al. 2016.

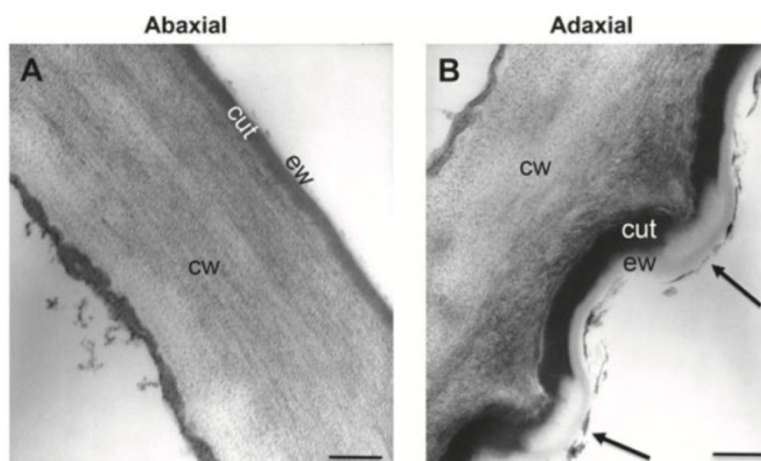


Figure 23 : Photographies prises au microscope électronique à transmission des faces foliaires abaxiale (inférieure) (A) et adaxiale (supérieure) (B).

Sur la face abaxiale, la cuticule est fine (0,066 µm) et recouverte par une fine couche de cires épicuticulaires (0,044µm) (A). En revanche sur la face adaxiale, la cuticule apparaît deux fois plus épaisse (0,183µm) avec deux fois plus de cires épicuticulaires (0,096µm) et la présence de crêtes cuticulaires indiquées par les flèches (B). cw : paroi végétale, cut : cuticule, ew : cire épicuticulaire. Barres d'échelle = 0,3 µm (Paris et al. 2016).

et d'autres ouvertures naturelles comme les zones d'émergences des racines secondaires sont des sites vulnérables d'attaque pour les pathogènes, ce sont aussi des voies d'entrées préférentielles pour les SDP. Il est donc préférable de s'assurer que la molécule testée est appliquée sur des zones qui présentent ces ouvertures. De plus la distribution des stomates au sein des organes foliaires peut varier selon les espèces. Chez *A. thaliana*, les stomates sont présents sur les deux faces de la feuille (Pillitteri et Dong 2013) alors que chez *Vitis vinifera L.* les stomates sont localisés essentiellement sur la face inférieure (abaxiale) de la feuille (**figure 22 A-B**) (Paris et al. 2016). Ces différences morphologiques peuvent en partie expliquer les variabilités d'efficacité des traitements SDP, l'assimilation de ces produits étant plus efficace sur les faces présentant des ouvertures naturelles (**figure 22 C-D**).

b) Paramètres liés à la substance élicitrice

Les propriétés physico-chimiques d'une molécule sont des paramètres non négligeables à prendre en compte lors de l'étude de l'efficacité d'un traitement. La structure et la composition d'une molécule sont essentielles pour son activité élicitrice. L'activité biologique d'une molécule polymérique est dépendante de son degré de polymérisation (DP) et de sa configuration (Trouvelot et al. 2014). L'activité biologique des fragments de chitine augmente par exemple avec le DP : une forte activité est observée pour les heptamères ou octamères (DP=7 ou 8) et une faible activité pour les fragments de petites tailles (Hamel et Beaudoin 2010). Il en est de même pour des fragments de cellodextrine $\beta(1,4)$ -D-glucose où une augmentation de l'activité biologique est notée pour des DP > 6 (Aziz et al. 2007). L'addition de groupements sulfates peut également moduler l'activité biologique d'une molécule en augmentant son activité biologique et sa résistance à la dégradation enzymatique, ce qui contribue à améliorer son effet inducteur de défense (Menard 2004, 2005; Gauthier et al. 2014).

Dans le cas d'extraits ou d'organismes vivants, il est recommandé de tester plusieurs lots de production pour s'assurer de l'efficacité du traitement compte tenu de la variabilité des lots de production (RMT Elicitra 2013). Le manque d'efficacité d'un SDP peut être lié à une faible biodisponibilité de celui-ci. La biodisponibilité représente la quantité de produit qui atteint les récepteurs PRR de la plante par rapport à la quantité de produit apportée par l'opération de traitement. Ainsi, certains SDP hydrophiles de taille moléculaire assez élevée tels que les oligosaccharides pénètrent plus difficilement dans la plante en raison de la présence de barrières constitutives hydrophobes (cuticule, rhizoderme). Une étude réalisée par Paris et ses collaborateurs en 2016 a d'ailleurs montré que l'épaisseur de la cuticule pouvait varier en

fonction de la face foliaire. C'est notamment le cas chez *Vitis vinifera L.* où l'épaisseur de cuticule est deux fois plus importante sur la face supérieure (adaxiale) en comparaison avec la face inférieure (abaxiale) (**figure 23 A-B**). Ces différences d'épaisseur peuvent donc impacter l'assimilation d'un SDP et expliquer la variabilité d'efficacité des traitements en vignoble.

Il est toutefois possible d'augmenter la pénétration d'une molécule hydrophile en ayant recours à des agents tensioactifs (Castro, Ojeda, et Cirelli 2014). Par exemple, la pénétration de la laminarine sulfatée dans les feuilles peut être augmentée par ajout de Dehscofix CO125, un tensioactif riche en oxyde d'éthylène qui permet d'augmenter la perméabilité à l'eau de la cuticule (**figure 24**) (Ramsey, Stephenson, et Hall 2005; Paris et al. 2016). Des systèmes de distribution de SDP sont également à l'étude afin d'améliorer leur assimilation dans les tissus végétaux. Par exemple, les nanoparticules de chitosane pénètrent plus facilement dans les tissus foliaires ce qui permet d'atteindre des quantités de produit intrinsèque plus élevées et une meilleure efficacité d'induction de défense en comparaison avec la faible biodisponibilité du chitosane seul (**figure 25**) (Chandra et al. 2015).

La dose utilisée lors d'un traitement peut perturber la physiologie de la plante. Certaines molécules, à forte concentration, peuvent altérer la croissance de la plante ou avoir un effet toxique. C'est notamment le cas pour la flg22 (Gomez-Gomez, Felix, et Boller 1999) et le BTH (Canet et al. 2010) pour lesquels une réduction de la croissance des plantes est observée en fonction de la dose appliquée. Il est donc nécessaire de s'assurer que la molécule testée n'affecte pas la croissance de la plante. L'efficacité d'induction des défenses dépend également de la dose appliquée (Liljeroth et al. 2010). Par exemple, en conditions contrôlées, il a été observé une réduction de 85% de la maladie du mildiou de la vigne après application de laminarine sulfatée à 5 g.L⁻¹ contre 57% de protection avec une dose de 1,25 g.L⁻¹ (Trouvelot et al. 2008).

La méthode d'application du traitement peut également moduler l'efficacité de celui-ci. En effet, si l'éliciteur est appliqué par pulvérisation foliaire, il est nécessaire d'ajuster l'orientation de la buse de vaporisation de manière à atteindre les faces abaxiales des feuilles qui ont en général un nombre de stomates plus élevé. Par ailleurs, le stade de développement des plantes et leur architecture peuvent impacter la quantité de produit qui atteint réellement les feuilles (RMT élicitra 2018). Bien que la méthode la plus couramment utilisée soit la pulvérisation foliaire, il est également possible d'induire les défenses

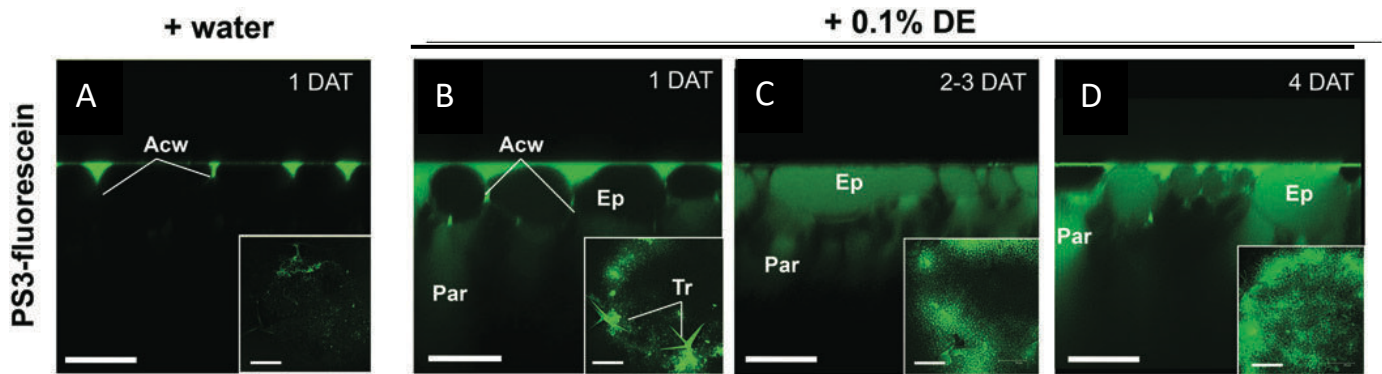


Figure 24 : Comparaison des niveaux de pénétration de la laminarine sulfatée (1 g.L^{-1}) lorsque celle-ci est formulée avec de l'eau ou avec un tensioactif (Dehscofix 0,1%) après traitement de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (face adaxiale).

(A-D) Photographies prises au microscope confocal (x40). Un zoom de la zone de dépôt est présente pour chaque photographie (X10). Lorsque la laminarine est mélangée à de l'eau, une faible pénétration est observée au niveau de la paroi des cellules épidermiques (A). Lorsque la laminarine est mélangée avec un agent tensioactif, sa pénétration est considérablement augmentée par rapport à la laminarine seule puisqu'une plus grande quantité d'éliciteur est observée au niveau de la paroi des cellules épidermiques (B). La laminarine diffuse ensuite dans la cellule végétale et se retrouve dans la vacuole des cellules épidermiques et parenchymateuses après 2 et 4 jours de traitement (C-D). Acw : paroi végétale anticline, Ep : cellule épidermique, Par : cellule parenchymateuse. Barres d'échelles $25 \mu\text{m}$ pour l'objectif x40 et $300 \mu\text{m}$ pour l'objectif x10 (Paris et al. 2016).

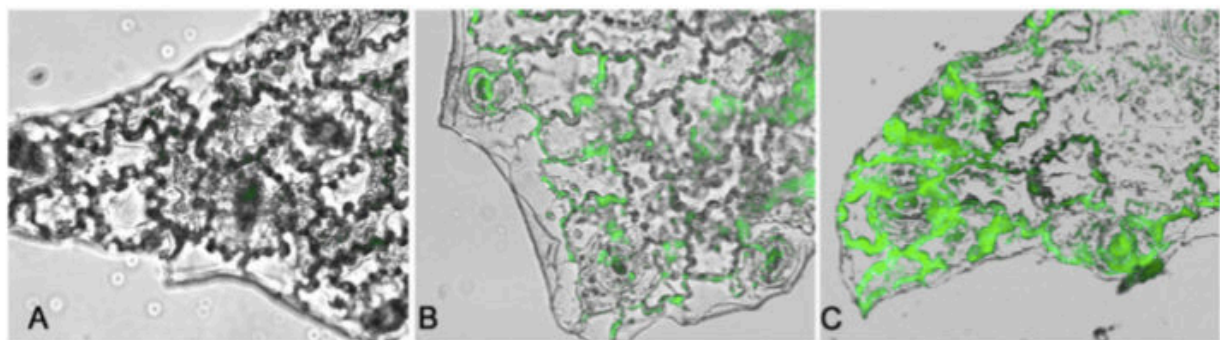


Figure 25 : Suivi de l'absorption cellulaire *in vitro* du chitosane (CHT) et de nanoparticules de chitosane (CNP) marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dans des cellules foliaires de *Camellia sinensis*.

Les cellules foliaires non traitées (A) ont été incubées dans de l'eau contenant uniquement du FITC d'où l'absence de fluorescence dans les cellules épidermiques. Les cellules foliaires incubées avec CHT-FITC (B) et CNP-FITC (C) présentent un marquage fluorescent au niveau des parois cellulaires traduisant l'absorption cellulaire de ces molécules. Les cellules incubées avec CNP-FITC (C) présentent toutefois une fluorescence plus importante autour des parois cellulaires que les cellules incubées dans les mêmes conditions avec CHT-FITC ce qui traduit une plus forte bioaccumulation de CNP (Chandra et al. 2015).

racinaires d'une plante selon différentes méthodes : trempage des racines, culture hydroponique, arrosage du sol (Chuberre et al. 2018). L'application d'éliciteurs au niveau des racines offre la possibilité de s'affranchir de la cuticule et permet dans certains cas d'augmenter l'efficacité des traitements et la durée de protection comparativement aux pulvérisations foliaires (Jakab et al. 2001; McGrann et al. 2017). Toutefois, comme pour les feuilles, la biodisponibilité des SDP dans les racines peut être altérée par des facteurs physiologiques et environnementaux (Chuberre et al. 2018).

c) Paramètres liés au bio-agresseur et au couple plante/pathogène

Même si les SDP n'ont pas pour vocation d'avoir une action directe sur les organismes pathogènes, certains d'entre eux peuvent tout de même avoir une activité biocide. Par exemple, le chitosane possède une activité anti-bactérienne (Mansilla et al. 2013), anti-virale (El Hadrami et al. 2010) et anti-fongique (Malerba et Cerana 2016). Pour évaluer l'effet d'une molécule, il est possible de réaliser des tests *in vitro* en y ajoutant le SDP testé à différentes concentrations en présence du bio-agresseur ciblé (pathogène non obligatoire). L'effet direct de la molécule peut être évaluée sur différents stades de développement de l'organisme pathogène (production de spores, germination de spores, croissance mycélienne ou bactérienne...). L'effet protecteur du SDP sur la plante peut être évalué en étudiant le développement d'un agent pathogène *in vivo* sur des plantes traitées. Pour cela, plusieurs méthodes sont disponibles. Par exemple, le suivi du développement de l'agent pathogène peut être évalué sur feuilles détachées et/ou sur plantes entières. Il existe des échelles de notation qui permettent d'évaluer le degré de développement d'un bio-agresseur sur des plantes traitées par rapport à des plantes contrôles non traitées (% de feuilles atteintes, % de mortalité). On peut citer l'exemple de l'échelle notation de l'antracnose du pois qui permet d'évaluer visuellement la gravité des symptômes causés par le champignon *M. pinodes* (**figure 26**) (Tivoli et al. 1996).

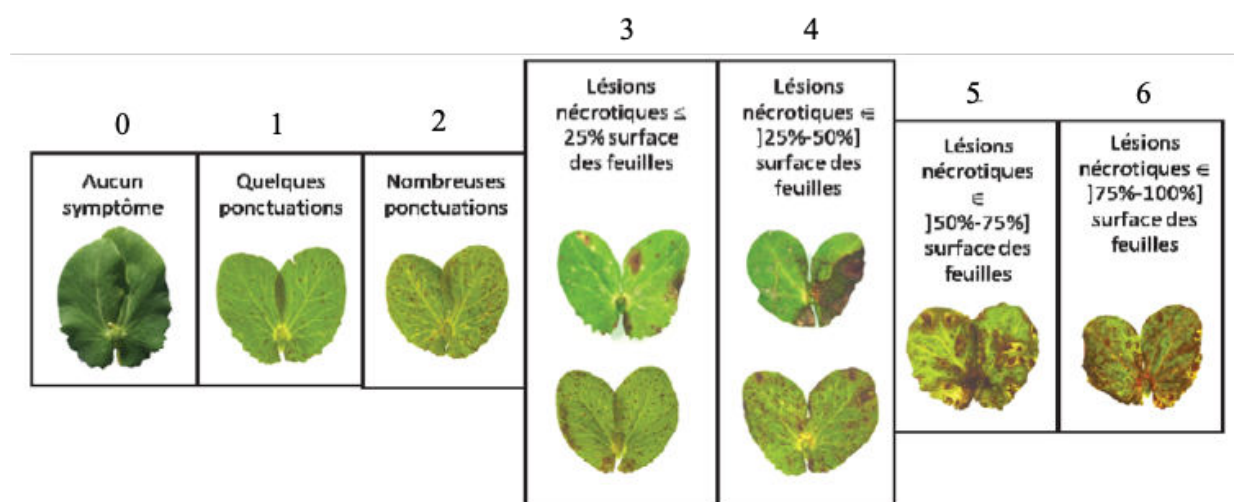


Figure 26 :Échelle de notation de maladie pour le couple *M. pinodes*/Pois, adapté de Roger et Tivoli 1996

0 = absence de lésions, 1 = quelques ponctuations, 2 = de nombreuses ponctuations, 3 = < 25% de la surface atteinte (premières nécroses), 4 = 25-50% % de surface foliaire déshydratée et nécrosée, 5 = 50-75% de surface foliaire déshydratée et nécrosée, 6= 75-100% de surface foliaire déshydratée et nécrosée. Ces notations sont réalisées 10 et 20 jours après l'inoculation.

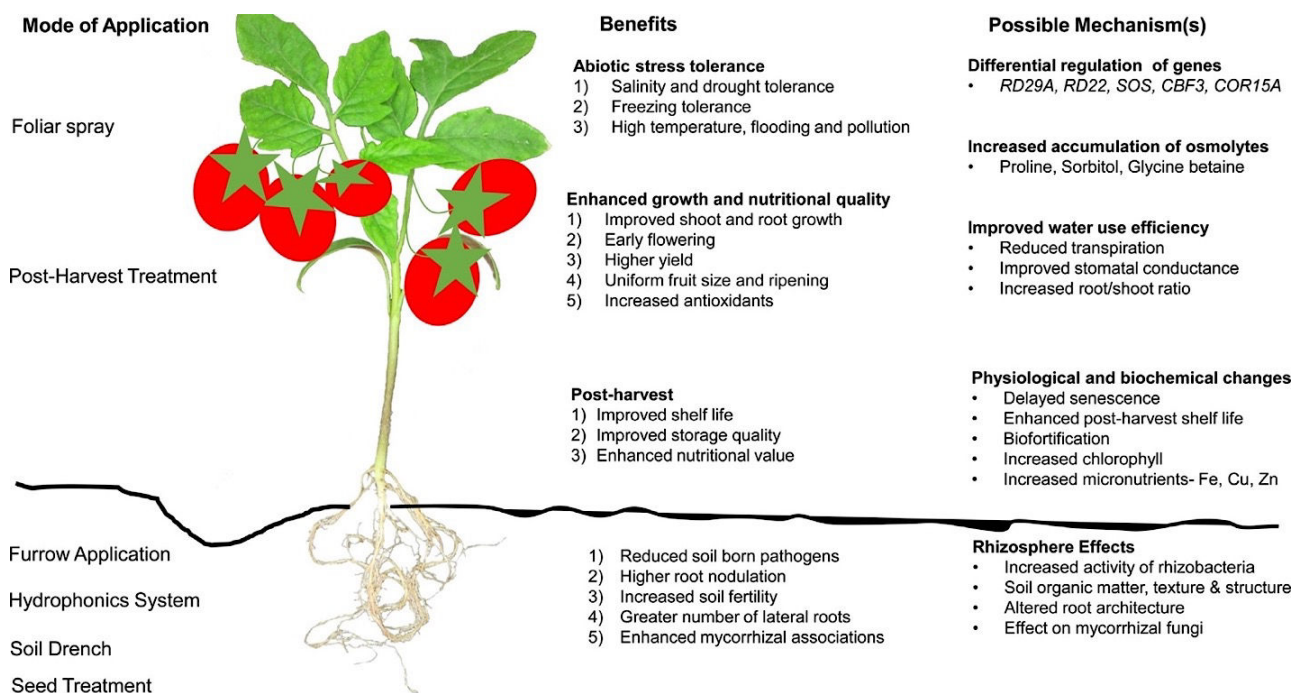


Figure 27 : Représentation schématique des méthodes d'application d'extraits d'algues, de leur effet et des mécanismes d'actions engendrés chez les plantes.

(Battacharyya et al. 2015)

V. Les algues marines : une importante source de molécules SDP

Depuis quelques années, les algues suscitent un regain d'intérêt en agriculture car elles représentent une alternative durable aux intrants (Sharma et al. 2014). Les algues produisent une très grande diversité de métabolites et de nombreuses molécules qui présentent une activité biologique (Chojnacka et Kim 2015). Leur composition élevée en minéraux, vitamines, oligoéléments et en hormones en font par exemple d'excellents biofertilisants (Chatterjee et al. 2017). Des molécules à effet fongicide sur des pathogènes de plantes sont présentes chez certaines espèces telles que *Ochtodes secundiramea* et *Laurencia dendroidea* (Machado et al. 2014). Des extraits d'algues ont également prouvé leur efficacité dans l'amélioration de la tolérance à divers stress abiotiques en augmentant par exemple la tolérance des plantes aux stress salin ou hydrique (Battacharyya et al. 2015) ainsi qu'une augmentation de la tolérance aux stress biotiques (Burketova et al. 2015) (**figure 27**). Par exemple, l'application d'un extrait d'*Ascophyllum nodosum* sur des plantules d'*Arabidopsis* a permis d'augmenter la résistance des plantules contre *Pseudomonas syringae* DC3000 et *Pseudomonas aeruginosa* (Cook et al. 2018). Les polysaccharides d'algues sont capables d'induire des réactions de défense chez les plantes et d'augmenter leur résistance contre des infections pathogènes (Burketova et al. 2015).

Plusieurs polysaccharides miment l'action des MAMPs lorsqu'ils sont appliqués sur une plante :

- La laminarine $\beta(1,3)$ -glucane est un polysaccharide de réserve caractéristique des algues brunes (Phéophycées) telle que *Laminaria digitata*. Ce polysaccharide, de structure semblable aux produits de dégradation des parois de champignons, est reconnu par la plante comme un signal d'attaque fongique. La laminarine est devenue le principe actif du produit Vacciplant commercialisé dans différents pays pour lutter contre différentes maladies. Des réactions de défense telles que la synthèse de phytoalexines (Klarzynski et al. 2000), l'expression de gènes de défense (Aziz et al. 2003) et une protection contre des agents pathogènes tels que les champignons *Botrytis cinerea*, *Blumeria graminis f. sp. Tritici*, l'oomycète *Plasmopara viticola*, (Aziz et al. 2003; Renard-Merlier et al. 2007) ou des bactéries (*Erwinia carotovora*) (Klarzynski et al. 2000) ont été observées après application foliaire de laminarine. De plus, il a été montré que l'addition de groupements sulfate sur la laminarine (PS3) améliore l'effet protecteur et inducteur de défense du polysaccharide (Menard 2005; Trouvelot et al. 2008) en induisant des mécanismes de défense différents de ceux induits par la laminarine (Menard 2004; Gauthier et al. 2014)

comme une dépolarisation de la membrane (Gauthier et al. 2014). Une protection contre le virus du tabac (*Tobacco mosaic virus*, TMV) et le pathogène *P. viticola* a pu être observée après traitement PS3 (Menard 2004) via l'activation de la voie de SA (Menard 2004; Gauthier et al. 2014).

- Les ulvanes sont des hétéropolysaccharides sulfatés caractéristiques de la paroi des algues vertes composés essentiellement de rhamnose (16,8-45 %) et d'acides uroniques (6,5-19 %) (Stadnik et Freitas 2014). L'application d'un extrait d'*Ulva armoricana* sur le haricot, la vigne et le concombre a montré un effet protecteur contre l'oïdium (Jaulneau et al. 2011). Des résultats similaires ont également été obtenus chez le pois contre *Colletotrichum lindemuthianum* (de Freitas et Stadnik 2012), chez la tomate contre *Fusarium oxysporum* (El Modafar et al. 2012), chez la luzerne contre *Colletotrichum trifolii* (Cluzet et al. 2004), chez l'orge et le blé contre *Blumeria graminis* (Paulert et al. 2010), chez l'olivier contre *Verticillium dahliae*. Contrairement à la laminarine sulfatée, l'application d'ulvanes sur les plantes semble favoriser la voie de JA (Jaulneau et al. 2010) permettant une protection contre des organismes pathogènes nécrotrophes. Toutefois, il a été démontré que les ulvanes pouvaient aussi être impliqués dans la défense contre des organismes biotrophes au travers de la voie de SA (Cluzet et al. 2004; El Modafar et al. 2012). Un effet potentialisateur a également pu être observé sur le blé et le riz (Paulert et al. 2010). Ces différences de réponses pourraient être liées à la composition du polysaccharide qui dépend de la taxonomie et des variations environnementales (Lahaye et Robic 2007). Le degré de sulfatation semble également moduler le pouvoir éliciteur des ulvanes puisqu'une dé-sulfatation complète du polysaccharide supprime l'effet protecteur contre *Fusarium oxysporum* chez la tomate (El Modafar et al. 2012). Toutefois, ce paramètre ne semble pas moduler l'effet protecteur pour tous les pathosystèmes puisque la résistance induite par les ulvanes chez *Arabidopsis* contre *Alternaria brassicicola* et *Colletotrichum higginsianum* semble indépendante du degré de sulfatation (de Freitas et al. 2015). Les ulvanes semblent également agir de manière directe sur les organismes pathogènes puisqu'une inhibition de croissance mycélienne sur le champignon *V. dahliae* a été observée suggérant un effet fongitoxique (Ben Salah et al. 2018).
- Les carraghénanes sont des polysaccharides linéaires caractéristiques des algues rouges constitués de résidus galactose sulfatés. Le degré de sulfatation permet de classer les carraghénanes en 3 grandes catégories : le κ -carraghénane, le ι -carraghénane, le λ -

carraghénane. Les carraghénanes sont principalement utilisés dans l'industrie agroalimentaire en raison de leurs propriétés texturantes. Cependant, des études ont montré que ces polysaccharides pouvaient induire des réactions de défense chez les plantes et être valorisés en agriculture comme sur des plantes de tabac pour lesquelles un effet protecteur contre des infections fongiques (*B. cinerea*) et bactériennes (*E. carotovorum*) peut être observé (Mercier et al. 2001; Vera et al. 2012). Cette protection peut être reliée à une augmentation de la production de l'enzyme PAL à l'origine d'une accumulation de composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne (Vera et al. 2012; Ghannam et al. 2013) et de l'enzyme $\beta(1,3)$ -glucanase (Patier et al. 1995) qui participe à la dégradation des polymères des parois fongiques. De façon similaire aux ulvanes, les carraghénanes sont capables d'activer la voie de SA (Mercier et al. 2001; Vera et al. 2011) ou de JA (Sangha et al. 2010, 2015) selon le pathosystème considéré mais une expression simultanée des gènes de défense issus de ces deux voies a également été observée (Ghannam et al. 2013). Les carraghénanes présentent aussi un effet protecteur contre des infections virales chez le tabac (Vera et al. 2011; Ghannam et al. 2013) et la tomate (Sangha et al. 2015) en limitant l'accumulation du virus dans les feuilles traitées (Reunov et al. 2004). Le degré de sulfatation semble moduler l'effet éliciteur des carraghénanes. Par exemple, le λ -carraghénane, qui correspond au degré de sulfatation le plus élevé (35%), induit un niveau de résistance plus élevé contre le champignon nécrotrophe *Sclerotonia sclerotiorum* par rapport au ι -carraghénane qui présente un plus faible degré de sulfatation (30%) (Sangha et al. 2010) et le virus TMV (Vera et al. 2011). Le λ -carraghénane est également le seul à induire une protection contre le virus *Tomato Chlorotic Dwarf Viroid* chez la tomate (Sangha et al. 2015). Le degré de sulfatation ne semble pas jouer un rôle dans tous les cas puisque les carraghénanes λ et ι possèdent des efficacités de protection identiques contre le champignon *B. cinerea* alors que les 3 carraghénanes induisent une protection similaire contre *E. carotovora* (Vera et al. 2012). En raison de leur efficacité contre un large spectre d'agresseurs, virus y compris, les carraghénanes représentent une source prometteuse de molécules élicitrices.

- Les fucanes sont des polysaccharides pariétaux caractéristiques des algues brunes composés de résidus fucose sulfatés. Sur des cultures cellulaires de tabac, les oligofucanes déclenchent des événements précoces (alcalinisation du milieu extracellulaire, production de ROS) et tardifs (augmentation de l'activité enzymatique PAL, LOX) associés à des réactions de défense (Klarzynski et al. 2003). Sur feuilles de tabac, les oligofucanes induisent la synthèse de phytoalexines telle que la scopoletine,

l'accumulation de SA et de protéines PR (Klarzynski et al. 2003). Les fucanes ont un effet protecteur contre le virus TMV du tabac (Klarzynski et al. 2003; Lapshina et al. 2006).

Les polysaccharides d'algues représentent une source de molécules élicitrices pour la santé et la défense des plantes : leur efficacité, leur biodégradabilité, leur faible toxicité et leur abondance en font une piste de recherche prometteuse (Burketova et al. 2015) pour l'élaboration de nouveaux traitements phytosanitaires. Actuellement, la majorité des molécules possédant une action inductrice des défenses sur les plantes a été isolée à partir de macro-algues. En France moins de 1% (soit environ 350 tonnes) de la biomasse algale produite provient de l'aquaculture, le restant étant exclusivement issu de ressources sauvages (70 000 tonnes) (projet idealg). Les laminaires sont par exemple récoltées au large des côtes du nord de la France de mai à octobre grâce à des navires spécialisés (les goémoniers) qui possèdent un bras mécanique articulé terminé par un crochet appelé le scoubidou. L'exploitation de ces ressources dans leur milieu naturel corrélé avec une demande croissante des besoins représente un risque de surexploitation pour certaines espèces. Bien que la production des macro-algues en station soit possible, la complexité et la durée de leur cycle de développement (certaines macro-algues possèdent un cycle annuel) constituent des freins à leur production et exploitation.

Des éliciteurs issus de microalgues : nouvelle piste de recherche ?

I. Les microalgues : une importante source de biomolécules

Les microalgues sont des organismes microscopiques photosynthétiques qui peuplent l'ensemble des niches écologiques aquatiques comprenant les eaux douces, marines et saumâtres. Ces organismes font partie d'un groupe polyphylétique très divers allant des organismes procaryotes (cyanobactéries) aux organismes eucaryotes (lignées verte et rouge). Les microalgues sont des organismes essentiels au fonctionnement du réseau trophique puisqu'elles constituent le phytoplancton, base alimentaire d'une large variété d'organismes marins. A cause de leur diversité biochimique et génétique ainsi que de leur proximité taxonomique avec les macro-algues, les microalgues peuvent représenter une nouvelle source de molécules élicitrices. En effet, contrairement aux macro-algues, elles présentent un cycle de reproduction rapide (certaines d'entre elles peuvent doubler leur biomasse en quelques heures) (Acién et al. 2012) et peuvent être cultivées en bassins ouverts (raceway) ou fermés (bio-réacteurs, flasques) à moindre cout (12.6 €/kg) et en quantité importante (jusqu'à 200 tonnes/an ; Acién et al. 2012). Ces avantages permettent un rythme de récolte plus soutenu et mieux contrôlé. De plus, les microalgues sont dotées d'une grande plasticité métabolique favorisant la synthèse de diverses molécules.

Si elles sont surtout présentes dans les environnements aquatiques, la plasticité métabolique des microalgues leur a également permis de coloniser les sols et d'autres supports tels que les rochers ou les arbres (Macedo et al. 2009). Pour cela, les microalgues synthétisent une très grande diversité de métabolites leur permettant de s'adapter à leur environnement : protéines, acides gras polyinsaturés (PUFAs), pigments, vitamines, composés extracellulaires tels que des poly ou oligosaccharides (Raposo, de Morais, et Bernardo de Morais 2013). Par exemple, les diatomées excrètent dans leur milieu des exopolysaccharides (EPS) afin d'adhérer à des supports (Amin, Parker, et Armbrust 2012). Ces secretions ont pour conséquence l'attraction de bactéries, pour lesquelles les EPS représentent une source de carbone (Buhmann et al. 2016). Les EPS peuvent être de nature diverse : résidus xylose, glucose, mannose ou galactose qui peuvent être sulfatés (Raposo, de Morais, et Bernardo de Morais 2013). Le raphé des diatomées pennées, qui correspond à la zone d'exsudation, peut donc être une zone de fixation privilégiée par les bactéries (**figure 28**) (Kaczmarska et al. 2005). Les interactions entre les microalgues et les bactéries peuvent être bénéfiques, neutres ou néfastes pour l'un des protagonistes. Dans le cas d'une interaction négative, les microalgues modifient leur métabolisme pour survivre et lutter contre leur bio-agresseurs. Par exemple, la diatomée *Navicula delognei* synthétise plusieurs composés antibactériens qui agissent sur plusieurs pathogènes tels

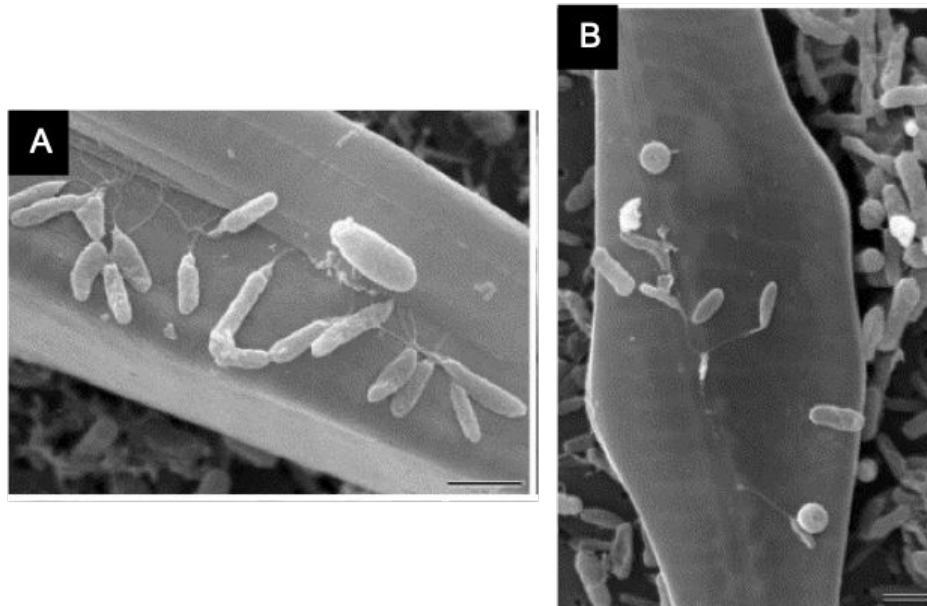


Figure 28 : Microscopie électronique à balayage montrant l'attachement de bactéries sur la microalgue *Pseudo-Nitzschia multiseries*.

(A) Bactéries de type *Caulobacter* fixées à la paroi de la microalgue *Pseudo-Nitzschia multiseries*. (B) Plusieurs bactéries fixées au niveau de la zone du raphé. Barres d'échelle = 1 μm . (Kaczmarska et al. 2005).

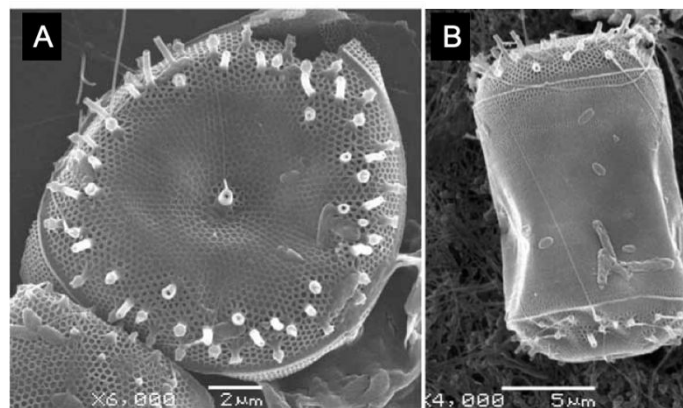


Figure 29 : Fultoportulata et fibres de β -chitine chez la microalgue *Thalassiosira fluviatilis*.

(A) Photographie prise au microscope électronique montrant une valve de *Thalassiosira fluviatilis* constituée d'un pore central et de deux anneaux périphériques de pores : fultoportulas. (B) Cellule de *Thalassiosira fluviatilis* présentant des fibres de chitine.

que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, et *Salmonella enterica* (Findlay et Patil 1984). Les composés antimicrobiens peuvent être synthétisés à partir de PUFAs constitutifs, qui une fois dans le milieu environnant, se transforment en aldéhydes poly-insaturés (PUA). Ces PUA testés sur 33 bactéries marines ont montré une inhibition de leur croissance (Amin, Parker, et Armbrust 2012) ainsi qu'une action négative sur la croissance de copépodes (Prestegard et al. 2015). La dinoflagellée *Prorocentrum minimum* synthétise un métabolite antibiotique, le β -dicétone, impliqué dans le contrôle de la croissance des bactéries marines (Trick, Andersen, et Harrison 1984). De manière inverse, certaines bactéries peuvent stimuler la croissance des microalgues (Mouget 1995; Liu et al. 2008; Cho et al. 2015) ou développer des relations symbiotiques (Park et al. 2008). Il est également intéressant de souligner que certaines espèces de microalgues telles que *Thalassiosira fluviatilis* produisent et excrètent des fibres de chitine au travers de pores spécialisés : les fultoportulas (**figure 29**) (Durkin, Mock, et Armbrust 2009; Hernández-Becerril, Moreno-Gutiérrez, et Barón-Campis 2009). Toutefois, la conformation des fibres de chitine issues de microalgues diffère de celles présentes dans la paroi d'organismes fongiques (α -chitine) qui sont à l'origine de l'activation des mécanismes de défense chez les plantes.

Malgré le potentiel énorme que représentent les microalgues en raison de leur proximité avec les macro-algues et de leur rapidité de croissance, ces microorganismes restent encore peu valorisés en agriculture. Cependant, des études récentes ont montré que les microalgues pouvaient avoir des propriétés bio-stimulantes (Rothlisberger-Lewis, Foster, et Hons 2016; Renuka et al. 2018; Chiaiese et al. 2018) sur la biomasse microbienne du sol, des propriétés antimicrobiennes contre des champignons pathogènes de plante (immunrisebiocontrol.fr) ainsi que des effets inducteurs des mécanismes de défense (Farid et al. 2018). Dans le cadre de ce projet de thèse, il a donc été décidé d'étudier le potentiel d'une culture de microalgue, *Phaeodactylum tricornerutum*, à induire des réactions de défense chez les plantes

II. Une microalgue modèle : *Phaeodactylum tricornerutum*

Les diatomées représentent la classe dominante du phytoplancton mondial et peuvent vivre à la fois en eau douce et en eau marine (Desbois, Mearns-Spragg, et Smith 2009). Ces organismes unicellulaires se caractérisent par la présence d'une enveloppe externe silicifiée insérée dans une matrice organique nommée le frustule. Cette couche en silice est ornementée par d'innombrables pores qui permettent les échanges avec le milieu environnant. De manière intéressante, les diatomées possèdent un polysaccharide de réserve similaire à celui des algues

brunes : la chrysolaminarine ($\beta(1,3)$ -glucane ; Wilhelm et al. 2006 ; Caballero et al. 2016). *Phaeodactylum tricornutum* est une diatomée utilisée dans de nombreux laboratoires du fait de sa facilité de culture et du séquençage de son génome (Bowler et al. 2008; Montsant 2005; Yang et al. 2018). Cette microalgue appartient à la classe des Bacillariophyceae en raison de la présence d'un raphé silicifié pour la forme ovale. Actuellement, *Phaeodactylum tricornutum* est la seule représentante du sous-ordre Phaeodactylinae, Famille Phaeodactylaceae (Lewin, Lewin, et Philpott 1958).

1. *Phaeodactylum tricornutum* : une diatomée atypique

La diatomée *Phaeodactylum tricornutum* (Lewin, Lewin, et Philpott 1958), bien que cosmopolite n'est pas une microalgue abondante dans l'environnement et vit principalement dans des environnements instables (rochers, estuaires, salinité élevée). L'une des caractéristiques majeures de cette microalgue est son pléomorphisme (De Martino et al. 2011). En effet, celle-ci existe majoritairement sous trois morphotypes distincts : les formes fusiforme, triradiée et ovale (**figure 30**).

Phaeodactylum a été isolée dans plusieurs zones géographiques du monde et actuellement dix souches sont cultivées dans les laboratoires de recherche. Les souches sont nommées par les initiales P et t suivi d'un numéro (Pt1 à Pt10). L'analyse de ces souches a permis de mettre en avant des prédispositions pour un morphotype particulier (**Figure 31**). De plus, un séquençage d'une région de l'ADN ribosomique (ITS2) considéré comme un marqueur lors d'analyses phylogénétiques (Schultz et al. 2006), a montré la présence de 4 génotypes (A, B, C et D) définis selon le polymorphisme génétique de cette région (De Martino et al. 2007)

Les morphotypes sont capables de passer de l'un à l'autre en fonction des conditions environnementales (Willis et al. 2013 ; De Martino et al. 2007). La température et la salinité semblent être des facteurs déterminants dans les changements morphologiques. Par exemple, une diminution de la salinité induit une augmentation du nombre de cellules ovales chez plusieurs souches (Pt1.8.6 ; Pt3) au détriment des autres morphotypes (De Martino et al. 2011). Il semblerait ainsi que le morphotype ovale soit le plus adapté à des conditions « défavorables ». De manière surprenante, ces changements de morphotypes sont des processus réversibles lorsque les conditions de cultures redeviennent « favorables » (De Martino et al. 2011; He, Han, et Yu 2014). Des différences de flottabilité, en lien avec leur organisation vacuolaire et pariétale (Borowitzka et Volcani 1978), sont également à noter et peuvent expliquer les différents modes

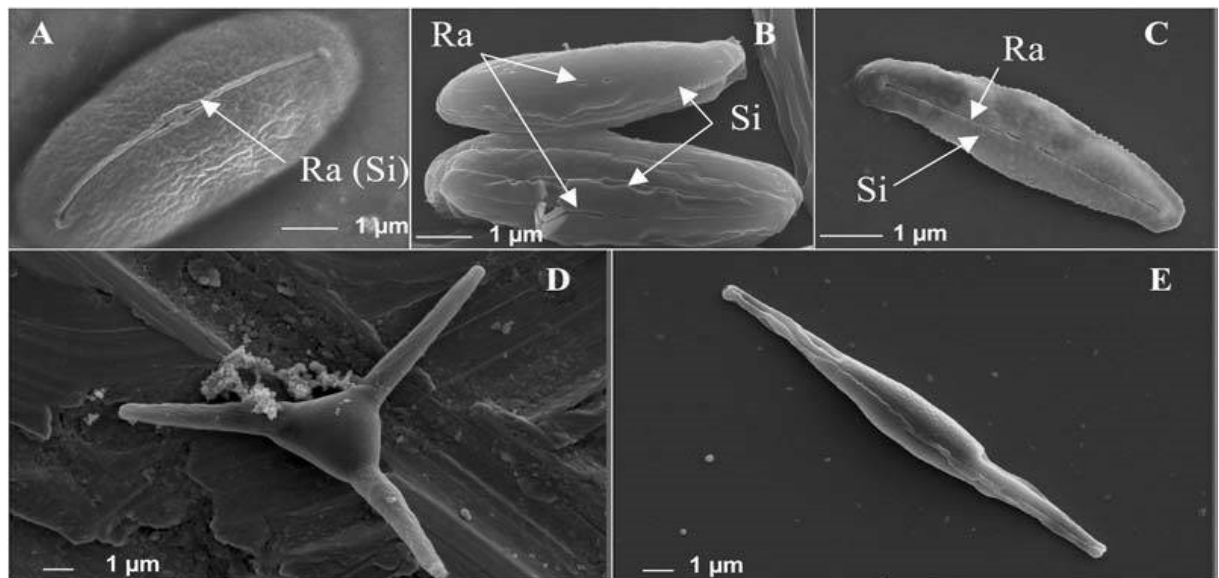


Figure 30 : Photographies des différents morphotypes de *Phaeodactylum tricornutum* prises au microscope électronique à balayage.

(A-C) Cellules isolées du morphotype ovale montrant la présence d'un raphé (Ra) silicifié (Si). (D) Cellule isolée du morphotype triradié. (E) Cellule isolée du morphotype fusiforme (Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009).

Accession name	Genotype	Morphology
Fusiform morphotype		
Pt1	A	
Pt2	A	
Pt3	A	
Pt4	B	
Pt5	C	
Pt6	D	
Pt7	D	
Pt8	D	
Pt9	A	
Pt10	C	
Oval morphotype		
Pt3	A	
Pt9	A	
Triradiate morphotype		
Pt8	D	

Figure 31 : Prédiposition morphologique des dix souches actuellement étudiées dans les laboratoires de recherche ainsi que le génotype associé au polymorphisme de la région ITS2.

(De Martino et al. 2007)

de vie : planctonique pour triradié et fusiforme en raison d'une forte flottabilité et benthique pour les cellules ovales en raison d'une faible flottabilité. A la vue de ces caractéristiques, il est alors possible d'imaginer que *Phaeodactylum tricornutum* soit une source importante de molécules en raison de son pléomorphisme qui lui procure une très grande adaptabilité.

2. Les morphotypes fusiformes et triradiés : des morphotypes relativement similaires

Le morphotype fusiforme est la forme la plus stable de l'espèce (Volcani 1981) et celle que l'on rencontre principalement en laboratoire ou dans la nature (De Martino et al. 2007). Ce morphotype présente une forme allongée (25-35 μm) et deux bras vacuolaires (**figure 32 A-B**). Le morphotype triradié est quant à lui le morphotype le plus difficile à obtenir et à maintenir en laboratoire (**figure 32C-D**). Par exemple, une carence nutritive induit la mort des cellules triradiées (De Martino et al. 2007). A l'exception du nombre de bras vacuolaires qui les distinguent, les deux morphotypes fusiforme et triradié possèdent une organisation cellulaire similaire (Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009). La présence de ces bras vacuolaires leur confère une flottabilité qui leur permet un mode de vie planctonique. Les cellules de ces deux morphotypes présentent un chloroplaste central qui occupe une large partie du volume intracellulaire ainsi qu'un pyrénéoïde traversé par deux thylakoïdes (**figure 32 B-D**) (Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009). Les autres organites constitutifs de la cellule sont le noyau dont l'enveloppe nucléaire est reliée au réticulum endoplasmique (entourant le chloroplaste), la mitochondrie et l'appareil de golgi.

La composition biochimique de la paroi cellulaire de ces deux morphotypes est équivalente. Les principaux constituants organiques sont des protéines, des lipides et des polysaccharides constitués d'arabinose, de fucose, de galactose, de glucose, de rhamnose, de xylose, d'acide mannuronique et de *N*-acétylglucosamine (Gügi et al. 2015) ainsi que des glucuronomannanes sulfatés (Ford et Percival 1965). L'ensemble de ces constituants permet le maintien de la forme géométrique des cellules (Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009; Gügi et al. 2015). La paroi cellulaire est constituée de trois couches d'épaisseurs variables : une couche externe organique (3 nm) ondulée qui présente des arrêtes siliciées (**figure 33**), une couche intermédiaire minérale silicifiée (Gügi et al. 2015) qui présente une épaisseur variant de 4 à 6 nm et une couche organique interne fibreuse (3nm) composée de polysaccharides poly-anioniques (Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009) linéaires d' α -mannanes arborant des résidus d'acide β -glucuronique et des esters de sulfate (Le Costaouëc et al. 2017).

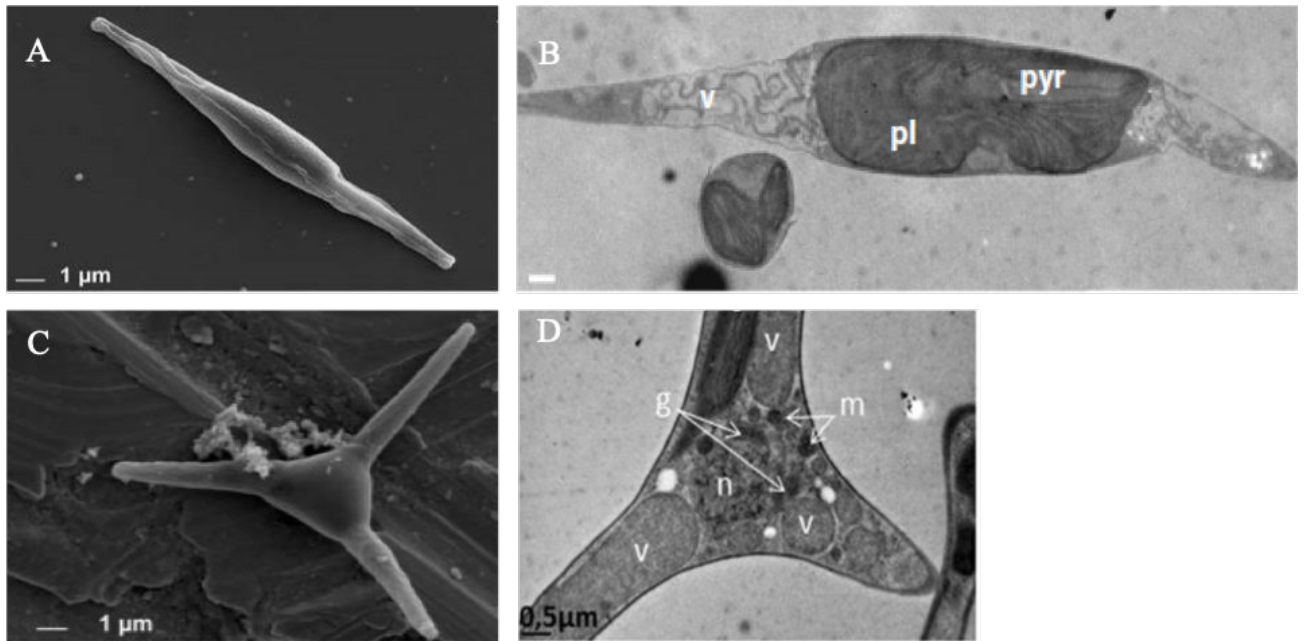


Figure 32 : Organisation structurale des cellules fusiformes et des cellules triradiées.

(A-C) Photographies prises en microscopie électronique à balayage ; (C-D) Photographies prises au microscope électronique à transmission. v : vacuole, pl : chloroplaste, pyr : pyrénioïde, n : noyau, m : mitochondrie, g : appareil de Golgi. Adapté de Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009 ; De Martino et al. 2011 ; Ovide et al. 2018



Figure 33 : Organisation structurale de la paroi cellulaire des cellules fusiformes observée en microscopie électronique à transmission.

La paroi cellulaire (CW) et le plasmalemme (PI) présentent une épaisseur de moins de 0 ;1 µm. (Reimann et Volcani 1967).

3. Le morphotype ovale : un morphotype qui semble plus adapté aux stress

La classification de *Phaeodactylum tricornutum* dans les diatomées est liée à la présence d'un frustule silicifiée chez le morphotype ovale bien qu'absent chez les deux autres morphotypes (De Martino et al. 2007). Toutefois, les deux thèques constitutives du frustule ne sont pas pour autant biochimiquement identiques, l'une étant silicifiée et l'autre étant organique (Willis et al. 2013). Cette forme est celle qui se rapproche le plus des autres diatomées car elle est caractérisée par la présence d'une fente longitudinale et médiane que l'on appelle le raphé (**figure 34**) (Martino et al. 2007). L'absence de bras vacuolaires dans le morphotype ovale peut expliquer que sa vitesse de sédimentation soit plus grande que celle des deux autres morphotypes, expliquant ainsi son mode de vie benthique. Les cellules ovales peuvent de cette manière être cultivées en milieu liquide en phase stationnaire ou sur milieu solide. Le pourcentage de silice présent dans les cellules du morphotype ovale est identique à celui des cellules fusiformes (0,4-0,5 % de la masse sèche) (De Martino et al. 2011). Cependant chez les cellules ovales, la silice est principalement utilisée pour la formation du raphé ce qui expliquerait sa sensibilité à une carence en silice (croissance réduite de 50%) (De Martino et al. 2007). Le morphotype ovale se caractérise par la production d'un mucilage constitué d'EPS (**figure 35**) qui confère aux cellules la capacité d'adhérer à certains substrats (roches, flasques de culture) (Willis et al. 2013). Des études ont aussi mis en avant que l'excrétion de ces EPS dans le milieu favorisait la formation de colonies par agrégation cellulaire (Stanley et Callow 2007). C'est par le biais de l'étude de ces colonies que deux différents types de cellules ovales ont été découverts : des cellules ovales et allongées lorsque les conditions de culture sont favorables et de petites cellules rondes lorsque les conditions sont plutôt défavorables (Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009).

Au niveau de la structure pariétale, la composition monosaccharidique semble similaire à celle des deux autres morphotypes (Willis et al. 2013).

Le transcriptome du morphotype ovale montre aussi des différences de régulation de gènes par rapport aux deux autres morphotypes : moins de 1 % des gènes sont différemment exprimés entre les morphotypes fusiformes et triradiés, tandis que 22 % et 29 % des gènes sont différemment exprimés lorsqu'on compare l'ovale au fusiforme et l'ovale au triradié respectivement (Ovide et al. 2018). Ces différences s'expliquent par une augmentation de l'expression de certains gènes d'environ 65% chez le morphotype ovale (Ovide et al. 2018). Par exemple, certains gènes impliqués dans des voies de biosynthèse telles que celle des triglycérides, des acides nucléiques ainsi que celle du glucuronomannane semblent plus actifs chez le morphotype ovale. Il est donc possible d'envisager que le morphotype ovale soit le plus actif

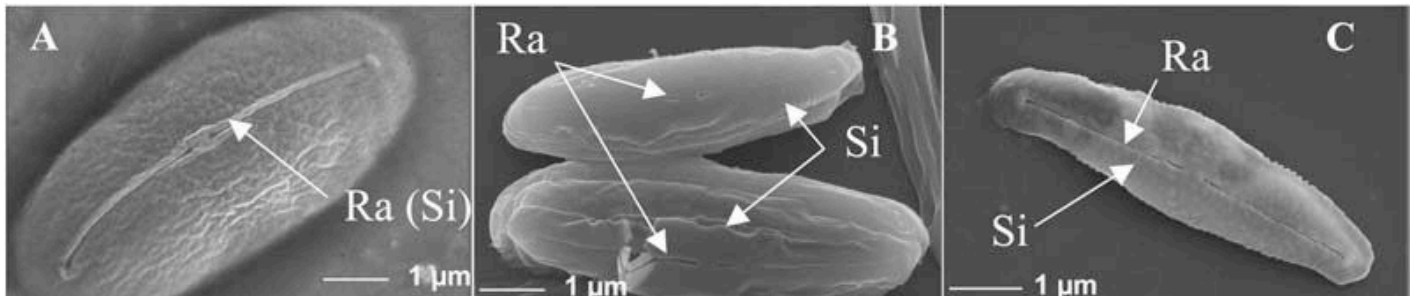


Figure 34 : Photographies de cellules ovales avec différents degrés de silicification (microscopie électronique à balayage).

(A) seul le raphé est silicié (B) la valve entière est siliciée (C) stade intermédiaire entre A et C (Tesson, Gaillard, et Martin-Jézéquel 2009)

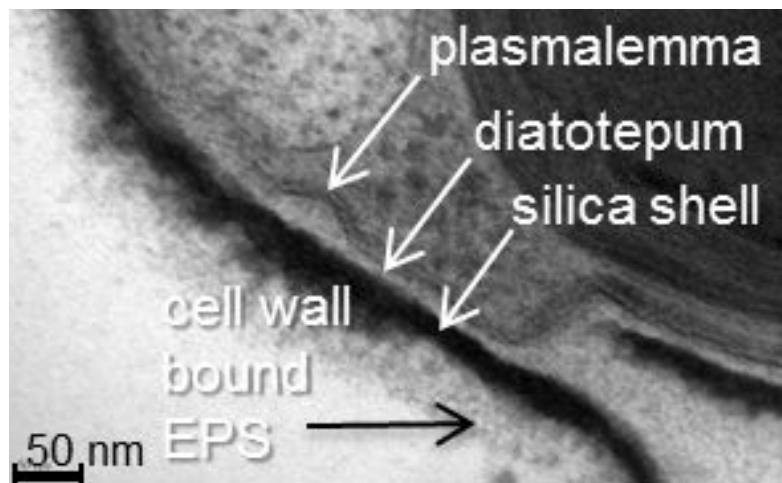


Figure 35 : Organisation structurale de la paroi des cellules du morphotype ovale observée en microscopie électronique à transmission

EPS: exo-polysaccharides (Gügi et al. 2015).

métaboliquement et que ces variations métaboliques soient associées à des mécanismes de résistance aux stress. L'augmentation de l'activité de la voie de biosynthèse du glucuronomannane, polysaccharide majoritaire de la paroi cellulaire de *P. tricornutum*, peut ainsi suggérer que le morphotype ovale possède une paroi cellulaire plus épaisse rendant ainsi les cellules plus résistantes aux stress (Ovide et al. 2018).

4. *Phaeodactylum tricornutum* : production de biomolécules

Phaeodactylum tricornutum est une microalgue capable d'exercer une pression sur la microflore environnante par le biais d'une importante excrétion de métabolites.

Pour se défendre, *P. tricornutum* synthétise des composés allélopathiques capable d'inhiber la croissance d'autres microalgues telle que *H. akashiwo* (Wang et al. 2016) ou de bactéries marines ou animales (*Staphylococcus aureus*) (Desbois, Walton, et Smith 2010). La synthèse de ces composés a été reportée comme étant plus intense chez les cellules fusiformes (Desbois, Walton, et Smith 2010). Ceci s'expliquerait par la nature lipidique de ces composés puisque l'activité antimicrobienne semble reliée à la présence de certains acides gras tels que l'acide hexadécatriénoïque (HTA) toxique pour le pathogène *Listonella anguillarum* (Desbois et al. 2008), l'acide palmitoléique (PA) et l'eicosapentaénoïque (EPA) qui inhibent la croissance de bactéries Gram +/ Gram - (Desbois, Mearns-Spragg, et Smith 2009). L'une des hypothèses serait que les cellules fusiformes, qui contrairement aux cellules ovales ne possèdent pas de paroi en silice, auraient un contenu lipidique plus important et donc des quantités d'EPA, de HTA et de PA plus élevées. Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus par Prestegard et al. 2015 qui démontrent quant à eux une activité antimicrobienne plus importante pour les cellules ovales avec des teneurs en PA plus élevées. Une étude comparative du transcriptome des 3 morphotypes de *P. tricornutum* a également démontré que la voie de biosynthèse des lipides était favorisée chez le morphotype ovale en raison d'une diminution de l'expression de gènes associés à la dégradation des acides gras (Ovide et al. 2018).

P. tricornutum est également capable de synthétiser des molécules connues pour exercer une activité antimicrobienne chez les végétaux supérieurs (Prestegard et al. 2015; Buhmann et al. 2016). Par exemple, des composés organiques volatils (VOCs) tels que l' α 1.8 cineole, l' α -pinène et le limonène ont été identifiés chez *P. tricornutum* et en quantité plus importante chez le morphotype ovale (Prestegard et al. 2015). De manière complémentaire, *P. tricornutum* est capable d'induire la synthèse de protéines de type β (1-3)-glucanases ainsi que des ROS qui sont

également synthétisés chez les plantes supérieures en réponse à une attaque pathogène (Buhmann et al. 2016).

En raison de la distribution mondiale des diatomées et plus particulièrement de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*, il est possible d'imaginer que cette microalgue a développé des stratégies de défense lui permettant de lutter contre ses agresseurs. La présence de molécules bioactives à activité antimicrobienne ainsi que des réactions de défenses similaires à celles observées chez les végétaux supérieurs viennent renforcer cette idée. De plus, la présence d'EPS pouvant être sulfatés et la présence de chrysolaminarine suggèrent que des extraits de *P. tricornutum* puissent avoir une activité SDP chez les végétaux supérieurs. Cette hypothèse est à l'origine de ce projet de thèse.

Objectifs de l'étude

Ce projet de thèse traite de la capacité des microalgues à induire des réponses immunitaires chez les plantes. Dans un objectif de réduction des intrants en agriculture et plus particulièrement des pesticides, le recours à l'utilisation de molécules naturelles pour l'induction des défenses chez les plantes représente une alternative durable aux produits phytosanitaires. Les algues sont déjà utilisées dans le secteur agricole en tant que SDP mais à ce jour la valorisation des microalgues comme nouvelle source de molécules SDP reste encore peu étudiée. La microalgue modèle *Phaeodactylum tricornutum* est actuellement l'une des diatomées les plus étudiées en raison de sa facilité de culture et de son pléomorphisme qui lui procure une grande adaptabilité. Elle est aussi connue pour synthétiser des molécules bioactives possédant une activité antimicrobienne contre de potentiels agresseurs (bactéries, microalgues marines). La présence d'une telle diversité physiologique et métabolique au sein d'une seule et même espèce ainsi que sa proximité avec les algues brunes, nous laisse penser que *Phaeodactylum tricornutum* pourrait être la candidate idéale pour la production de molécules élicitrices pour la défense des plantes.

Ce travail a donc pour objectif l'étude du potentiel d'une culture de *Phaeodactylum tricornutum*, à induire des réactions de défense chez les plantes.

Nous essaierons de répondre à plusieurs questions :

- L'application d'un homogénat de cellules broyées de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum* peut-il induire des réponses immunitaires, ou à défaut stimuler la croissance des plantes ? Si oui, quels sont les impacts d'un tel traitement sur le métabolisme des plantes ?
- L'application d'un extrait de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*, en préventif, peut-il ralentir la progression d'une maladie sur des plantes agronomiques ?
- Est-ce que les 3 morphotypes de *Phaeodactylum tricornutum* présentent les mêmes capacités d'induction des mécanismes de défense ?

- Existe-t-il des différences de régulation protéique entre les trois morphotypes (fusiforme, ovale et triradié) d'un même génotype Pt3 permettant d'expliquer les différentes capacités d'induction de ces morphotypes ?

Dans un premier temps, les extraits de microalgue seront appliqués sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* qui présente l'avantage d'avoir une croissance rapide et pour laquelle il existe plusieurs outils de criblage (GUS, YFP). Les extraits seront également testés sur des pathogènes de plante afin de vérifier l'absence ou la présence d'un effet biocide.

Dans un second temps, si les extraits montrent un effet inducteur des mécanismes de défense sur les plantes transformées GUS/YFP, des analyses moléculaires et biochimiques seront effectuées dans le but de caractériser plus finement les réponses immunitaires de la plante. Des tests d'infections seront réalisés dans le but d'étudier l'effet inducteur des défenses en présence d'agents pathogènes.

Matériels et Méthodes

Tableau I : Composition du milieu nutritif Conway et de la solution silicatée.

La solution principale, la solution de métaux et la solution de vitamines sont préparées séparément. Leurs compositions sont indiquées dans le **Tableau** ci-dessous. Le milieu de Conway est composé de 1 L de solution principale additionnée de 1 mL de solution de métaux et de 0,1 mL de solution de vitamines. Après homogénéisation, le milieu de Conway et la solution silicatée sont stérilisés par filtration sur filtre 0,2 μm . Les milieux EDM 100% ou EDM 10% sont d'abord filtrés sur filtre 0,45 μm puis stérilisés par autoclavage et sont ensuite complétés de la manière suivante : pour 1 litre de milieu EDM, 1 mL de solution de Conway et 2 mL de solution silicatée sont ajoutés stérilement (colonne de gauche du Tableau).

	Solutions	Composé	Quantité
Milieu Conway (1mL.L⁻¹)	Solution principale (qsp 1L)	Na ₂ EDTA	45 g
		NaNO ₃	100 g
		H ₃ BO ₃	33,6 g
		NaH ₂ PO ₄	20 g
		MnCl ₂	0,4 g
	Solution de métaux (qsp 1 mL)	FeCl ₃	1,3 g
		ZnCl ₂	21 mg
		CoCl ₂	20 mg
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	9 mg
	Solution vitaminique (qsp 100 mL)	CuSO ₄	20 mg
Vitamine B12 (cyanocobalamine)		10 mg	
	Vitamine B1 (Thiamine chlorhydrate)	200 mg	
Silice (2mL.L⁻¹)	Solution silicatée (qsp 1L)	Na ₂ SiO ₃ 5H ₂ O	40 g

I. Production d'extraits issus de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*

1. Obtention des souches de *P. tricornutum* et des morphotypes

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés sur des cellules de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* issues de la souche axénique Pt1.8.6 (CCAP1055/15) dont le morphotype majoritaire est le morphotype fusiforme et de la souche Pt3 (CCAP1052/1B), non axénique. Les cultures de la souche Pt3 sont enrichies dans l'un ou l'autre des morphotypes ovale, fusiforme ou triradié. La souche Pt1.8.6 a été fournie par l'association écossaise pour les sciences marines et est disponible sur commande (<https://www.ccap.ac.uk>) tandis que la souche Pt3 a été généreusement fournie en 2010 au laboratoire, par le Dr C. Bowler de l'Ecole Normale Supérieure de Paris. L'obtention de cellules de forme ovale est réalisée par étalement du morphotype fusiforme de la souche Pt3 sur un milieu solide gélosé (1% v/v bacteriological agar) eau de mer (EDM) 10 % (3,3 g sel marin Instant Ocean) complétement avec une solution silicatée et un milieu nutritif Conway dont la composition est disponible dans le **Tableau I**. Les cellules ovales obtenues sont ensuite mises en culture dans un milieu liquide EDM 10% complétement. Les cultures enrichies en cellules triradiées ont été obtenues lors de la thèse de Bérengère Hamonic (Baïet Hamonic 2013) à partir de cellules fusiformes issues de la souche Pt3 en milieu liquide EDM 100% complétement.

2. Conditions de culture de *P. tricornutum*

Les cellules fusiformes et triradiées sont mises en culture dans un milieu EDM 100% complétement tandis que les cellules ovales sont mises en culture dans un milieu EDM 10% complétement afin de maintenir le morphotype ovale. Les cultures de *P. tricornutum* sont entretenues par repiquage de 20 mL des cultures en phase stationnaire pour les cellules fusiformes et triradiées ou ovales dans 200 mL de milieu frais (EDM 100% ou 10%). Les cultures des cellules fusiformes Pt1.8.6 sont maintenues axéniques dans des flasques de culture (Thermo Scientific™ EasyFlasks™) puis les cellules sont cultivées à raison d'un volume total de 250 mL dans des flacons de 1 L avec un bouchon à vis contenant une membrane Pyrex™ afin de réduire les risques de contaminations. Les flasques sont positionnées à l'horizontale et sous agitation orbitale à 150 rpm dans une enceinte régulée à 19°C sous une irradiation de 20 $\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode d'alternance jour-nuit de 16 h et 8 h, respectivement.

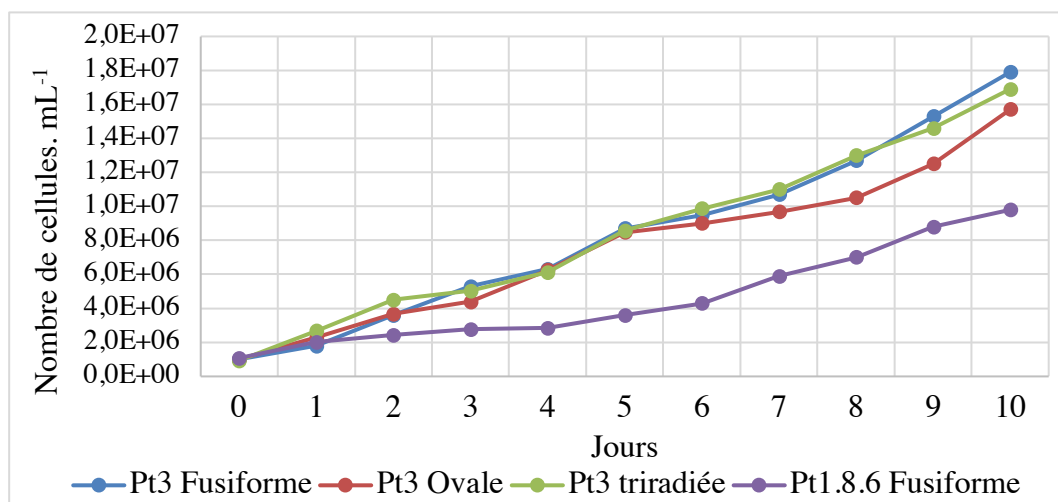


Figure 36 : Cinétique de croissance des trois morphotypes de la souche Pt3 (fusiforme, ovale et triradié) et de la souche Pt1.8.6 morphotype fusiforme.

Les cellules Pt3 fusiformes, triradiées et ovales ont été cultivées dans des bouteilles de 1L à raison d'un volume total de culture de 850 mL avec un système de bullage dont le débit est régulé à 0,83 L.min⁻¹ comme décrit précédemment dans Ovide et al., 2018.

Dans les deux systèmes de culture, les cultures sontensemencées à une densité cellulaire de 1.10⁶ cellules. mL⁻¹ et le dioxyde de carbone (CO₂) est la seule source de carbone disponible pour les cellules algales. Au cours de ces travaux, les cellules ont été récoltées lorsque les cultures atteignent une densité cellulaire d'environ 1.10⁷ cellules. mL⁻¹ soit environ 7 jours pour les morphotypes de la souche Pt3 et 11 jours pour les cellules fusiformes de la souche Pt1.8.6 (**figure 36**).

3. Production des extraits de microalgues

a) Les homogénats d'algues broyées

Les cultures liquides (850 mL) de *P. tricornutum* (1.10⁷ cellules. mL⁻¹) sont réparties dans des tubes de 50 mL et centrifugées à 4500 g à température ambiante (T°_{amb}) pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées 1 fois avec de l'EDM 10% stérile quel que soit le morphotype, puis rincées 2 fois avec de l'eau déionisée stérile. Le culot est ensuite repris dans de l'eau déionisée stérile de façon à obtenir une densité de 5.10⁸ cellules. mL⁻¹. Par exemple, le culot de 100 mL d'une culture à 10⁷ cellules. mL⁻¹ est repris dans 2 mL d'eau déionisée. Les cellules sont ensuite broyées au Fastprep dans des tubes Lysing Matrix D (MP Biomedicals) pendant 12 cycles de 30 secondes à 6,5 m.s⁻¹ avec une étape de refroidissement dans la glace tous les 2 cycles de broyage.

b) Obtention de résidus insolubles dans l'alcool (AIR) à partir de cellules de *P. tricornutum*

Les cultures liquides (0,5 à 1L) de *P. tricornutum* (1.10⁷ cellules. mL⁻¹) sont réparties dans des tubes de 50 mL et centrifugées à 4500 g à température ambiante (T°_{amb}) pendant 5 minutes. Les cellules de *P. tricornutum* sont lavées 3 fois avec du milieu EDM stérile 100% ou 10% selon le morphotype majoritaire cultivé. Chaque culot cellulaire est ensuite repris dans 1mL d'éthanol 70% puis broyé au Fastprep pendant 12 cycles de 30 secondes à 6,5 m.s⁻¹ avec une étape de refroidissement dans la glace tous les 2 cycles de broyage. Les cellules broyées sont ensuite transvasées dans un tube de 50 mL et centrifugées à 5000 g pendant 15 minutes. Le broyat est resuspendu dans 50 mL d'éthanol 70% puis incubé 1h à 70°C sous agitation. Une étape de décoloration du surnageant est ensuite effectuée par des lavages successifs avec de

l'éthanol 70% jusqu'à décoloration du culot. Le culot décoloré est ensuite resuspendu dans un mélange méthanol : chloroforme (1 : 1) puis incubé sur carrousel à T°_{amb} pendant 1h. La suspension est centrifugée à 5000g pendant 15 minutes et les culots sont repris dans 50 mL d'acétone pur et incubés à T°_{amb} toute la nuit sur carrousel. Après centrifugation, le culot est séché sous rampe à air. Le résidu sec ainsi obtenu représente les résidus insolubles dans l'alcool appelés (AIR).

- **Analyse de la composition monosaccharidique des AIR de *P. tricornutum* par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)**

Une masse de 1 mg d'AIR est pesée et mélangée à 50 µL d'inositol 2 mM utilisé comme standard interne pour le dosage des monosaccharides. L'eau est évaporée sous flux d'air sec puis 250 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) 2M sont ajoutés sur le résidu sec. L'hydrolyse au TFA est effectuée par chauffage pendant 2 h à 110°C. L'acide est évaporé sous rampe à air et les résidus sont lavés avec 500 µL d'une solution à 50% d'alcool isopropylique. L'eau est éliminée par lyophilisation. Les lyophilisats sont repris dans 200 µL de méthanol-HCl 1M et incubés 16 h à 80°C. Cette étape permet la transformation de tous les résidus monosaccharidiques en méthylglycosides libres. Le méthanol-HCl est ensuite évaporé sous flux d'air et les résidus sont lavés 2 fois avec 1 mL de méthanol puis séchés sous flux d'air afin d'éliminer toute trace d'acide. Les échantillons sont dérivés par ajout de 200 µL du réactif de silylation hexaméthylidisilazane/triméthylchlorosilane/ pyridine (3 : 1 : 9) puis chauffés à 110°C pendant 20 minutes. Les méthylglycosides seront ainsi transformés en triméthylsilyl glycosides (TMS). Par la suite, les résidus TMS sont lavés 2 fois avec 1 mL de cyclohexane. Après séchage, les dérivés sont repris dans 1 mL de cyclohexane. Un volume de 1 µL d'échantillon sera injecté pour être analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur FID permettant la détection des composés carbonés. L'identification et la teneur de chaque ose sont déterminées par comparaison avec des monosaccharides standards connus et quantifiés en tenant compte du standard interne (inositol) et des facteurs de réponses obtenus par les courbes de calibrations réalisées avec les standards externes (arabinose, rhamnose, xylose, fucose, acide glucuronique, mannose, galactose, acide galacturonique, galactose, mannitol). Les résultats obtenus pour chaque monosaccharide sont exprimés en pourcentage relatif par rapport à l'ensemble des monosaccharides identifiés.

II. Préparation des extraits AIR et des homogénats

Suite à des travaux préliminaires, réalisés au laboratoire, portant sur l'effet éliciteur des AIR, nous avons essayé de comparer les effets AIR/homogénats de microalgues broyées.

1. Les AIR

Les fractions AIR sont reprises dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO 100%) à une concentration de 100 mg. mL⁻¹ et traitées par sonication pendant 10 minutes. Le DMSO est un solvant classiquement utilisé pour solubiliser les molécules et qui permet d'améliorer la pénétration des molécules dans les cellules animales ou végétales (Sciuchetti 1967). Les fractions AIR sont ensuite diluées dans de l'eau déionisée pour être utilisées à une concentration finale de 0,1 mg. mL⁻¹. La teneur finale en DMSO dans cette préparation est ainsi réduite à une valeur de 0,1%

2. Les homogénats de microalgues broyées

Entreprendre une analyse comparative des effets d'une préparation biologique telle qu'un homogénat ou un extrait, nécessite une phase de « calibration » afin de « reproduire » la quantité de matière appliquée lors des traitements de plante d'une préparation à l'autre. Afin de standardiser la quantité de matière obtenue par rapport au nombre de cellules algales récoltées, chaque culture a été dénombrée et des culots cellulaires de 50 mL de culture ont été récoltés après centrifugation. Les culots, repris dans 1 mL d'eau déionisé, ont été lyophilisés puis pesés pour faire le lien entre la biomasse et le nombre de cellules. L'objectif consiste en quelque sorte à « titrer » par la suite l'homogénat de chaque préparation.

La densité cellulaire de la culture initiale est estimée par numération *via* le compteur cellulaire Invitrogen™ Countess™ II FL. Les cultures étant récoltées lorsque la densité cellulaire atteint 1.10⁷ cellules. mL⁻¹, un culot de 50 mL de culture contient donc 5.10⁸ cellules. Après des étapes de lavage et de broyage, le culot cellulaire est repris dans 1 mL d'eau déionisée, puis homogénéisé et lyophilisé. D'après les résultats massiques obtenus, 1 mL d'un culot cellulaire à 5.10⁸ cellules. mL⁻¹ issu de 50 mL de culture à 1.10⁷ cellules. mL⁻¹ correspond une masse de matière d'environ 10 mg. mL⁻¹.

Dans le cadre de ce projet de thèse, le choix de l'espèce végétale s'est porté sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* en raison de sa facilité de culture (cycle de reproduction rapide, facilité de production du matériel végétal) et des nombreux outils génétiques disponibles pour cette espèce comme les mutants avec constructions GUS et YFP (voir plus loin). Les effets éliciteurs des préparations de microalgues ont d'abord été évalués sur *Arabidopsis thaliana* et leur efficacité de protection également testée sur la légumineuse *Pisum sativum* en raison de son intérêt agro-alimentaire et de sa production importante en région Normandie.

III. Préparation du matériel végétal : Stérilisation des graines et conditions de culture in vitro

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) écotype Col-0 sont stérilisées dans 1 mL d'éthanol 70% pendant 5 minutes puis 2 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium (6 mM). Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau déionisée stérile avant d'être semées sur un milieu nutritif gélosé (milieu Arabidopsis Duchefa 11,82 g.L⁻¹, nitrate de calcium 1 M 0,2% (v/v), agar bactériologique 1%, pH 5,8). Les boîtes sont scellées avec du ruban adhésif semi-perméable (Anapore) pour prévenir l'assèchement du milieu et permettre les échanges gazeux. Les semis subissent une stratification de 48 h à 4°C afin de synchroniser la germination puis les boîtes sont placées à la verticale en chambre de culture sous une photopériode de 16 h-jour et 8 h-nuit avec un éclairage de 20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ à 21°C.

De façon identique, les graines de Pois (*Pisum sativum* cv Le Normand - Mangetout) sont stérilisées en ajustant les temps de rinçage pour l'éthanol (10 minutes), le bain dans la solution d'hypochlorite de sodium (10 minutes) et les rinçages à l'eau déionisée (8 heures). Les graines sont ensuite semées sur un milieu nutritif gélosé (milieu Murashige et Skoog 4,30 g.L⁻¹, agar bactériologique 1%, pH 5,6). Les semis sont placés dans les mêmes conditions de culture que les plantes d'*A. thaliana*.

IV. Vérification de l'absence d'effet phyto-toxique des homogénats et des extraits AIR de *P. tricornutum* sur des plantes d'*A. thaliana* et de *P. sativum*

Dans des conditions optimales de croissance, en absence de stress, l'énergie d'une plante est principalement allouée à sa croissance et à son développement. Lors d'un traitement par un éliciteur, une partie de l'énergie allouée à la croissance et au développement de la plante est détournée vers l'activation de mécanismes de défense qui peuvent être très coûteux en énergie. La production de biomasse peut-être directement impactée contribuant à une limitation des rendements. Dans un contexte de production agronomique, une limitation des rendements

en l'absence de stress ne peut pas être envisagée. Il convient donc d'appliquer l'éliciteur à une dose suffisante pour stimuler l'immunité des plantes sans altérer, la croissance et le développement de manière drastique. A noter qu'une trop forte concentration en éliciteur peut même avoir des effets toxiques pour la plante. L'objectif de cette partie du travail est donc de déterminer la dose d'homogénat de microalgues à appliquer sur les plantes sans modification des indicateurs liés à la croissance (germination et production de biomasse). Pour l'ensemble des expériences réalisées ci-dessous, l'effet des différents traitements sera comparé à celui d'un traitement par le l'eau déionisée comme contrôle négatif.

1. Effets des homogénats et des extraits de microalgues sur le taux de germination

Dix μL d'homogénats ou d'extrait AIR de *P. tricornutum* (10 mg. mL^{-1} , 2 mg. mL^{-1} ou AIR $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$) sont appliqués directement sur les graines afin d'évaluer l'effet potentiel sur le taux de germination. Le nombre de graines germées est comptabilisé après 4 jours de culture pour les différents traitements. La résistance ou la sensibilité aux extraits est évaluée en comparant le taux de germination des graines traitées par rapport au taux de germination des graines non traitées. La moyenne du nombre de graines germées issues de trois réplicats biologiques par rapport au nombre total de graines semées est ainsi calculée.

2. Effets des homogénats et des extraits sur la longueur racinaire, la production de biomasse et le taux de chlorophylle

La croissance et la production de biomasse ont été évaluées par mesures de la taille des racines et des mesures de la biomasse foliaire et racinaire produites à l'issue des différents traitements.

Après 7 jours de croissance des plantules d'*A. thaliana* et de *P. sativum*, les racines des plantules sont traitées avec les homogénats ou extraits de *P. tricornutum* afin d'évaluer leur effet sur la croissance racinaire. Les homogénats ou extraits de *P. tricornutum* (10 mg. mL^{-1} , 2 mg. mL^{-1} ou AIR $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$) ($10 \mu\text{L}$) sont appliqués sur toute la longueur racinaire et la croissance racinaire est suivie pendant 7 jours après application. Les racines sont scannées et la longueur de la racine principale est mesurée *via* le logiciel ImageJ 1.52o. Pour cela, un trait de 1 cm est tracé sur les boîtes de culture afin de définir une échelle sur les images numériques. Une ligne est tracée entre les extrémités de cette échelle à l'aide de l'outil « straight line ». La longueur de la ligne (en pixels) est ensuite convertie en longueur physique (en cm) *via* l'outil Analyse/Set scale en indiquant l'unité de mesure et la longueur dans la case « known distance ». Les racines sont ensuite mesurées en utilisant l'outil « segmented line ».

Après 11 jours de traitement, les productions de biomasses foliaire et racinaire sont évaluées, en réponse aux différents traitements, par pesée de la matière fraîche des parties respectives après section franche de la racine à la délimitation hypocotyle/racine.

En complément, la quantité de chlorophylle contenue dans les feuilles à l'issue des différents traitements a été estimée afin d'apporter une information sur l'état de vigueur et de santé des plantes. Les teneurs en chlorophylle ont été évaluées par spectrophotométrie d'après la méthode développée par Ni, Kim, et Chen en 2009. Deux cents mg de feuilles fraîches sont récoltés et broyés à l'azote liquide puis mélangés à 2 mL d'acétone 80%. Le mélange est placé dans le noir et incubé à T°_{amb} pendant 20 minutes. Le surnageant est récupéré après centrifugation pendant 15 minutes à 4500 g à T°_{amb} et l'absorbance des échantillons est mesurée à 663 et 645 nm respectivement. Les teneurs en chlorophylles A (Ch_a) et B (Ch_b) sont calculées selon les formules suivantes :

$$Ch_a \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = [12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}] \times V/1000 \times W \text{ (Chlorophylle a)}$$

$$Ch_b \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = [22,9 \times A_{645} - 4,86 \times A_{663}] \times V/1000 \times W \text{ (Chlorophylle b)}$$

$$Ch_{a+b} \text{ (mg.g}^{-1}\text{)} = [8,02 \times A_{663} + 20,20 \times A_{645}] \times V/1000 \times W \text{ (Chlorophylle a+b)}$$

où V = volume de l'extrait (ml) et W = Poids des feuilles (g).

V. Étude de l'effet des homogénats et des extraits sur l'activation des défenses des plantes

Afin de mettre en évidence la capacité des homogénats et des extraits AIR de microalgues à induire des réponses associées à des mécanismes de défense, deux méthodes complémentaires ont été utilisées. La première méthode consiste en l'utilisation d'outils de criblage qui permettent d'obtenir une réponse rapide et à moindre coût de l'effet éliciteur potentiel des traitements. Plusieurs types de mécanismes de défense peuvent être étudiés de cette façon : la production de ROS et de callose, l'expression de gènes de défense avec des marqueurs visibles en microscopie sous le contrôle de promoteurs spécifiques. La deuxième méthode consiste en l'utilisation d'outils moléculaires, et plus particulièrement la réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (qRT-PCR), de manière à caractériser plus finement les voies de biosynthèse activées par les homogénats de microalgues.

Dans le but de s'assurer de la fiabilité des résultats, pour l'ensemble des expériences réalisées ci-dessous, l'effet des traitements a été comparé à un contrôle négatif que représente l'eau déionisée et à un contrôle positif représenté par la flagelline22 (flg22) utilisée à une concentration finale de 1 μ M. Pour rappel, la flg22 est un peptide de 22 acides aminés issu de flagelle bactérien et est l'un des éliciteurs les plus utilisés pour étudier les mécanismes de défense des plantes. Ce peptide (lot : I22BLC014A) a été synthétisé par la plateforme PRIMACEN de l'Université de Rouen Normandie. Les deux méthodes d'étude précitées ont été développées en conditions optimales de culture, c'est-à-dire en conditions contrôlées, pour éviter tout autre stress susceptible de provoquer une interaction possible dans le déclenchement de mécanismes de défense.

Les plantules d'*Arabidopsis* ont été traitées à un stade de développement précoce, après 9 jours de croissance sur milieu gélosé, de façon à obtenir des plantules ayant développé de jeunes feuilles ce qui permet de s'affranchir de certains facteurs morphologiques liés au stade de développement et à l'âge comme la présence d'une cuticule plus épaisse. Ce choix est également renforcé par le fait que les organes jeunes, n'ayant pas de barrières mécaniques (paroi cellulaire) et chimiques suffisamment développées, sont plus sensibles aux maladies.

Au moment du traitement, les plantules d'*Arabidopsis* sont transférées 24 h dans un milieu nutritif liquide (*Arabidopsis*, Duchefa) contenant les éliciteurs de façon à favoriser leur pénétration et leur absorption. Cette méthode a également été utilisée pour l'étude d'autres éliciteurs et le suivi des mécanismes de défense (de Jonge, Hofius, et Hennig 2017; Poncini et al. 2017; Pečenková, Pleskot, et Žárský 2017)

1. Lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant des protéines reportrices comme YFP et GUS sous le contrôle de différents promoteurs

Afin de suivre l'induction de gènes associés à des réactions de défense, deux types de lignées d'*A. thaliana* transgéniques ont été utilisées :

- Des lignées transformées par l'insertion du gène codant pour la production d'une protéine fluorescente jaune (YFP)
- Des lignées transformées par l'insertion du gène de la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle de différentes régions promotrices de gènes de défense.

Chaque construction GUS et YFP est spécifique d'un gène et d'une voie de signalisation.

a) Caractérisation des lignées YFP

La 1^{ère} série de lignées transgéniques comprend des plantes dont la région promotrice de certains gènes de défense : WRKY11 (At4g31550 ; 1.7 kb), MYB51 (At1g18570 ; 1.7 kb), ACS6 (At4g11280 ; 2.1 kb), AOS (At5g42650 ; 2 kb), HEL/PR4 (At3g04720 ; 2kb), ZAT12 (At5g59820 ; 2 kb), PER5 (At1g14550 ; 2 kb), ICS1 (At1g74710 ; 2.1 kb) et PR1 (At2g14610 ; 2.1 kb)) contrôle l'expression d'un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente de type *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) (les constructions seront par la suite dans ce document référencées comme suit : promoteur :: YFP). Le signal résultant de l'activation du gène rapporteur YFP, quel que soit le promoteur, est un signal fluorescent jaune à localisation nucléaire. La transformation de ces lignées transgéniques a été décrite par Poncini et *al.*, 2017 et les lignées nous ont été gracieusement fournies par le Professeur Silke Lehmann de l'université de Warwick (Royaume-Uni).

Les graines reçues ont été semées sur un substrat terreau, en conditions semi-contrôlées (16h-jour 20°C/8 h-nuit 16°C, hygrométrie 40-60%), afin de générer un stock de graines plus grand. La présence de l'insert dans les graines générées a été vérifiée par analyse génétique. Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été effectuée sur l'ADNg des plantes génitrices. Pour cela des amorces spécifiques du promoteur de chaque gène de défense et de la séquence YFP (pGVenus) ont été utilisées. Les amorces spécifiques de chaque promoteur (Forward), de la séquence YFP (Reverse) ainsi que la taille du fragment attendu sont référencées dans le **Tableau II**.

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait selon la méthode adaptée de Edwards, Johnstone, et Thompson 1991. Les feuilles broyées sont mélangées à 400 µL de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; 25 mM EDTA ; 0,5 % SDS). Après homogénéisation par vortex, les extraits sont centrifugés pendant 1 minute à 13 000 g à 4°C. Trois cent µL du surnageant sont mélangés à 300 µL d'isopropanol puis le mélange est incubé pendant 2 minutes à T[°]_{amb}. L'échantillon est à nouveau centrifugé pendant 1 minute à 13 000 g à 4°C puis le surnageant est éliminé. Le culot est séché puis repris dans 50 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA). Le milieu réactionnel pour la PCR a été constitué selon le protocole fourni avec la GoTaq® DNA Polymerase (Promega) (**Tableau III**).

Tableau II : Liste des amorces Forward (F-PRIMER) spécifiques de chaque promoteur et de l'amorce Reverse (R-PRIMER) associée au gène YFP avec la taille du fragment attendue lors de l'amplification.

Promoter du gène cible	Séquence oligonucléotidique	taille (pb)
F-primer		
WRKY11	5'- CCTTCTCTTGCCTCAACCAA-3'	600
MYB51	5'- CCGACGGTCAATACCAAAAA-3'	1100
ZAT12	5'- GTGTGGTACCCTCATTGCTGACGGTAG-3'	1000
ACS6	5'- ATTTGGTACCATGTCAACTAAAACCG-3'	2100
HEL	5'- GTCATCGACATCCATTGCCTC-3'	1600
ICS1	5'- TATTGGTACCTGAATTATGTTTCCTTTAAG-3'	1100
PER5	5'- CCACCAACCAAATTCATAACG-3'	700
PR1	5'- AATTGGTACCTGATATACGAAGGCGGTAC-3'	1000
AOS	5'- GGAGCTAAAAGTGCAGTCTAC-3'	900
R-primer		
pGVenus	5'- CTTGCTCACAACCTTCCTCTTC-3'	

Tableau III : Milieu réactionnel pour les réactions de PCR selon le protocole de la GoTaq® DNA Polymerase (Promega)

Component	Volume/réaction (µL)
GoTaq® Reaction Buffer 5X	4
PCR Nucleotide Mix 2.5 mM	1,6
Forward primer 10 µM	0,4
Reverse primer 10 µM	0,4
GoTaq® DNA Polymerase 5 U.µL ⁻¹	0,1
RNA/DNA	2 µL
RNase free water	qsp 20 µL

Tableau IV : Programme du thermocycleur utilisé pour les réactions de PCR

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec	40
Hybridation	58°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min/kb	
Extension finale	72°C	5 min	1

Les mélanges réactionnels sont ensuite placés dans un thermocycleur (*Veriti® 384-Well Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific*) programmé comme décrit dans le **Tableau IV** en ajustant la température d'annealing à 58°C et le temps d'extension à 2,5 minutes afin de permettre l'amplification de fragments de taille supérieure à 1 kb.

b) Observation des lignées YFP

Après 24 h de traitement (eau, flg22, homogénat 2 mg. mL⁻¹, AIR 0,1 mg. mL⁻¹) les plantules sont placées entre lame et lamelle avec de l'eau distillée et observées au microscope confocal droit à balayage laser (MCBL, Leica TCS SP8). Les images sont obtenues avec l'objectif x20 en utilisant de l'huile à immersion et un détecteur hybride qui permet d'avoir un gain constant (mode comptage de photons). La longueur d'onde d'excitation est fixée à 488 nm avec une puissance laser de 8% et la fenêtre d'émission est comprise entre 515 et 540 nm. Le logiciel LAS X Navigator a permis d'effectuer des acquisitions en Z (épaisseur de la feuille). La feuille est délimitée par un tracé géométrique afin de définir la zone de travail pour le mode automatisé. Quatre à six photos sont ensuite fusionnées (zone de recouvrement de 20 %) et lissées en utilisant le filtre smooth par le logiciel LAS X dans le but de reconstituer une image de la feuille entière. Les photos acquises sont ensuite traitées *via* imageJ en utilisant la fonction Z project (Image/Stacks/Z project) afin de générer une vue 2D de l'ensemble des photos prises suivant la profondeur de l'image (Z) et en tenant compte de l'intensité maximale du pixel. Le contraste de l'image obtenue est ajusté en fixant la valeur maximale des pixels à 74. L'opération est répétée de manière identique pour toutes les photos correspondant aux différents traitements et le promoteur YFP utilisé.

c) Caractérisation des lignées GUS

La 2^{ème} série de plantes transgéniques est une lignée dont le promoteur du gène de défense contrôle un gène rapporteur de type β -glucuronidase (GUS) qui permet de discriminer, après coloration GUS, les plantules qui ont réagi aux traitements (Jefferson, Kavanagh, et Bevan 1987). Les lignées ont été choisies d'après les travaux réalisés par Millet et al., 2010. Les graines ont été commandées auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) *via* les références suivantes N68982 CYP71A12 : GUS ; N68983 MYB51 : GUS ; N68984 WRKY11 : GUS ; N6357 PR1 : GUS ; N6506 PDF1.2a : GUS.

d) Coloration histochimique des lignées GUS

La coloration GUS permet de mettre en évidence l'activité enzymatique de la β -glucuronidase. Après 24 h de traitement avec les homogénats ou extraits, les plantules sont incubées directement dans le tampon de coloration (2 mM ferrocyanure de potassium ; 2 mM ferricyanide de potassium ; 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7 ; 0,2% Triton X100 (v/v), 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid (X-Gluc)). En présence de X-Gluc, l'enzyme β -glucuronidase (GUS) hydrolyse de la liaison β avec l'acide glucuronique ce qui entraîne la formation d'un précipité insoluble bleu. La coloration bleue devient détectable après 4 h à 37°C et à l'obscurité. Les plantules ainsi colorées de bleu sont fixées avec une solution éthanol : acide acétique (3 : 1) à 4°C toute la nuit puis ré-hydratées progressivement par des bains successifs d'éthanol de 70 % et 50 %, respectivement. Les tissus sont ensuite rendus transparents à l'aide d'une solution de soude 10 % pendant 2 minutes à 37°C avant d'être observés sous loupe binoculaire et au microscope à épifluorescence inversé.

L'ensemble des constructions utilisées au cours de ce projet de thèse est résumé dans le **Tableau V**.

2. Détection des ROS au niveau foliaire

Les plantules d'*A. thaliana*, âgées de 9 jours et cultivées sur milieu Arabidopsis gélosé sont transférées dans un milieu Arabidopsis liquide et laissées à incuber toute la nuit afin d'éviter les interférences avec la formation de ROS liée au transfert. Les éliciteurs sont ajoutés dans le milieu puis les plantules sont transférées pendant 1h30 dans une solution de bleu nitro-tétrazolium chlorure (NBT) (0,05% m/v) préparé dans du tampon phosphate (K_2HPO_4 100 mM, pH 7,5). Les plantules sont lavées 3 fois avec le tampon phosphate puis fixées pendant 2h dans un mélange éthanol : acide acétique (3 : 1) (v/v) afin d'éliminer la chlorophylle. Elles sont ensuite réhydratées progressivement avec de l'éthanol 70%, 50% et de l'eau. Un traitement à la soude 10% (m/v) pendant 1h à 37°C est enfin effectué dans le but de rendre les tissus transparents. La coloration bleu foncé est ensuite observée en réponse aux différents traitements à la loupe binoculaire. A noter qu'il a été utile d'ajouter un contrôle positif associé à un stress mécanique (pincement de la feuille avec un cône) servant de contrôle positif pour l'induction de ROS.

Tableau V : Implication des gènes de différentes constructions GUS et YFP dans les réponses de défense pouvant être associées aux voies hormonales de l'acide salicylique (SA), de l'acide jasmonique (JA) ou de l'éthylène (ET).

Type de gène rapporteur	Promoteur du gène étudié	Fonction du produit du gène	Références
Gène rapporteur β -glucuronidase (GUS)	PR1	Protéine à activité antifongique. Marqueur de SA.	Shapiro et Zhang 2001
	PDF1.2	Peptide à propriété antimicrobienne. Marqueur de la voie de JA/ET	Narusaka et al. 2009
	CYP71A12	Cytochrome impliqué dans la voie de biosynthèse de la camalexine	Millet et al. 2010
	MYB51	Facteur de transcription impliqué dans la voie de biosynthèse des glucosinolates	
	WRKY11	Facteur de transcription dans la résistance basale	
Gène codant pour la production d'une protéine fluorescente jaune (YFP)	WRKY11	Facteur de transcription dans la résistance basale	Poncini et al. 2017
	HEL	Chitinase. Marqueur de la voie de JA/ET	
	ZAT12	Protéine impliqué dans la réponse aux stress oxydatifs	
	MYB51	Facteur de transcription impliqué dans la voie de biosynthèse des glucosinolates	
	ICS1	Protéine impliquée dans la voie de biosynthèse de SA	
	PR1	Protéine à activité antifongique. Marqueur de SA.	
	AOS	Protéine impliquée dans la voie de biosynthèse de JA	
	ACS6	Protéine impliquée dans la voie de biosynthèse de ET	
	PER5	Protéine impliqué dans la réponse aux stress oxydatifs	

3. Détection des dépôts de callose dans le système racinaire et foliaire

La coloration histologique au bleu d'aniline est réalisée selon le protocole de Millet et al., (2010) avec quelques modifications. Les plantules traitées pendant 48h avec les molécules testées sont fixées dans de l'éthanol : acide acétique (3 : 1) (v/v) pendant 2 h afin d'éliminer toute trace de pigments, puis réhydratées progressivement par des bains d'éthanol 70%, 50% et 25% pendant 2 h. Elles sont ensuite placées dans de l'eau sur la nuit. Un traitement à la soude 10% (m/v) à 37°C pendant 1 h est réalisé dans le but de rendre les tissus transparents. Ce traitement est ensuite suivi de 3 lavages à l'eau. Enfin, les plantules sont incubées dans une solution de bleu d'aniline 0,1% (m/v) (150mM K₂HPO₄, pH 12, 4°C). Les dépôts de callose sont observés au microscope confocal droit à balayage laser (MCBL, Leica TCS SP8) avec une longueur d'onde d'excitation de 405 nm et une fenêtre d'émission de 443-490 nm. Pour l'ensemble des conditions testées, la puissance laser est fixée à 15% et le détecteur utilisé est un détecteur hybride qui permet d'avoir un gain constant (mode comptage de photons). Le contraste de l'image obtenue est ajusté en fixant la valeur maximale des pixels à 104. La quantification des dépôts de callose est réalisée *via* le logiciel ImageJ en détectant les surfaces fluorescentes correspondant à ces dépôts. Pour cela, l'image est binarisée (8-bit) et un seuil est défini (Image/Adjust/Threshold). Les surfaces fluorescentes sont rapportées aux surfaces totales des tissus végétaux et le rapport est exprimé en unité arbitraire de fluorescence par μm^2 .

4. Étude des différents niveaux d'expression des gènes de défense par qRT-PCR

L'effet des homogénats de microalgues sur les plantules d'*A. thaliana* a été étudié au niveau moléculaire par une approche transcriptomique ciblée afin de détecter d'éventuelles modifications de l'expression des gènes de défense suite aux différents traitements. Cette deuxième approche permet de caractériser plus finement les voies de biosynthèse activées par les homogénats de microalgues *via* qRT-PCR.

a) Extraction et dosage des ARN totaux

Les plantules de 9 jours traitées avec les éliciteurs sont récoltées après 1, 3, 6 et 12 h de traitement en vue d'établir une cinétique d'expression de gènes de défense après élicitation. Trente plantules sont récoltées pour chaque condition et chaque temps. Les plantules sont placées dans des tubes à billes (FastPrep® Lysing Matrix D Tubes, MP Biomedicals) et incubées dans 400 μL d'une solution tampon de lyse LBP (kit RNA plus, Mascherey Nagel) avant d'être broyées avec l'appareil FastPrep-24TM (MP Biomedicals) (6 cycles 30 secondes à

6,5 m.s⁻¹ avec une étape de refroidissement dans la glace de 1 minute entre chaque cycle). L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 5 000 g à 4°C dans le but d'éliminer tous les débris cellulaires et le surnageant est récupéré. L'extraction d'ARN est alors effectuée en suivant les recommandations du kit RNA plus (Macherey Nagel). Toutefois, une modification du protocole est effectuée lors de la dernière étape. Cette modification consiste à éluer une première fois l'ARN avec 30 µL d'eau RNase-free puis une seconde fois avec la même solution dans le but d'obtenir la plus grande teneur en ARN possible. Les contaminations par l'ADNg sont éliminées en utilisant le kit Ambion Turbo DNA-free. Pour cela, un traitement avec la DNase est effectué sur l'ensemble de l'ARN extrait avec un volume réactionnel final de 50 µL. La concentration d'ARN est déterminée par dosage spectrophotométrique (Nanodrop 2000c spectrophotometer, Thermo Scientific) à la longueur d'onde de 260 nm. L'absence de contamination par des protéines est appréciée en analysant le rapport d'absorbance A260/A280 qui doit être compris entre 1,7 et 2,1. La qualité de l'ARN est vérifiée en utilisant le Kit ARN Série II du bioanalyseur 2100 Agilent qui permet de déterminer la concentration ainsi que l'intégrité des échantillons d'ARN. Une valeur de qualité est attribuée à l'échantillon en fonction de la valeur numérique de l'intégrité de l'ARN (ratio ARNr 25S/18S) du bioanalyseur (la valeur de 10 étant le meilleur score possible) (**figure 37**).

b) Réaction de rétrotranscription (RT) des ARN en ADNc

La RT permet la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) *via* une enzyme, la transcriptase inverse, à partir d'ARN. La synthèse d'ADNc a été réalisée selon le protocole du kit High Capacity cDNA reverse Transcription (*Applied Biosystems*) à partir de 800 ng d'ARN total. Le milieu réactionnel de la transcription inverse est détaillé dans le **Tableau VI**. Les mélanges réactionnels sont ensuite placés dans un thermocycleur (*Veriti® 384-Well Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific*) programmé de la manière suivante : 25°C pendant 10 minutes, 37°C pendant 120 minutes puis 85°C pendant 5 minutes afin d'inactiver la réaction.

c) Contrôle de la qualité de la RT par amplification PCR

Afin de vérifier le bon déroulement de la RT et l'absence d'ADNg dans les échantillons, des réactions de PCR contrôle ont été réalisées pour chaque échantillon d'ADNc en utilisant les amorces du gène de la Peroxine 5 (*PEX5*) (**Tableau VII**).

L'avantage des amorces F-Pex5 et R-Pex5 est qu'elles sont localisées sur deux exons séparés d'un intron. Les ADNc étant synthétisés à partir d'un ARNm ne sont constitués que des parties exoniques puisque les introns sont épissés de l'ARNm. Il est alors possible de vérifier

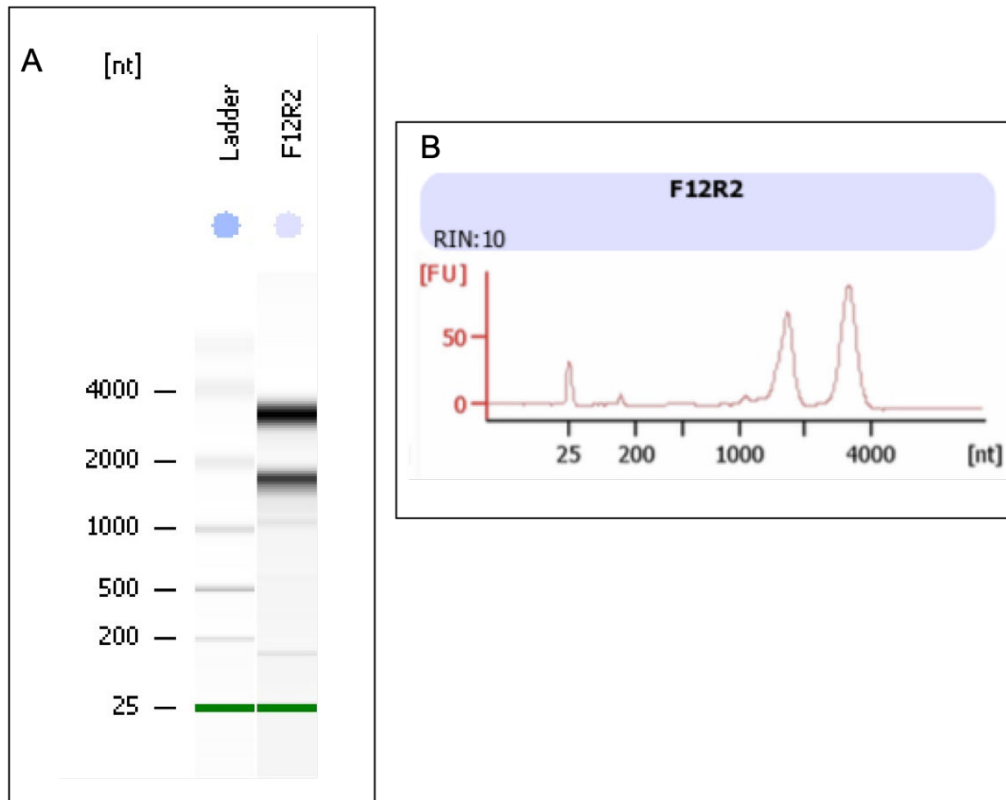


Figure 37 : Évaluation de la qualité des ARN extraits à partir de plantes entières traitées avec les éliciteurs.

(A) Les ARN 25S et 18S apparaissent à une taille de 1800 nucléotide et 3800 nucléotides sur gel d'électrophorèse. (B) Electrophorégramme associé au gel électrophorèse qui montre des pics ARN 25S et 18S. La ligne de base est lisse.

Tableau VI : Composition du milieu réactionnel utilisé pour les réactions de rétrotranscription selon le protocole du kit High Capacity cDNA reverse Transcription (Applied Biosystems)

Réactifs	Volume/réaction (µL)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
Rnase inhibitor	1
RNase free water	qsp 20 µL
RNA	800 ng

Tableau VII : Séquences oligonucléotidiques des amorces utilisées pour contrôler l'efficacité de la rétrotranscription (RT) et l'absence d'ADNg dans les échantillons (F : Forward ; R : Reverse ; *PEX5* : gène Peroxine 5).

Amorce	Séquence oligonucléotidique (5' - 3')
F-Pex5	5'-AGTGTCCAGAGTGCTGATGC-3'
R-Pex5	5'-CATGTTTGCCCAAGCACGAA-3'

Tableau VIII : Programme du thermocycleur utilisé pour les réactions de PCR

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec	40
Hybridation	60°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min/kb	
Extension finale	72°C	5 min	1

l'absence d'ADNg dans les échantillons puisque la taille du fragment PCR est différente s'il s'agit d'ADNg (exons + introns) ou d'ADNc (exons). Dans cette expérience contrôle, une extraction d'ADNg est utilisée comme témoin positif et l'eau RNase/DNase free (*MP Biomedicals, 2450-204-44982*) comme témoin négatif. Les réactions de PCR sont réalisées selon les conditions définies dans le **Tableau VIII**.

d) Oligonucléotides sélectionnés pour l'étude

▪ Choix des gènes

Le choix des gènes a été effectué en fonction de leurs rôles respectifs dans les mécanismes de défense des plantes et du temps nécessaire à leur induction en accord avec les données de la littérature (Denoux et al. 2008).

Plusieurs gènes connus pour être impliqués dans l'induction de mécanismes de défense précoces ont été sélectionnés :

- *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D* (RBOHD) est un gène impliqué dans la synthèse de ROS, et plus spécifiquement dans la production d'ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), au cours des interactions plante-pathogène.
- WRKY transcription factor 40 (WRKY40) est un facteur de transcription connu pour être rapidement et fortement induit en réponse à un stress biotique. Ce facteur de transcription semble impliqué dans la voie de biosynthèse de SA et son expression augmente après traitement par 1 mM SA (Abeyasinghe, Lam, et Ng 2019).
- WRKY transcription factor 11 (WRKY11) est un facteur de transcription connu pour être induit à la suite de la reconnaissance de MAMPs (Poncini et al. 2017)

Les gènes sélectionnés pour être impliqués dans l'induction de mécanismes de défense plus tardifs et dans des voies métaboliques spécifiques sont :

- *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLASE SYNTHASE 6* (ACS6) est un gène qui code pour une enzyme qui permet la conversion de S-adénosyl-L-méthionine (SAM) en 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, un précurseur de ET (Liu 2004).
- *CAMALEXINE SYNTHASE* (PAD3) est un gène qui code pour la synthèse d'une enzyme (cytochrome P450) impliquée dans la voie de biosynthèse de la phytoalexine : camalexine.
- *PHENYLALANINE AMONIA-LYASE 1* (PAL1) est un gène qui code pour une enzyme clé dans la synthèse des phénylpropanoïdes puisqu'elle catalyse la 1^{ère} réaction de

biosynthèse à partir de L-phénylalanine. Ces composés ont un rôle majeur dans la défense contre les organismes pathogènes.

- *ISOCHORISMATE SYNTHASE 1* (ICS1) est un gène qui code pour une protéine impliquée dans la conversion du chorismate en isochorismate, l'un des précurseurs de SA.
- *LIPOXYGENASE 3* (LOX3) est un gène qui code pour une protéine impliquée dans la peroxydation des lipides membranaires lors d'infections par des organismes pathogènes. Les dérivés oxygénés formés constituent le groupe des oxylipines dont la mieux caractérisée est JA
- *PATHOGENESIS RELATED PROTEIN-1* (Pr-1) est un gène dont l'expression est induite en réponse à des attaques pathogènes de type biotrophe et induit la production de protéines PR-1 à activité antifongique. C'est également un marqueur de SA et de la SAR.

Des gènes de références exprimés de manière stable et dans toutes les cellules de l'organisme ont été sélectionnés d'après les travaux de Kudo et *al.*, 2016. Ces gènes permettent de normaliser les taux d'expression des gènes de défense précédemment cités, afin de permettre une comparaison des différentes conditions de traitement. Les gènes de référence sélectionnés sont :

- *CYTOCHROME C1-FAMILY* (CYTC1) est un gène impliqué dans le transport des protons au travers de la membrane mitochondriale dans le but de générer un gradient électrochimique qui alimente la synthèse d'ATP.
- *MYB-LYKE TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY PROTEIN* (SWC4) intervient dans le remodelage de la chromatine.
- *PEROXIN 5* (PEX5) intervient dans la synthèse d'un récepteur protéique qui facilite la translocation des protéines dans le peroxyosome.
- *EARLY AND LATE FLOWERING 2* (ELF2) est un gène qui permet de moduler le moment de la transition végétative à la reproduction chez *Arabidopsis* en influençant le moment de la floraison.

Les séquences des couples d'amorces de l'ensemble des gènes étudiés ont été définies en utilisant le site internet NCBI/Primer-Blast tandis que les séquences du couple d'amorce PR-1 sont issues des travaux de Joglekar et *al.*, 2018. Ces séquences d'amorces sont données dans le **Tableau IX**. La capacité des couples d'amorces à amplifier les gènes sélectionnés a été vérifiée en effectuant des PCR de contrôle sur un pool d'ADNc issu de plantes non traitées et traitées

Tableau IX : Séquences des oligonucléotides spécifiques utilisés pour l'amplification par qRT-PCR des gènes de défense et de référence chez *Arabidopsis thaliana*. Les séquences de ces amorces ont été en général définies à l'aide du logiciel Primer-Blast sauf pour le couple d'amorce PR-1 et les trois gènes de références SWC4, CYTC1 et Pex5 dont les séquences d'amorces sont issues des travaux de Joglekar et *al.*, 2018 et de Kudo et *al.*, 2016.

Locus	Abréviation	Nom du gène	Séquence oligonucléotide (5'-3')	Séquence oligonucléotide (5'-3')
Gènes de défense	At5g47910	RBOHD	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D	F-CTGGACACGTAAGCTCAGGA R-GCCGAGACCTACGAGGAGTA
	At2g37040	WRKY40	WRKY transcription factor 40	F-GTGCACACTTCAGAAAGGAA R-GGCTTGTTCTTTTCGTGCTT
	At4g3155	WRKY11	WRKY transcription factor 11	F-CCACACCCACGTGGTTACTA R-ATTCCTCTGCATCGCGGGAIT
	At4g11280	ACS6	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 6	F-GGTGGTTCAGATCCCAAGGA R-TGCTCTCGCCGGATAAACTCG
	At3g26830	PAD3	CAMALEXIN SYNTHASE	F-GTGGAGTCGCTGGCATAACA R-GTCCCCCAAAGTGTGTCCGAA
	At2g37040	PAL1	PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 1	F-GTGTCCGACTTCAGAAAGGAA R-GGCTTGTTCTTTTCGTGCTT
	At1g74710	SID2	SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2	F-GAGACTTACGAAAGGAAGATGATGAG R-TGATCCCCGACTGCAAAITCACTCTC
	At1g17420	LOX3	LIPOXYGENASE 3	F-CCCGACAAAATCAICCGAGCT R-GCTCTCCGCGTCTTTATCAGA
	At2g14610	PR-1	PATHOGENESIS RELATED PROTEIN 1	F-TTCTTCCCTCGAAAAGCTCAA R-AAGGCCACCAGAGTGTATG
	At5g40810	CYTC1	CYTOCHROME C1 FAMILY	F-TGAAGATGGAACCTCCTGCAAC R-TCTCTCTTCCATCTCTGGTTCA
Gènes de référence	At2g47210	SWC4	MYB-LIKE TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY PROTEIN	F-ATCGTGAAGGGTCGTATGCC R-CCAGGACCCCTTCCGTTTTTG
	At5g56290	PEX5	PEROXIN 5	F-AGTGCCAGAGTGTGATGC R-CATGTTGGCCCAAGCACGAA
	At1g76810	ELF2	EARLY AND LATE FLOWERING 2	F-CTACCGGATGAATTATCTGTTGG R-AGACACGGCATAACAAGGCA

avec de la flg22. Une électrophorèse non dénaturante sur gel d'agarose 1% (m/v) contenant 0,05% de SafeView (Applied Biological Materials) et 0,5 X de tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) (UltraPure™ TAE Buffer 10X, ThermoFischer Scientific) est ensuite réalisée pendant 20 minutes à 135 volts sur les produits PCR afin de vérifier la présence d'une amplification. La taille des fragments obtenus est analysée grâce aux marqueurs de taille 1kb Plus DNA (Thermo Scientific) et 50 bp DNA (Thermo Scientific).

e) Principe de la qRT-PCR

La qRT-PCR est une amplification d'ADNc réalisée en présence de SYBR® green, une molécule fluorescente (excitation : 497 nm ; émission : 520 nm) qui se fixe de façon non spécifique au double brin d'ADN. La quantification du niveau d'expression du gène sera calculée en fonction du nombre de cycles nécessaires pour atteindre un seuil de fluorescence, appelé Ct (Cycle threshold), détectable par le lecteur. Le Ct est inversement proportionnel au nombre de copies de l'ADNc cible. Ainsi, plus le nombre initial de copies est élevé, plus la fluorescence sera détectée rapidement au cours des cycles successifs d'amplification et plus le Ct sera faible.

▪ Étude de l'efficacité des amorces sélectionnées

Pour valider un couple d'amorces en qRT-PCR, il est nécessaire de vérifier que celui-ci possède une efficacité d'amplification du gène supérieure à 95%. Afin de calculer cette efficacité, la préparation d'une gamme étalon est réalisée à partir d'un échantillon d'ADNc dilué au 10^{ème} afin de comparer le nombre de cycle d'écart pour chaque dilution et chaque primer. La gamme standard est réalisée sur 5 points par dilution en cascade au tiers à partir de l'échantillon d'ADNc dilué au 10^{ème}. Un contrôle négatif contenant tous les réactifs de la RT sauf la reverse transcriptase est réalisé en parallèle. Les réactions de PCR sont réalisées à partir de 3 µL de chacune des dilutions d'ADNc mélangées à 10 µL du mix réactionnel dont la composition est détaillée dans le **Tableau X**.

Les réactions de PCR sont réalisées dans une plaque 96 puits à l'aide du thermocycleur couplé à un spectrofluorimètre QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Les réactions d'amplification commencent par une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 sec, suivie d'une série de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95 °C de 1 sec et une étape de 20 s à 60 °C qui permet à la fois l'hybridation des oligonucléotides et la synthèse de l'ADN.

Tableau X : Composition du milieu réactionnel utilisé pour les expériences de qRT-PCR afin d'évaluer les niveaux de transcription des gènes de défense ou des gènes de référence.

Réactif	µl/réaction
2X SYBR Green Buffer	6,50
Forward primer (10 µM)	0,13
Reverse primer (10 µM)	0,13
Eau	3,24
ADNc dilué 10 ^{ème}	3

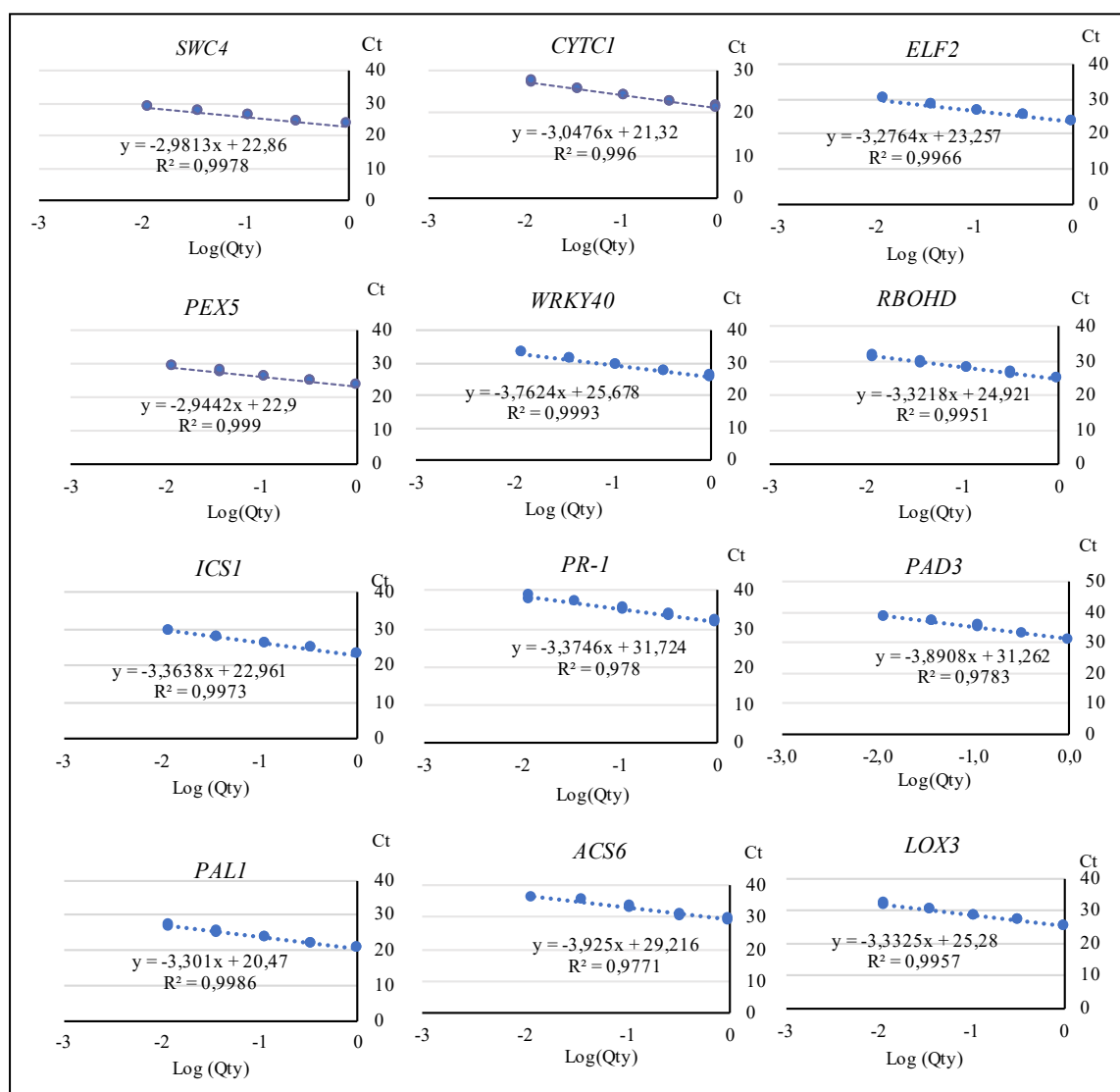


Figure 38 : Représentation graphique du Log de quantité d'ADNc en fonction de la moyenne de Ct pour chaque couple d'amorces. Les courbes sont obtenues *via* qRT-PCR par dilution en cascade au tiers à partir de l'échantillon d'ADNc dilué au 10^{ème}.

Une étape finale permet d'établir une courbe de fusion par augmentation graduelle de la température de 60 °C à 95 °C par pas de 0,5 °C toutes les 10 s. L'efficacité de la PCR, pour chaque couple d'amorces, est évaluée en exprimant la quantité logarithmique d'ADNc en fonction du Ct. Les points sont reliés par une courbe de tendance linéaire et la pente de la droite obtenue est analysée. Pour que l'efficacité de la PCR soit de 100%, la pente de la droite doit être comprise entre -2,98 et -3,65 et le coefficient de détermination doit être supérieur à 0,95. Les coefficients directeurs des courbes de tendance linéaires servent ensuite à calculer l'efficacité de chaque couple d'amorces selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité} = 10^{(-\frac{1}{a})}$$

avec a représentant le coefficient directeur de la courbe de tendance linéaire.

Pour terminer la validation des amorces, la spécificité d'amplification est également appréciée en vérifiant que la courbe de dissociation ne présente qu'un seul pic. Les résultats concernant la validation des amorces utilisées dans le cadre de ce projet sont présentés dans la **figure 38**.

- **Analyse des niveaux d'expression des gènes en réponse aux homogénats par qRT-PCR**

Les réactions de PCR sont réalisées en duplicats dans des plaques 384 puits à partir de 3 µL d'ADNc dilués au 10^{ème} mélangés au mix réactionnel (**Tableau X**). Les amplifications sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur couplé à un spectrofluorimètre QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) selon les mêmes paramètres que ceux utilisés lors de la validation des amorces. Parmi les 4 gènes de références sélectionnés, les gènes *PEX5* et *MYB* ont été retenus pour l'analyse des données car ils présentaient les meilleures stabilités d'expression selon le logiciel Normfinder (<http://moma.dk/normfinder-software>) (Andersen, Jensen, et Ørntoft 2004). Ces deux gènes serviront de références lors de la détermination de l'expression relative des gènes de défense. Les expressions relatives des gènes de défense au temps n (1h, 3h, 6h ou 12h) sont normalisées une première fois par rapport à un échantillon contrôle (T0) que représente l'eau au même temps de récolte puis une deuxième fois par rapport aux 2 gènes de références selon la formule suivante (Vandesompele et al. 2002; Schmittgen et Livak 2008) :

$$E.R = \frac{E_a^{(Ct_a T_{0n} - Ct_a S_n)}}{[E_b^{(Ct_b T_{0n} - Ct_b S_n)} \cdot E_c^{(Ct_c T_{0n} - Ct_c S_n)}]^{1/x}}$$

E.R : Expression relative.

E_a : Efficacité du couple d'amorce du gène de défense étudié.

E_b : Efficacité du couple d'amorce du gène de référence 1.

E_c : Efficacité du couple d'amorce du gène de référence 2.

C_a : Ct du gène de défense.

C_b : Ct du gène de référence 1 (PEX5).

C_c : Ct du gène de référence 2 (MYB).

T₀ : Échantillon contrôle (représenté par l'eau).

S : Échantillon testé (représenté par les différents traitements tels que la flg22 ou homogénats).

n : Temps de récolte d'intérêt (1h, 3h, 6h ou 12h).

x : Nombre de gène de référence (ici x=2).

VI. Étude de la résistance des plantes d'*A. thaliana* et de *P. sativum* après traitement avec les homogénats de microalgues.

L'étude du développement des symptômes à la suite d'une infection de la plante par un organisme pathogène permet de renseigner sur le niveau de protection induit par les homogénats de microalgues. Deux pathosystèmes ont été choisis dans le cadre de cette étude : *Arabidopsis thaliana/Pseudomonas syringae* DC3000 et *Pisum sativum/Mycosphaerella pinodes*. *Pseudomonas syringae* DC3000 (*Pst*) est une bactérie à gram négatif de type biotrophe qui infecte la tomate, son hôte naturel, mais également la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cette capacité à infecter *A. thaliana* en a fait une bactérie modèle pour l'étude des mécanismes de défenses (Xin et He 2013). *Mycosphaerella pinodes* est un champignon pathogène hémibiotrophe à l'origine de l'anthracnose du pois, l'une des maladies les plus préjudiciables. Cette maladie peut être causée par deux autres agents pathogènes. Cependant, *M. pinodes* est l'espèce la plus répandue en France et entraîne d'importantes pertes de rendement (jusqu'à 25 q/ha de pertes de rendement).

1. Résistance au pathogène bactérien *Pseudomonas syringae* DC3000 chez *A. thaliana*

a) Préparation de l'inoculum

Pst est cultivée pendant 2 jours à 28°C sur des boîtes gélosées de milieu Luria-Bertani (LB). Une colonie bactérienne est transférée dans 5 mL de milieu LB liquide pendant 5 jours et cultivé à 28°C sous agitation à 180 rpm. La veille de l'infection, la solution bactérienne est repiquée au 10^{ème} dans du milieu LB liquide puis incubée toute la nuit à 28°C et sous agitation

(180 rpm). Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 4 500 g pendant 10 minutes à T°_{amb} puis la suspension bactérienne est ajustée à 1.10^8 CFU. mL^{-1} ($D.O_{600} = 0,2$) dans de l'eau physiologique autoclavée afin d'éviter un choc osmotique.

b) Préparation du matériel végétal

Les graines d'*A. thaliana* sont semées dans des pots contenant 110 g de terreau autoclavé (terreau semi-bouturage Greenprotect) à raison de 3 graines par pots. Les pots sont ensuite placés pendant 3 semaines dans une chambre de culture avec une photopériode alternée : 16h jour à 20°C et 8h nuit à 16°C. L'hygrométrie a été contrôlée entre 40 à 60%.

c) Traitement et infection des plantes

Après 3 semaines de croissance, les plantes sont traitées par pulvérisation foliaire avec les différents éliciteurs (flg22 $1 \mu M$; homogénats Pt3 fusiforme, ovale et triradiée, $2 mg. mL^{-1}$; homogénats Pt1.8.6, $2 mg. mL^{-1}$). Un volume de 1 mL est utilisé pour 6 plantes (**figure 39**). Après traitements, les plantes sont à nouveau placées dans la chambre de culture pendant 48 heures avant infection bactérienne.

Pour l'étape d'infection, la solution bactérienne est également pulvérisée sur les plantes à hauteur de 1 mL pour 6 plantes. Afin de vérifier la concentration bactérienne pulvérisée sur les plantes, un dénombrement sur boîte a été réalisé par dilution en cascade de la solution bactérienne. Les plantes sont ensuite placées en chambre de culture. La gravité de la maladie est évaluée en comptant le nombre de feuilles présentant des symptômes par rapport au nombre de feuilles non infectées.

2. Résistance de *P. sativum* au pathogène fongique *M. pinodes*

a) Préparation de l'inoculum

La souche agressive de *M. pinodes* 91.31.12 a été gracieusement fournie par Christophe Le May de l'UMR IGEPP (Inra Le Rheu) équipe Résistance et Adaptation. Les cultures sont repiquées sur du milieu à base de jus de légumes V8 (Jus de tomates à base de concentré : 86%, jus de légumes à base de concentré : 13% (carottes, celeri, betteraves, persil, laitue, cresson, épinards), sel, extrait d'épices) stérile (30 g d'agar, 200 ml de V8, 800 ml d'eau) sous lumière blanche à 20°C avec 12h de photopériode. Le jus de légumes V8 est disponible en grande distribution. Après 10 jours de culture, la surface de la colonie est recouverte d'eau stérile (8-10 mL) et grattée à l'aide d'un étaleur afin de libérer les pycniospores de leur mucus. La solution



Figure 39 : Plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 3 semaines traitées par pulvérisation foliaire avec un volume de 1 mL d'éliciteur.

On remarque que toutes les feuilles ont été pulvérisées et que les gouttelettes d'éliciteurs restent sur les feuilles.

obtenue est filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire EASYstrainer 40 μm et les spores sont dénombrées à l'aide d'un compteur cellulaire Invitrogen™ Countess™ II FL. Le mycélium peut être conservé à 4°C sur un milieu gélosé (3% v/v bacteriological agar) malt 2% (v/v) et les spores peuvent être conservées à plus long terme dans du glycérol 15% à -80°C.

b) Préparation du matériel végétal

Les graines de Pois (*Pisum sativum* cv Le Normand - Mangetout) sont semées dans des pots contenant 300 g de terreau autoclavé (terreau semi-bouturage Greenprotect) à raison de 4 graines par pots. Les pots sont ensuite placés dans une chambre de culture avec une photopériode alternée de 16h jour à 20°C et 8h nuit à 16°C, maintenant une hygrométrie de 40-60%, jusqu'à ce que les plantes atteignent 5-6 feuilles (soit environ 15 jours). Deux méthodes permettent d'étudier la résistance du pois contre *M. pinodes* : une méthode qui consiste à traiter des organes foliaires excisés maintenus en survie sur un film d'eau et une autre qui consiste à traiter des plantes entières avec l'éliciteur étudié (Onfroy et Tivoli 2005).

▪ Test sur folioles ou stipules excisés maintenus en survie

Les tests sur stipules ou folioles détachés permettent de mettre en évidence un effet de l'éliciteur sur le développement du champignon. Les stipules ou folioles détachés sont maintenus en survie sur un film d'eau et inoculés par une goutte de suspension de spores (10 μL d'une suspension de pycniospores à 10^5 spores. mL^{-1} de la souche agressive Mp 91.31.12 âgée de 10 jours) et d'éliciteur (10 μL d'une solution à 2 mg. mL^{-1}) en alternant leur position (**figure 40**). Une goutte de solution Tween 20 est ajoutée à la solution de spores et d'éliciteur afin de permettre la fixation des gouttes sur les tissus foliaires. Les boîtes sont scellées avec du ruban adhésif semi-perméable (anapore) afin d'éviter toute évaporation et les boîtes sont à nouveau placées dans l'armoire de culture. Une quantification du développement des symptômes en fonction de l'association éliciteur-pathogène est établie. La gravité de la maladie est appréciée en mesurant tous les 2 jours la taille de la nécrose (mm) au niveau de la goutte de spores, montrant ainsi la progression du champignon dans les tissus.

▪ Test sur de jeunes plantes

Les plantes de Pois sont traitées avec les éliciteurs pendant 24 heures puis la suspension de spores (suspension de pycniospores à 10^5 spores. mL^{-1} de la souche agressive Mp 91.31.12 âgée de 10 jours) est appliquée à l'aide d'un pulvérisateur à raison de 2 mL de suspension par

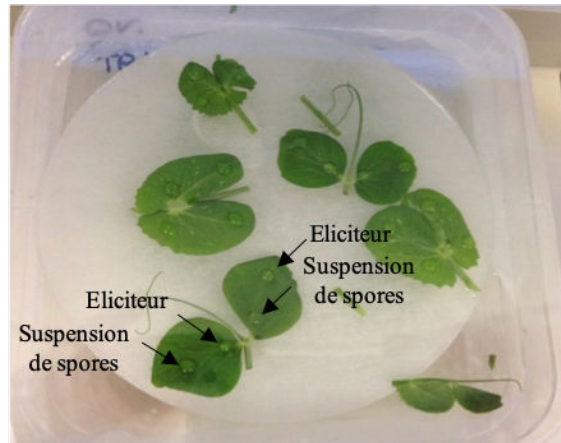


Figure 40 : Test de résistance de *P. sativum* contre l'agent pathogène *M. pinodes* sur stipules ou folioles détachés.

Une goutte de 10 μL de suspension de spores à 10^5 spores.mL⁻¹ et une goutte de 10 μL d'éliciteurs sont déposées sur les organes foliaires de façon alternée. Le développement de la maladie est ensuite évalué en suivant la progression de la nécrose à partir de la suspension de spores.



Figure 41 : Plantes de *Pisum sativum* âgées de 15 jours traitées par pulvérisation foliaire avec un volume de 2 mL d'éliciteur.

On remarque que les feuilles pulvérisées ont reçu un volume d'éliciteur suffisant puisque l'éliciteur est à la limite de ruissellement.

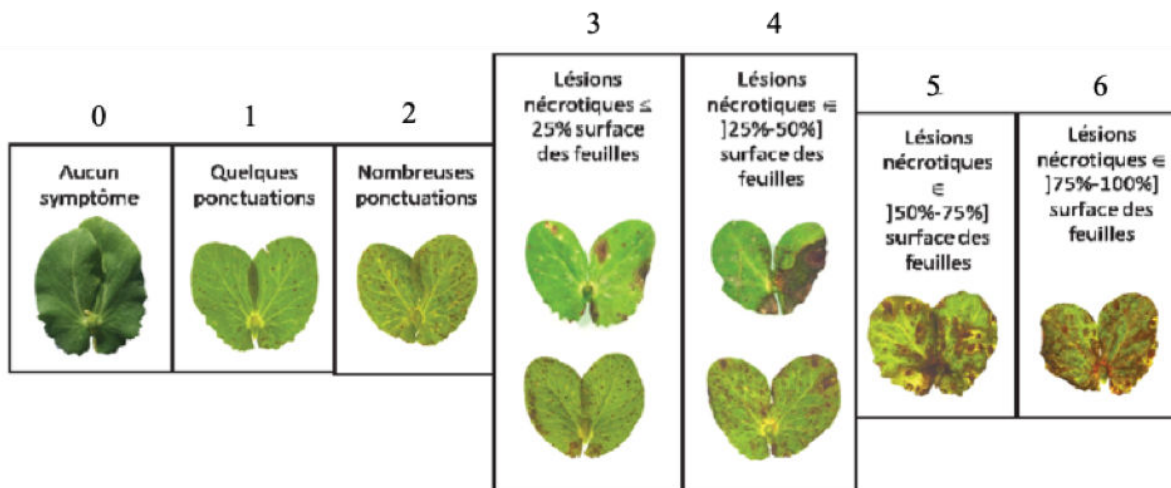


Figure 42 : Échelle de notation de maladie pour le couple *M. pinodes*/Pois.

0 : absence de lésions, 1 : quelques ponctuations, 2 : nombreuses ponctuations, 3 : = < 25% de la surface atteinte (premières nécroses), 4 : 25-50% de surface foliaire déshydratée et nécrosée, 5 : 50-75% de surface foliaire déshydratée et nécrosée, 6 : 75-100% de surface foliaire déshydratée et nécrosée. Ces notations sont réalisées 10 et 20 jours après l'inoculation. Adapté de Roger et Tivoli 1996.

pot de 3 à 4 plantes (**figure 41**). Une atmosphère humide est maintenue en recouvrant les pots d'un couvercle de mini-serre. Les plantes sont incubées de nouveau dans l'armoire de culture. La gravité de la maladie est appréciée visuellement sur les parties inoculées de la plante en utilisant l'échelle de notation de 0 à 6 (Tivoli et al. 1996) (**figure 42**).

VII. Fractionnement des homogénats de microalgue broyées

Dans le but d'identifier une fraction susceptible de contenir la ou les molécule(s) responsable de l'induction des défenses, les homogénats de cellules broyées ont été fractionnés. Les homogénats cellulaires (2 mg.mL^{-1} , masse/volume) ont d'abord été chauffés à 90°C pendant 2 heures. Après chauffage, la préparation a été centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant et le culot ont été repris dans un volume d'eau équivalent au volume initial. Des plantes PR1 :GUS âgées de 9 jours ont été transférées dans un milieu nutritif Arabidopsis contenant les fractions obtenus pendant 24 h. Une coloration GUS a ensuite été effectuée et les plantes ont été observées à la loupe binoculaire.

Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec une préparation non chauffée mais par la suite traitée de la même façon, c'est-à-dire centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes.

Résultats

Partie I:

Tests préliminaires de détection de l'activité élicitrice de *P. tricornutum*

Partie II:

Article I: Homogenates from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are able to trigger plant immunity in *Arabidopsis thaliana*

Partie I :

Tests préliminaires de détection de l'activité élicitrice de *P. tricornutum*

I. Tests préliminaires de détection de l'activité élicitrice de *P. tricornutum*

Cette partie du travail constitue une étude préliminaire visant à déterminer les effets de l'application de deux préparations sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* : une fraction AIR et un homogénat de cellules broyées (homogénat) issues de la microalgue *P.tricornutum*. L'objectif de ces essais est de définir les meilleures conditions dans lesquelles ces préparations pourront exprimer leur potentiel SDP. Pour cela, les expériences ont été réalisées dans des conditions contrôlées afin de limiter les risques d'interférences liés à des stress abiotiques et/ou biotiques sur l'efficacité des deux préparations. L'impact des préparations sur les plantes a été évalué au travers d'analyses phénotypiques : croissance racinaire, production de biomasse, quantité de chlorophylle et d'analyses d'expression de gènes par approche microscopique : utilisation de plantes transformées dont le promoteur de gènes de défense est associé à un gène rapporteur. Deux types de gènes rapporteurs seront présentés dans cette étude : un gène rapporteur codant pour l'expression de l'enzyme β -glucuronidase (GUS) qui active la rupture d'une liaison β en présence de X-Gluc et entraîne la formation d'un précipité bleu et un gène rapporteur codant pour la synthèse d'une protéine fluorescente (YFP) dont la localisation de l'expression est nucléaire. Si les traitements activent l'expression des gènes fusionnés dans les constructions, l'apparition d'un produit coloré (bleu ; GUS) ou fluorescent (YFP) sera observée.

Cette étude préliminaire a également pour objectif de comparer spécifiquement les réponses racinaires et les réponses foliaires à la suite des traitements. Les organes racinaires et les organes foliaires ont donc été traités de manière indépendante. Afin d'évaluer l'efficacité des préparations, des plantes traitées avec de l'eau ont servi de témoin négatif et des plantes traitées avec la Flagelline22 à 1 μ M (flg22), un éliciteur connu pour induire des réactions de défense, ont servi de témoin positif (Millet et al. 2010; Zipfel 2014; Wyrsh et al. 2015).

1. Prendre en compte la réponse systémique pour améliorer l'efficacité des traitements

La majorité des produits revendiquant une action stimulatrice de défense des plantes est testée sur les parties aériennes en raison de la facilité d'accès de ces organes. Toutefois des études ont démontré que l'application de traitements SDP au niveau racinaire améliorerait l'efficacité, la durabilité de la protection induite et engendrait l'activation de défense au niveau foliaire (Jakab et al. 2001; Francis et al. 2009; McGrann et al. 2017). Des tests préliminaires ont donc été réalisés dans le but d'évaluer si, dans le cadre de notre étude, un traitement racinaire pouvait également induire ce type de protection.

Cette analyse a été effectuée par le biais d'outils de criblage *via* l'utilisation de plantes transformées possédant un gène rapporteur de type GUS. Ces tests ont d'abord été réalisés avec deux traitements : l'eau et la flg22 afin de vérifier l'hypothèse de la présence d'une réponse systémique dans les organes non traités. Deux gènes de défense *WRKY11* et *MYB51* ont été étudiés. *MYB51* est gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans la synthèse des glucosinolates, composés azotés et soufrés qui interviennent dans la défense des plantes (Gigolashvili et al. 2007). *WRKY11* code aussi pour un facteur de transcription impliqué dans la signalisation cellulaire qui semble plus particulièrement impliqué dans la voie hormonale JA (Jiang et al. 2016). Ces gènes ont été sélectionnés puisque leur expression est augmentée en réponse à la flg22 (Denoux et al. 2008; Millet et al. 2010).

D'après la **figure 43A**, une élicitation foliaire par la flg22 entraîne une augmentation du marquage au niveau aérien. Les résultats mettent également en avant des différences d'expression des gènes *WRKY11* et *MYB51* au sein des organes aériens. Pour le gène *WRKY11* une activité GUS est observée dans les contrôles négatifs (eau) ce qui suggère une expression basale de ce gène. Toutefois un marquage plus important est observé dans les cotylédons (C) en réponse à la flg22. Pour le gène *MYB51*, une réponse localisée au niveau des feuilles (F) est observée en réponse à la flg22. En revanche aucune différence d'expression n'est observée dans les organes racinaires non traités ce qui suggère qu'il n'y a pas réponse systémique dans les racines lorsque l'on traite les organes foliaires.

Lors d'une élicitation racinaire avec la flg22 (**figure 43B**), on remarque que les promoteurs des gènes *WRKY11* et *MYB51* présentent une activation localisée au niveau de la zone d'élongation (ZE) et au niveau de l'apex (AP). Une augmentation du marquage au niveau foliaire est également observée en réponse à la flg22. Ceci n'était pas observé dans les racines lors d'une élicitation foliaire. Par conséquent, ce résultat suggère la présence d'une réponse systémique dans les feuilles non élicitées lors d'un traitement racinaire. Ces données apportent également une information complémentaire concernant le niveau d'expression des gènes *MYB51* et *WRKY11* dans les racines traitées avec de l'eau. Ces deux gènes sont exprimés à un niveau basal en conditions non élicitées dans les racines puisque l'on observe une coloration bleue quand elles sont traitées avec de l'eau (**figure 43B**).

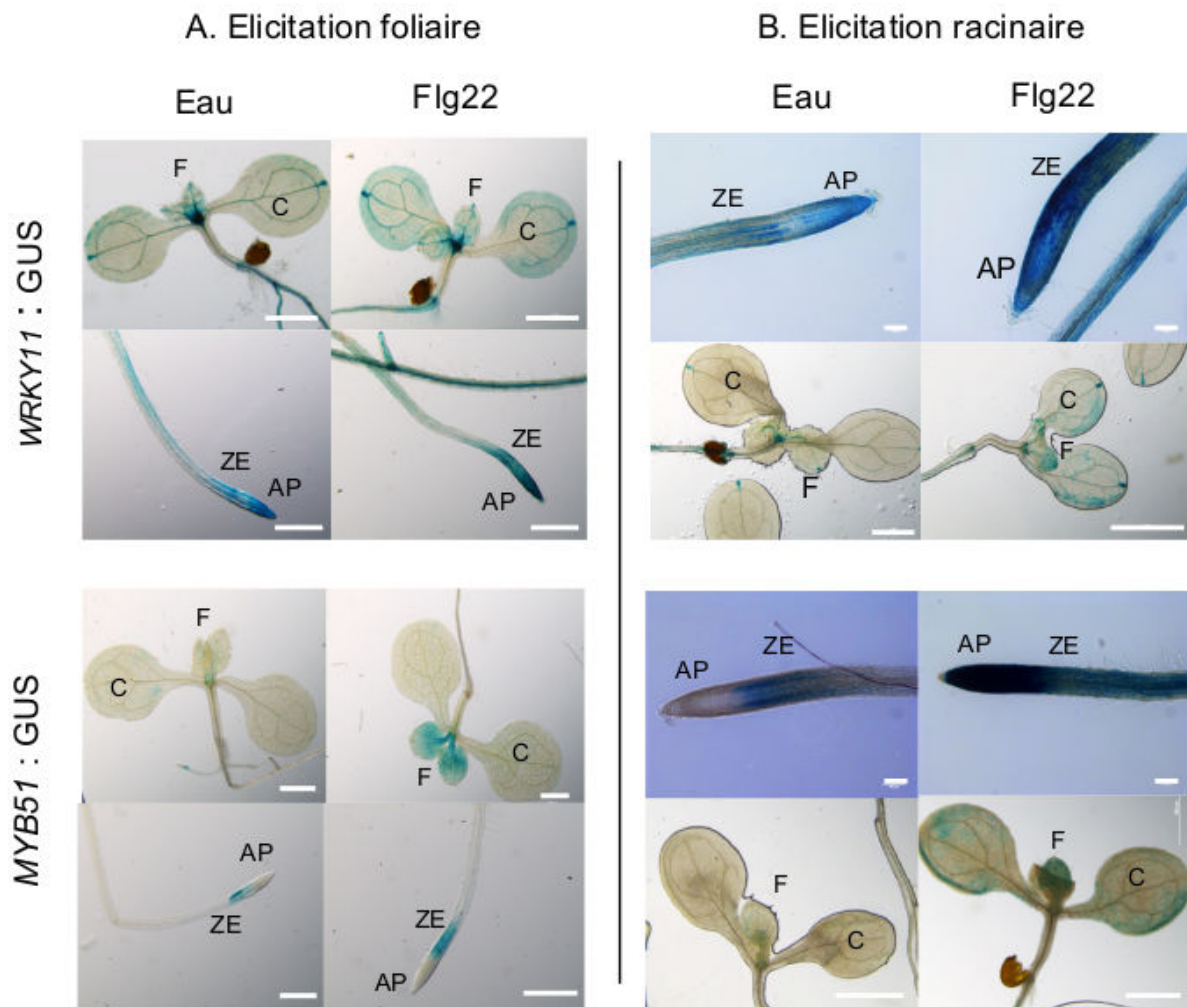


Figure 43 : Mise en évidence d'une réponse systémique dans les organes non traités après traitement des parties foliaires ou des parties racinaires.

(A) Les plantes avec les constructions *WRKY11* :GUS et *MYB51* :GUS ont été élicitées par dépôt de 30 μ L d'éliciteur (eau ; flg22 1 μ M) sur les feuilles de plantules âgées de 9 jours. La réponse a été observée après coloration GUS. Barres d'échelles : 1 mm et 500 μ m pour les photographies racinaires.

(B) Les plantes avec les constructions *WRKY11* :GUS et *MYB51* :GUS ont été élicitées au niveau racinaire par inondation de la racine principale avec les éliciteurs (eau ; flg22 1 μ M) après 7 jours de croissance. La réponse dans les racines traitées et dans les feuilles non traitées a été observée après coloration GUS.

Barres d'échelle : 1 mm et 100 μ m pour les photographies racinaires. Les photographies ont été réalisées à la loupe binoculaire et les photographies des apex racinaire par élicitation racinaire ont été prises au microscope optique inversé (X10). Un nombre de 3 à 5 plantes ont été utilisées avec 2 réplicats biologiques.

Ces résultats préliminaires mettent en avant des différences d'inductions de défense, au sein de la plante entière, en réponse à une élicitation foliaire ou à une élicitation racinaire. Lorsque les racines sont élicitées, une réponse systémique est observée dans les feuilles. De manière inverse, lorsque les feuilles sont élicitées, aucune modification de l'expression des gènes n'est observée dans les racines. Les racines présentent donc un avantage sur les feuilles dans l'induction des défenses à l'échelle de la plante entière. Ainsi la suite de l'étude a pour objectifs : (1) de définir si les racines et/ou les feuilles sont capables d'exprimer des modifications de l'expression de gènes de défense en réponse aux préparations de microalgues et (2) de définir l'organe le plus adapté pour évaluer l'efficacité de ces traitements.

2. Optimisation des conditions d'élicitation et des paramètres liés à l'utilisation des préparations : AIR et homogénats de cellules broyées

L'objectif de ces travaux de mise au point est de déterminer si des fractions issues de la paroi de *P. tricornutum* possèdent des activités élicitrices. Pour cela des fractions pariétales de type AIR (Alcohol insoluble residue) ont été préparées à partir de cultures de *P. tricornutum*. Un homogénat total de cellules broyées a aussi été utilisé.

Les fractions AIR préparées à partir des cellules de microalgues ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (**figure 44**). Ces résultats montrent que les oses majoritaires de la paroi de *P. tricornutum* sont le mannose (45%), le glucose (15 %) et l'acide glucuronique (11%). Des oses minoritaires (< 10%) tels que le rhamnose, le galactose, le xylose et le fucose sont également présents.

3. Étude de l'effet stimulateur de défense des différents traitements sur des racines d'*Arabidopsis thaliana*

Au début de l'étude aucune donnée relatant la présence de molécule élicitrice chez *P. tricornutum* n'étant disponible dans la littérature, il a d'abord été choisi d'appliquer sur des plantes d'*A. thaliana* un homogénat de cellules broyées à la dose de 10 mg.mL⁻¹ (masse sèche/volume) puis de réduire à la dose de 2 mg.mL⁻¹ (masse sèche/volume). L'extrait AIR a été testé à la dose de 0,1 mg.mL⁻¹ pour des contraintes dues aux essais de solubilisation. En effet le DMSO, choisi pour solubiliser des résidus contenus dans les AIR, doit d'abord être utilisé pur puis dilué afin de ne pas dépasser le seuil de tolérance de 0,1% qui correspond à la limite tolérée par les plantes. Au-delà de cette concentration des effets délétères sur la croissance de plantes de lin ou de riz ont été observés (Jaber 2016; Zhang, Yu, et Yue 2016).

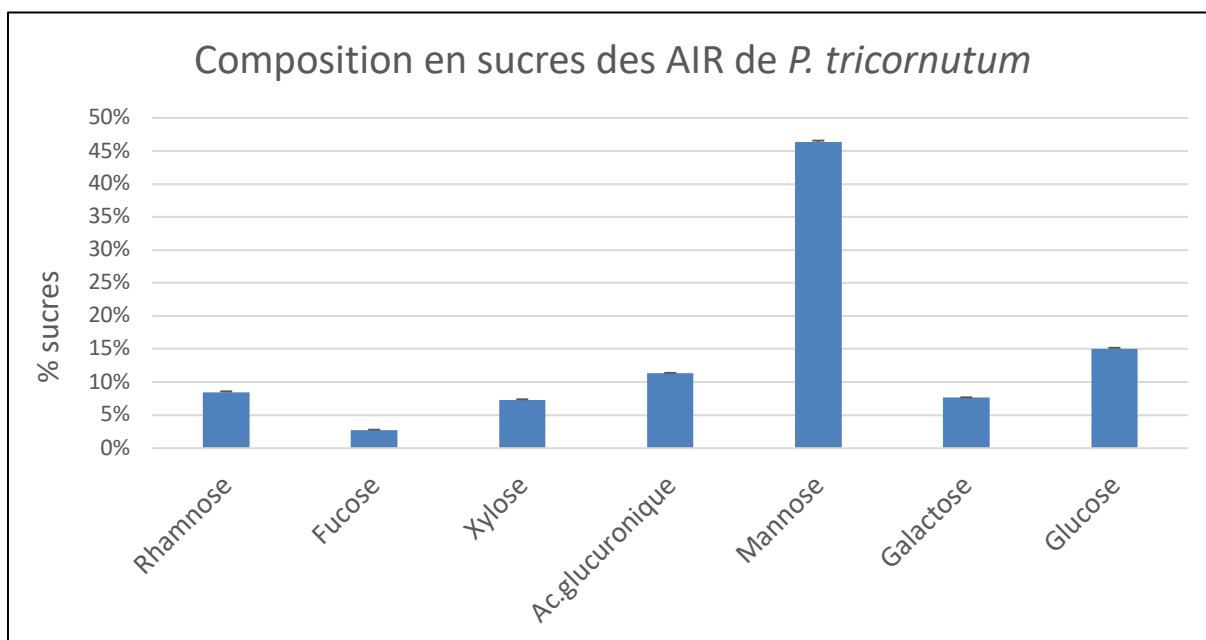


Figure 44 : Composition monosaccharide des résidus insolubles dans l'alcool (AIR) extraits à partir des cellules de *Phaeodactylum tricornutum*.

Les échantillons ont été obtenus par analyse chromatographique gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Les résultats sont issus de 3 répétitions biologiques et ont été obtenus à partir de la souche Pt1.8.6.

La capacité de l'homogénat 10 mg. mL^{-1} et de l'AIR $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$ à induire des réponses associées à des mécanismes de défense a été testée sur des racines de 7 jours. Les traitements ont été appliqués sur les racines pendant 24h par inondation de la racine principale sur toute sa longueur. Cette analyse a été effectuée par le biais d'outils de criblage *via* l'utilisation de plantes transformées possédant un gène rapporteur de type GUS ou un gène rapporteur de type YFP. Un gène supplémentaire à ceux précédemment étudiés (*WRKY11*, *MYB51*) a été ajouté à cette étude. Il s'agit du gène *CYP71A12* qui code pour un cytochrome P450, catalyseur de la conversion d'indole-3-acetaldoxime en indole-3-acetonitrile au cours de la biosynthèse de la principale phytoalexine d'*Arabidopsis thaliana* : la camalexine (Nafisi et al. 2007). Une augmentation de l'expression des gènes *CYP71A12*, *WRKY11*, *MYB51* est observée dans les racines traitées par la flg22 (témoins positifs) (figure 44). Ces résultats, en accord avec ceux trouvés dans la littérature (Millet et al. 2010), permettent de valider la fiabilité des contrôles (négatif et positif) utilisés dans cette étude. En revanche si l'on s'intéresse aux racines traitées avec les AIR ($0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$) ou avec les homogénats à la dose de 10 mg. mL^{-1} , on ne remarque aucune expression du gène *CYP71A12* et des niveaux d'expression des gènes *MYB51* et *WRKY11* équivalents à ceux observés dans les racines témoins négatifs (**figure 45**).

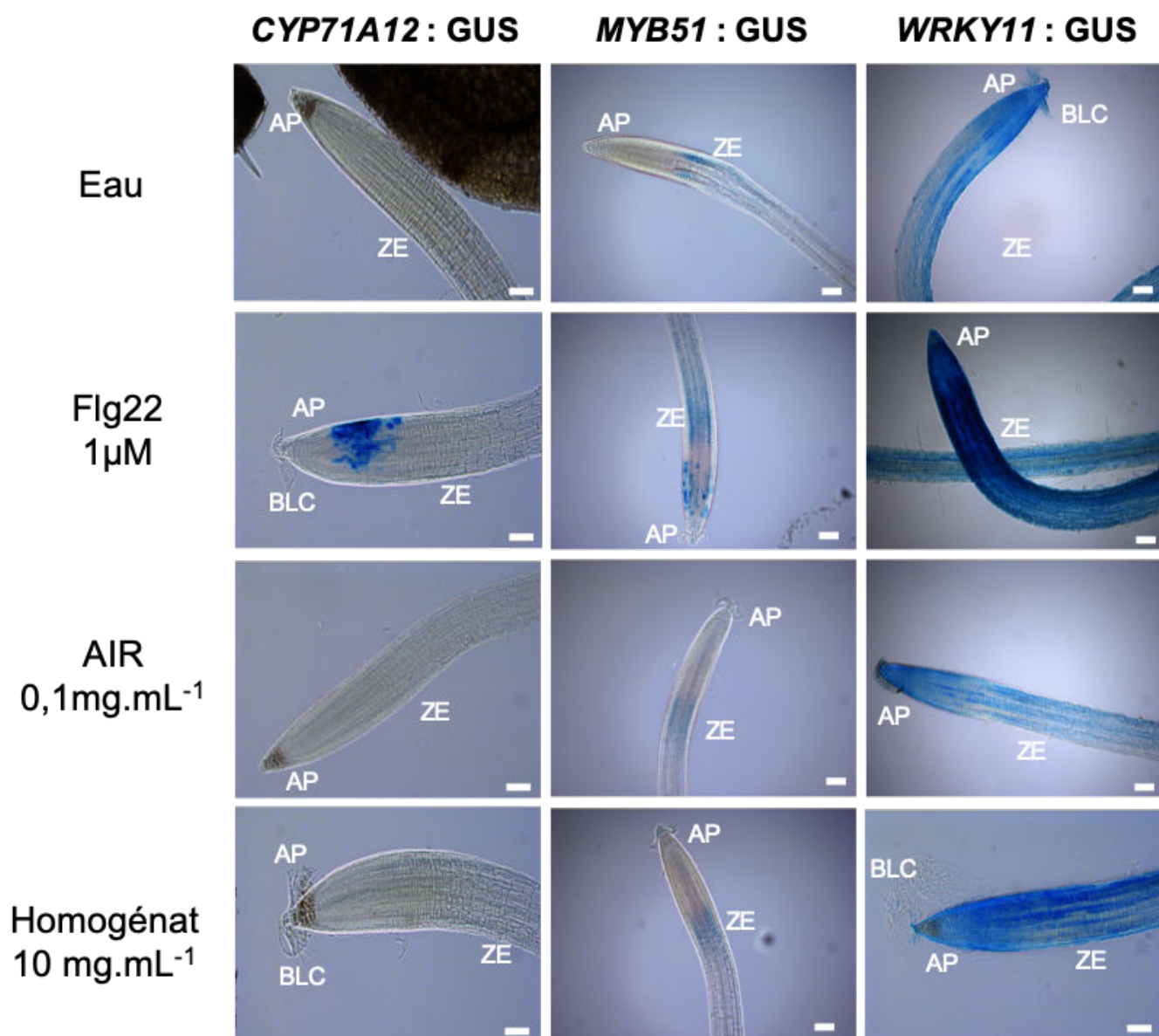


Figure 45 : Etude de l'effet inducteur d'extrait AIR (0,1 mg. mL⁻¹) et d'homogénat de la microalgue *P. tricornutum* (10 mg. mL⁻¹, masse sèche/volume) sur l'expression des promoteurs des gènes de défense *CYP71A12*, *MYB51* et *WRKY11* couplés au gène rapporteur GUS après 24h d'élicitation des racines âgées de 7 jours.

facteurs de transcription *MYB51* et *WRKY11*. Cette expression, localisée dans la zone d'élongation (ZE), est fortement augmentée en réponse à la flg22 1 µM. L'expression du gène *CYP71A12* est également activée en réponse à ce même éliciteur mais son expression est restreinte à quelques cellules de ZE. En revanche, aucune modification de l'expression des trois gènes n'est observée dans les racines traitées avec les AIR à 0,1 mg. mL⁻¹ et l'homogénat à la dose de 10 mg. mL⁻¹. Les photographies prises au microscope optique inversé sont représentatives de 3 réplicats biologiques. BLC : border-like cells, ZE : zone d'élongation, AP : Apex racinaire. Barres d'échelle : 100 µm.

Pour le gène CYP71A12 : Les photographies sont représentatives de 3 réplicats biologiques comprenant un nombre de 3 plantes.

Pour les gènes MYB51/WRKY11 Les photographies sont représentatives de 3 réplicats biologiques comprenant un nombre de 3 à 6 plantes.

Pour le gène *WRKY11*, le résultat obtenu avec la construction GUS est également retrouvé avec la construction *WRKY11* : YFP (**figure 46**). Il n'y a pas de différence d'intensité de fluorescence ni en comparant les traitements, ni en comparant les résultats enregistrés dans les racines traitées avec l'eau. L'expression basale de *WRKY11* dans les racines est confirmée.

PER5 et *ZAT12* sont des gènes impliqués dans la réponse à des stress oxydatifs (Rizhsky et al. 2004; Almagro et al. 2009). Toutefois, *PER5* est un gène qui semble impliqué de manière plus spécifique dans la réponse aux stress biotiques puisque son expression est augmentée en réponse à un traitement par des éliciteurs (Almagro et al. 2009). D'après la figure 45, en conditions non élicitées, l'expression des gènes *PER5* et *ZAT12* n'est pas détectée puisque aucune fluorescence n'est observée. En revanche, un traitement avec la flg22 engendre une induction de l'expression de ces deux gènes dans les racines (**figure 46**). En réponse à un traitement avec les AIR à 0,1 mg.mL⁻¹, comme dans plantes témoins (eau), aucune fluorescence n'est détectée. En revanche, lorsque les plantes sont traitées avec les homogénats à la dose de 10 mg. mL⁻¹ et 2 mg. mL⁻¹, respectivement, des différences d'expression sont observées. En effet, alors que le gène *PER5* ne semble pas induit dans les plantes traitées avec les homogénats, l'expression du gène *ZAT12* est sensible au traitement par les homogénats et aux deux concentrations testées (**figure 46**). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces deux gènes, marqueurs de stress oxydatifs, sont impliqués dans des voies de signalisation différentes : *PER5* code pour une peroxydase activée de manière spécifique en réponse aux MAMPs alors que *ZAT12* est un gène qui intervient dans la réponse à plusieurs types de stress environnementaux y compris les stress biotiques (Davletova et al. 2005; Vogel et al. 2005; Hahn et al. 2013).

A ce stade, les résultats ne permettent pas de renseigner sur le caractère éliciteur des préparations de la microalgue *P. tricornutum* (extraits AIR et homogénats) appliquées sur les racines. En effet, l'induction de gènes impliqués dans des voies de défense n'a pas pu mettre en évidence de différences entre les plantes témoins traitées avec de l'eau et les plantes traitées avec les AIR ou les homogénats de cellules broyées, pour les gènes *MYB51*, *WRKY11*, *CYP71A12* et *PER5*. En revanche, les résultats portant sur l'analyse de l'expression du gène *ZAT12* montrent une différence d'expression entre les plantes témoins traitées avec de l'eau et les plantes traitées avec les homogénats aux deux doses (10 et 2 mg. mL⁻¹). Toutefois, le caractère généraliste de ce gène ne permet pas d'associer spécifiquement l'expression de ce gène à la mise en place des mécanismes de défense.

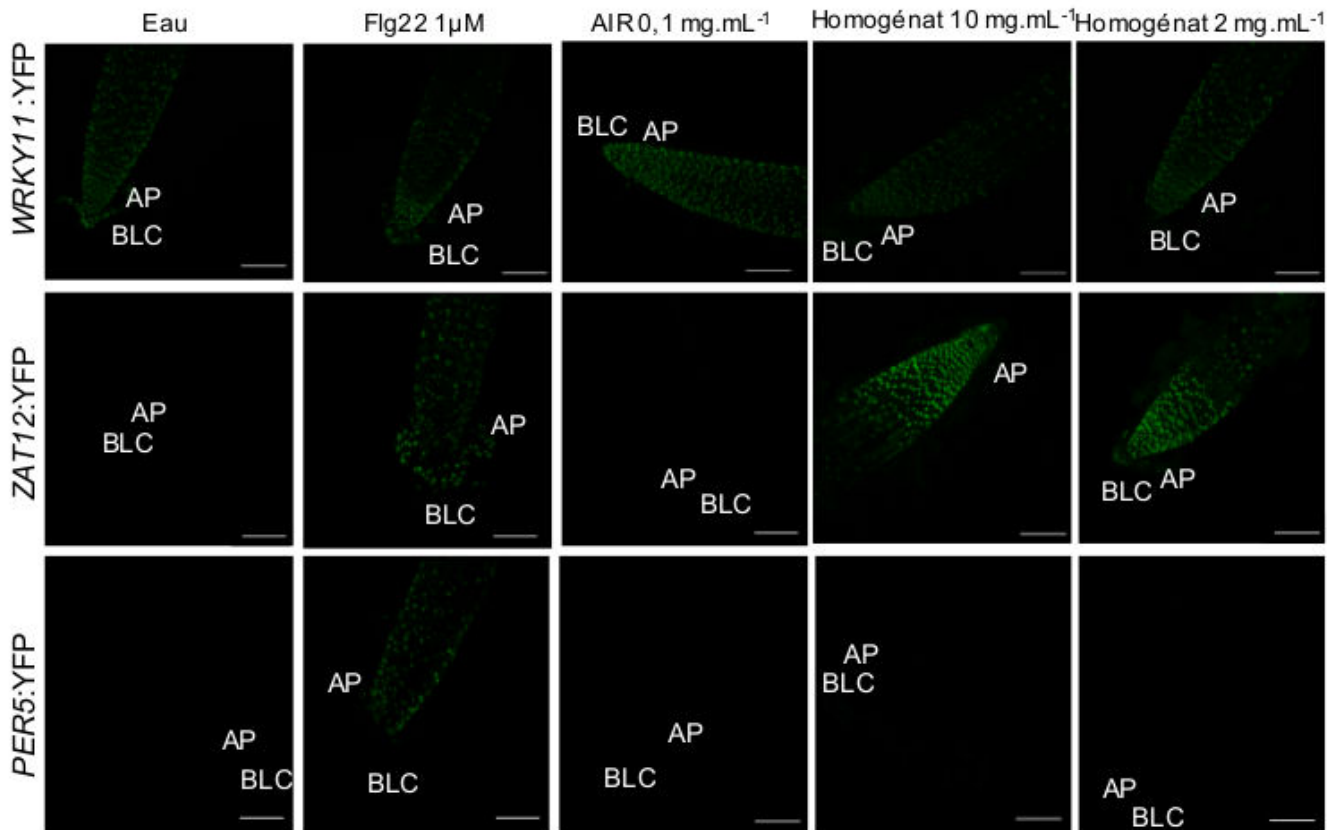


Figure 46 : Expression des gènes *WRKY11*, *PER5* et *ZAT12* dans les apex racinaires des plantes dont les racines ont été traitées avec de l'eau, de la Flagelline 22 1 μ M (flg22), des AIR de Pt 1.8.6 à 0,1 mg. mL⁻¹ et des homogénats aux doses de 10 mg.mL⁻¹ et de 2 mg. mL⁻¹ respectivement.

Pour le gène *WRKY11*, les plantes ayant été traitées avec de l'eau et servant de témoin négatif présentent un niveau de fluorescence basal au niveau de l'apex. Cette réponse est également observée dans les plantes ayant été traitées avec la flg22, les AIR et les homogénats aux deux concentrations (10 et 2 mg.mL⁻¹). Pour le gène *PER5*, seules les plantes ayant reçu le traitement à la flg22 présentent une fluorescence traduisant l'expression de ce gène au niveau de l'apex. Pour le gène *ZAT12*, les plantes servant de témoins ne présentent pas de fluorescence au niveau de l'apex racinaire. En revanche, les plantes ayant reçu le traitement flg22 et les homogénats aux deux concentrations (10 et 2 mg.mL⁻¹) présentent une fluorescence au niveau de l'apex racinaire et des cellules frontières. AP : apex, BLC : cellules frontières. Barres d'échelles : 100 μ m.

Pour le gène WRKY11 : Les photographies sont représentatives de 4 réplicats biologiques comprenant un nombre de plantes compris entre 3 et 5.

Pour le gène PER5 : Les photographies sont représentatives de 2 réplicats biologiques comprenant un nombre de plantes de 3 à 5

.Pour le gène ZAT12 : Les photographies sont représentatives de 3 réplicats biologiques comprenant un nombre de plantes compris entre 3 et 5.

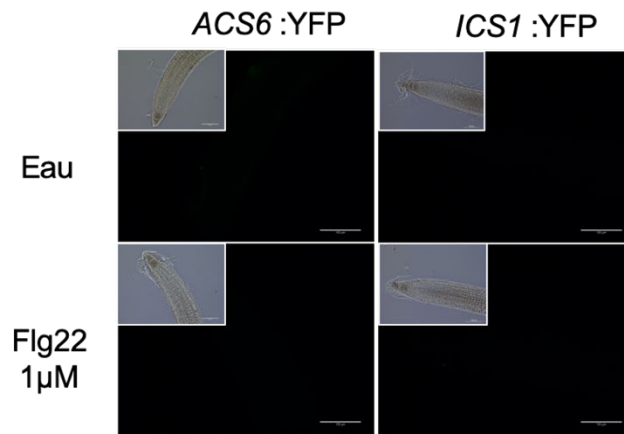


Figure 47 :Etude de l'expression des gènes *ACS6* et *ICS1* au niveau racinaire.

Pour les 2 gènes, les photographies sont représentatives de 2 réplicats biologiques comprenant un nombre de plantes compris entre 3 et 6.

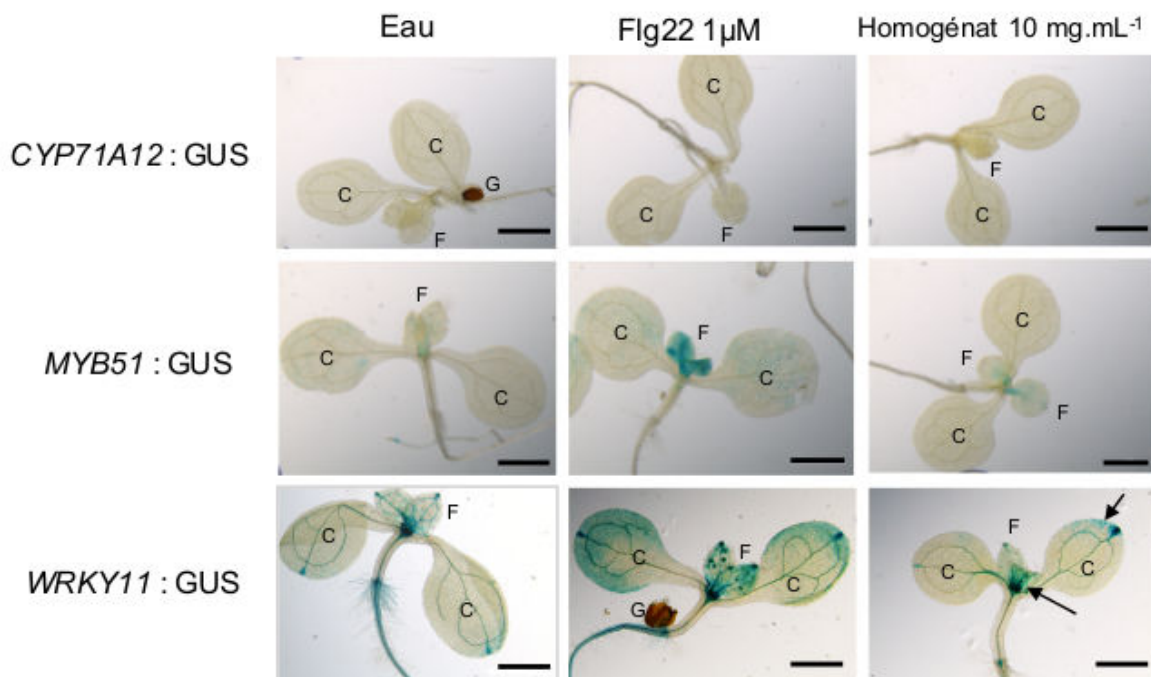


Figure 48 : Expression des promoteurs des gènes de défense *MYB51*, *CYP71A12*, et *WRKY11* couplés au gène rapporteur GUS après 24 h d'élicitation foliaire.

Aucune coloration bleue n'est observée dans les feuilles (F) et les cotylédons (C) des plantes traitées à l'eau pour les constructions *MYB51* : GUS et *CYP71A12* : GUS alors que les plantes *WRKY11* : GUS ont une faible coloration bleue. La flg22 induit l'expression des gènes *MYB51* et *WRKY11* (coloration bleue). Après traitement avec l'homogénat à 10 mg. mL⁻¹ aucune augmentation de l'expression du gène *MYB51* n'est observée par contre, pour les plantes *WRKY11* : GUS, une coloration bleue apparait au niveau des cotylédons et des feuilles (flèches noires). Aucune expression du gène *CYP71A12* ne semble induite quel que soit le traitement considéré. Barres d'échelles : 1 mm (G) : graine. *CYP71A12* : les photographies sont représentatives de 2 réplicats biologiques comprenant un nombre de plantes compris entre 3 et 6 ; *WRKY11* : les photographies sont représentatives de 3 réplicats biologiques comprenant un nombre de plantes compris entre 3 et 7 ; *MYB51* : les photographies sont représentatives de 2 réplicats biologiques comprenant un nombre de plantes compris entre 3 et 5.

Des constructions YFP supplémentaires permettant de suivre l'expression des gènes *ACS6* marqueur de l'éthylène et *ICS1* marqueurs de l'acide salicylique ont ensuite été étudiées au niveau racinaire. Les résultats, présentés à la **figure 47**, ne permettent pas de suivre l'induction de ces gènes de défense quel que soit le traitement considéré, ces gènes étant faiblement ou non exprimés dans les racines (Lyons et al. 2015; Attard et al. 2010; Poncini et al. 2017). L'ensemble de ces résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet des traitements à base de microalgues sur l'expression des gènes de défense *WRKY11*, *MYB51*, *CYP71A12* et *PER5* dans les racines. Il a donc été décidé d'étudier l'expression de tous ces marqueurs au niveau foliaire en complétant l'analyse par l'étude de l'expression des gènes *ACS6* et *ICS1* qui sont connus pour être exprimés en réponse à des éliciteurs dans ces organes (Seyfferth et Tsuda 2014; Bigeard, Colcombet, et Hirt 2015).

4. Étude de l'effet stimulateur de défense des différents traitements sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

a) Élicitation foliaire

Les plantules d'*A. thaliana* ont été traitées après 9 jours de croissance afin de pouvoir traiter de jeunes feuilles. Les différents traitements ont été déposés directement sur les feuilles à raison de 30 μL /plante. Les concentrations utilisées pour les différents extraits sont les mêmes que pour les racines. L'étude a été réalisée en utilisant les mêmes constructions GUS et YFP que celles qui avaient été utilisées sur les racines.

D'après les résultats de la **figure 48**, le gène *CYP71A12* ne semble pas être exprimé dans les feuilles d'*Arabidopsis* dans les conditions de l'expérience, quel que soit le traitement considéré. Ce gène ne peut donc pas servir de gène marqueur pour l'étude des réponses de défense foliaires. En revanche, une augmentation de l'activité glucuronidase pour les promoteurs *MYB51* et *WRKY11* est à nouveau observée en réponse à la flg22 ce qui confirme la fiabilité des témoins. Pour les plantes traitées avec l'homogénat de cellules broyées à 10 mg. mL^{-1} , les résultats ne montrent pas d'augmentation de l'expression du gène *MYB51* dans les feuilles par rapport aux plantes témoin traitées avec de l'eau. En revanche, il semblerait que le traitement homogénat 10 mg. mL^{-1} , engendre une modification de l'expression du gène *WRKY11* chez les plantes traitées en raison de la présence d'une coloration bleue plus marquée au niveau des feuilles et des cotylédons (flèches). Cette différence d'expression est toutefois à modérer et à confirmer en raison d'une faible augmentation de l'intensité de coloration. Parmi ces 3 gènes, *WRKY11* est le seul qui semble présenter une expression différentielle en réponse à un traitement avec l'homogénat 10 mg. mL^{-1} . Afin de compléter le criblage, ce gène a donc

été sélectionné pour étudier l'effet d'un traitement foliaire par les AIR 0,1 mg. mL⁻¹. Cependant, la variabilité des résultats à l'intérieur de chaque et entre les expériences est telle qu'il a été impossible de conclure à un effet négatif ou positif.

Ce criblage, réalisé au niveau foliaire par le biais de plantes transformées GUS, nous a permis d'envisager le caractère potentiel d'un effet SDP de l'homogénat à 10 mg. mL⁻¹. Les constructions YFP vont donc nous permettre de confirmer ou non cette hypothèse.

L'étude réalisée sur les constructions YFP ne permet pas d'obtenir de résultats discriminants concernant l'effet des traitements par la flg22, les AIR et les homogénats. En effet, pour la plupart des constructions (*WRKY11*, *ACS6*, *ICSI*, *MYB51*), le signal détecté est faible, voire inexistant (**figure 49A**). Dans certaines plantes traitées avec la flg22, il est tout de même possible d'observer la présence de fluorescence pour les constructions *WRKY11* : YFP et *ACS6* : YFP. Cependant, en raison d'une faible répétabilité, ces résultats ne permettent pas d'évaluer définitivement l'impact des traitements sur l'expression des gènes de défense. Il est possible d'impliquer la méthode d'élicitation pour expliquer la variabilité des résultats. D'un point de vue pratique, le dépôt d'une dose constante sur les feuilles d'une très jeune plante (9 jours) est délicat, voire aléatoire à cause de leur petite taille. Afin de vérifier cette hypothèse, une autre méthode de traitement a été choisie : les plantes ont été transférées dans un milieu liquide contenant les éliciteurs (Poncini et al. 2017).

b) Élicitation des plantules entières

Après 9 jours de croissance sur milieu gélosé, les plantes sont transférées dans un milieu nutritif liquide contenant les éliciteurs pendant 24h. Contrairement à ce qui était observé lors d'une élicitation foliaire par dépôt de 30 µL d'éliciteurs, les analyses d'expression des constructions YFP réalisées *via* une élicitation en milieu liquide mettent en avant une augmentation de l'expression des gènes *WRKY11*, *ACS6*, *ICSI*, *MYB51* (**figure 49B**).

Pour les plantes témoins immergées dans le milieu avec eau, aucune différence n'est observée quel que soit le gène étudié, ce qui suggère que cette méthode d'élicitation n'induit pas de biais expérimentaux concernant l'expression des gènes de défense sélectionnés. Pour l'ensemble des constructions YFP, dans les plantes traitées avec la flg22 (**figure 49B**), la fluorescence est nettement marquée alors qu'elle n'était pas décelable dans les plantes traitées

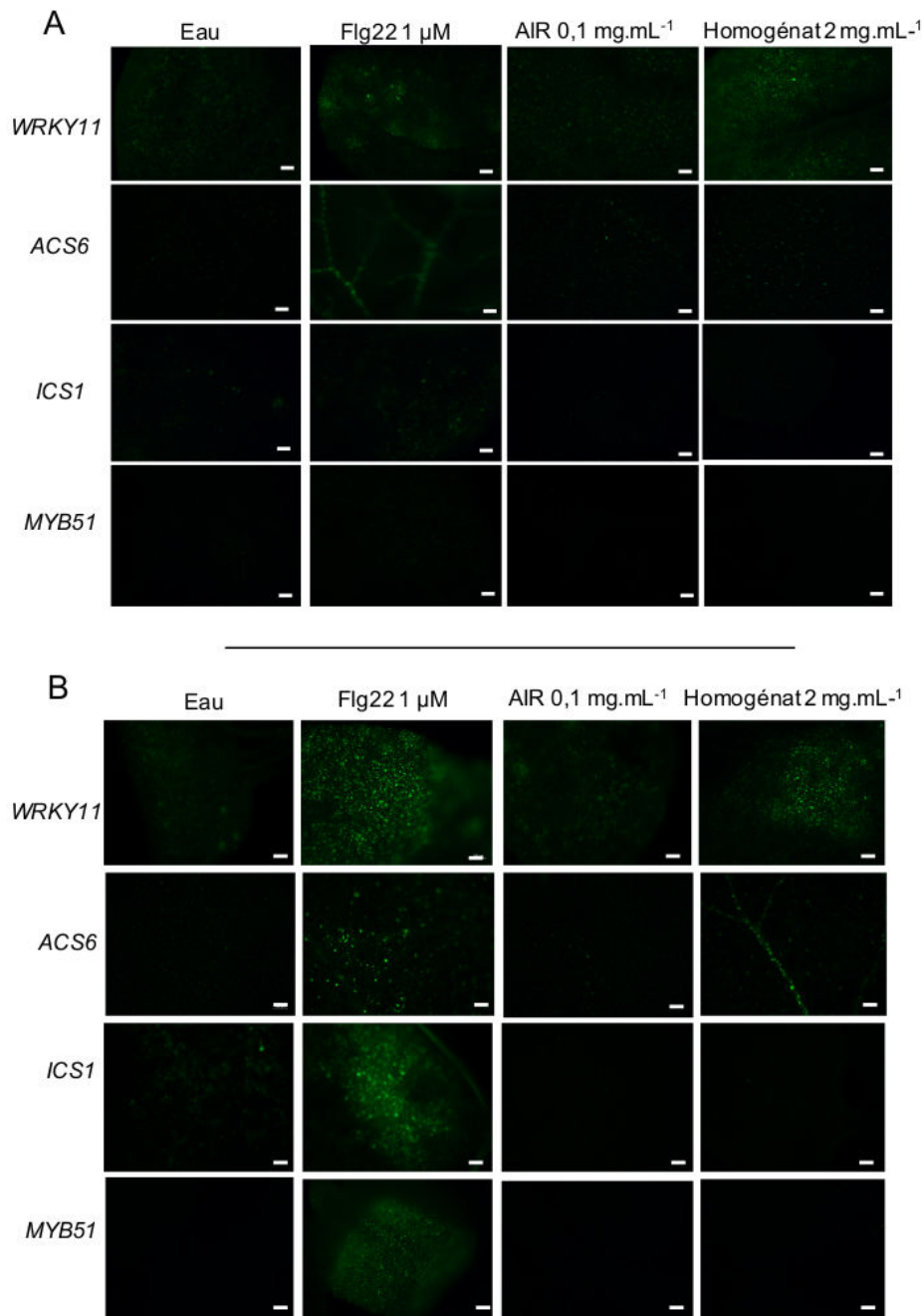


Figure 49 : Comparaison de l'effet éliciteur par deux méthodes d'élicitation : élicitation foliaire et élicitation de la plantule entière en milieu liquide, sur l'expression de gènes de défense *WRKY11*, *ACS6*, *ICS1* et *MYB51*

- (A) Pour les plantes ayant reçu le traitement par dépôt des éliciteurs sur les feuilles, la fluorescence observée est faible quel que soit le gène considéré. *WRKY11* : les données ont été obtenues sur 4 réplicats biologiques comprenant 3 à 6 plantes/réplicats ; *ICS1*, *ACS6* et *MYB51* : les données ont été obtenues sur 2 réplicats biologiques comprenant 3 à 6 plantes/réplicats
- (B) Pour les plantes ayant été élicitées en milieu liquide, la fluorescence résultant de l'expression des gènes est augmentée avec le traitement flg22. Cette même évolution, cependant moins marquée, est observée pour les gènes *WRKY11* et *ACS6* avec le traitement par l'homogénat de cellules broyées (2 mg. mL⁻¹). L'ensemble des données sont représentatives de 3 réplicats biologiques comprenant 3 à 6 plantes/réplicats. Barres d'échelle : 100 µm

par élicitation foliaire (**figure 49A**). Lorsque l'on s'intéresse aux plantes traitées avec les AIR, on ne remarque aucun effet du traitement sur l'expression des gènes. En revanche, pour les plantes ayant été traitées avec l'homogénat à la dose 2 mg. mL⁻¹, les résultats concernant les gènes *WRKY11* et *ACS6* suggèrent une augmentation de leur expression en réponse à l'application l'homogénat de microalgue.

Ces premiers résultats montrent que l'homogénat de cellules broyées à la dose de 10 et 2 mg. mL⁻¹ peut induire des modifications de l'expression des gènes *WRKY11*, *ZAT12* et *ACS6*. Des analyses phénotypiques ont donc été entreprises afin de s'assurer de l'absence d'effets indésirables des homogénats sur les plantes.

II. Étude de l'impact phénotypique des différents traitements sur les plantules d'*A. thaliana*

D'après la **figure 50A**, les plantes âgées de 9 jours et traitées avec les AIR à 0,1 mg.mL⁻¹ et l'homogénat à 2 mg. mL⁻¹ ont un aspect phénotypique similaire aux plantes servant de témoins négatif (eau) et positif (flg22). Elles présentent également une longueur racinaire équivalente 4,3 centimètres ± 0,4 (**figures 50B**). En revanche, les plantes ayant été traitées avec l'homogénat à la dose de 10 mg. mL⁻¹ présentent une croissance significativement diminuée par rapport aux plantes des autres traitements (eau, flg22, AIR et homogénat 2 mg.mL⁻¹). Cette baisse de croissance se traduit par un arrêt de croissance de la racine principale dont la longueur moyenne est de 3,5 cm (**figure 50B**). Cette diminution peut-être directement reliée à l'effet de l'homogénat de cellules broyées puisque la taille de la racine principale n'a pas augmenté depuis l'application de ce traitement (les marques noires représentent la localisation des racines au moment du traitement (**figure 50A**). Cet effet est encore plus visible après 9 jours de traitement puisque la croissance racinaire des plantes traitées semble avoir été totalement inhibée comparativement aux plantes témoins traitées avec de l'eau qui présentent un développement important des racines (**figure 50C**). L'aspect phénotypique des parties aériennes des plantes traitées avec l'homogénat 10 mg.mL⁻¹ suggère également un effet délétère de ce traitement. En effet, les parties foliaires des plantules traitées apparaissent dépigmentées (**figure 50C**) ce qui peut être expliqué par une forte diminution de la quantité en chlorophylles A et B (**figure 50D**). Toutefois, cet effet semble dose-dépendant puisque chez les plantes traitées avec l'homogénat à la dose de 2 mg.mL⁻¹, la quantité de chlorophylle est équivalente à celles des plantes témoins traitées avec de l'eau (**figure 50D**).

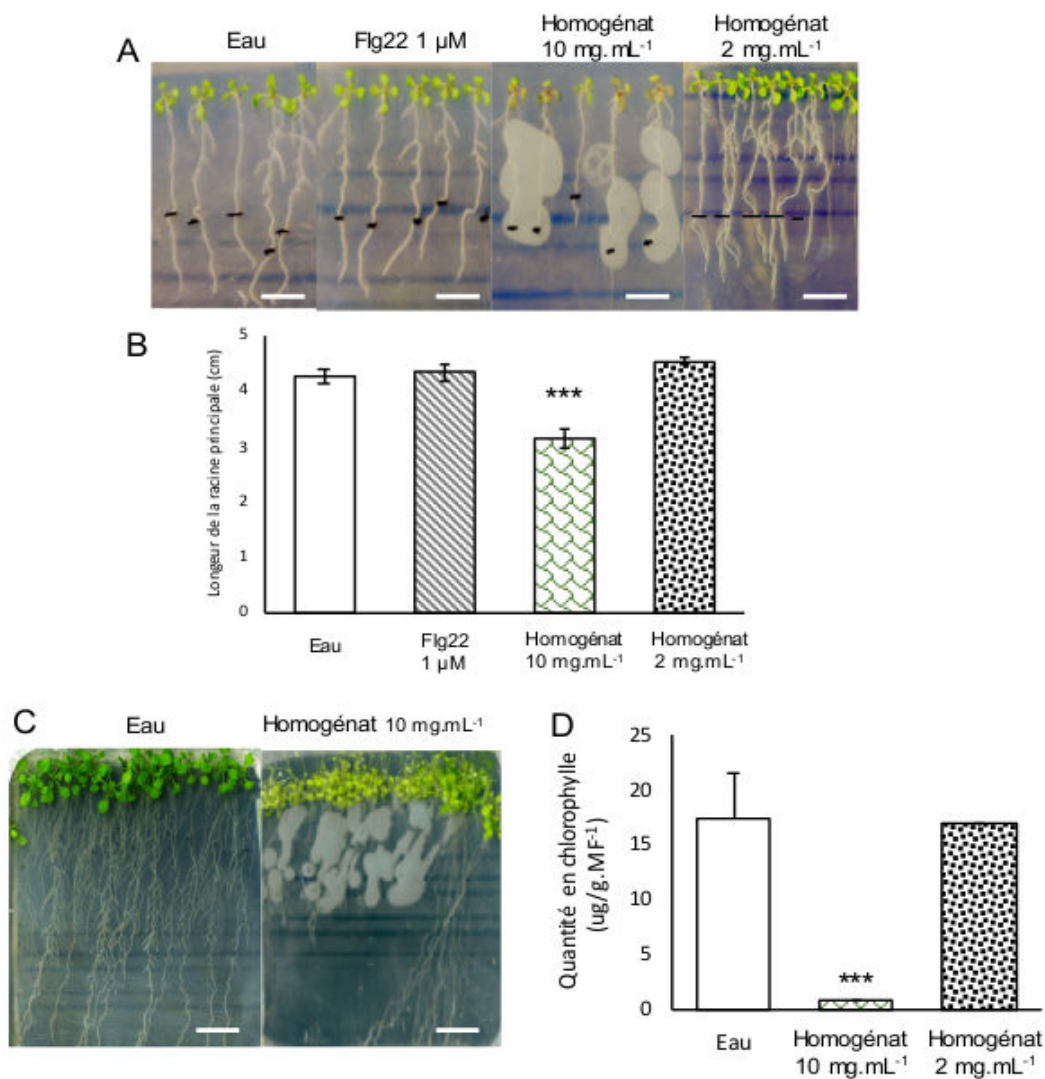


Figure 50 : Effet des homogénats et des AIR sur le développement des plantes d'*Arabidopsis thaliana*

(A) Les photographies permettent d’apprécier la croissance racinaire de plantules âgées de 9 jours après 2 jours de traitement. La localisation des racines au moment du traitement a été marquée par les traits noirs. Les racines traitées avec l’eau, la flg22 (1 μ M), les AIR à 0,1 mg.mL^{-1} et l’homogénéat à 2 mg.mL^{-1} présentent une augmentation de croissance après traitement puisqu’elles ont dépassé la marque noire. A l’inverse, l’homogénéat à 10 mg.mL^{-1} semble induire une inhibition ou un ralentissement de la croissance racinaire puisque les racines ayant reçues ce traitement ne dépassent pas les marques noires.

(B) La mesure de la longueur de la racine principale confirme l’impact négatif du traitement avec l’homogénéat à 10 mg.mL^{-1} puisque la taille racinaire moyenne correspondante est de 3,5 cm contre 4,3 cm pour les autres traitements.

(C) Après 9 jours de traitement, la croissance racinaire des plantules traitées avec l’homogénéat à la dose de 10 mg.mL^{-1} semble complètement inhibée. Au niveau aérien, la présence de fleurs et un important jaunissement des feuilles sont observés.

(D) Comparaison des quantités en chlorophylles A et B des plantes traitées avec l’eau ou l’homogénéat (10 mg.mL^{-1}). Barres d’échelle = 1 cm. Les valeurs sont les moyennes de 4 réplicats biologiques \pm l’erreur standard. Les astérisques indiquent des différences significatives (p -value < 0,001 ; test de Dunnett). $n=5$ avec un nombre de plantes compris entre 6-10/réplicats.

Ces premiers résultats montrent que, à forte concentration (10 mg. mL⁻¹), l'homogénat de cellules broyées impacte de manière drastique la croissance des plantules d'*Arabidopsis thaliana* en inhibant la croissance racinaire. Cet effet est également visible au niveau des parties aériennes puisqu'un jaunissement foliaire et une diminution des quantités en chlorophylles A et B a été reportée. Par conséquent, ces observations suggèrent que l'homogénat à la dose de 10 mg.mL⁻¹ présente un risque de phytotoxicité. A l'inverse, lorsque la concentration de l'homogénat est abaissée à 2 mg.mL⁻¹, les plantules présentent une croissance racinaire et des quantités en chlorophylles équivalentes à celle des plantes témoins traitées avec de l'eau. Ces résultats mettent ainsi en évidence la présence d'un effet dose de l'homogénat. Aucun effet négatif du traitement AIR n'a été mis en évidence au cours de cette première manipulation.

Les principales conclusions que l'on peut énoncer à partir de ces résultats sont que la méthode d'application des traitements ainsi que l'organe (racines, feuilles) étudiés sont des paramètres essentiels à prendre en compte lors d'une étude de l'activité stimulatrice d'éliciteurs. D'importantes différences concernant les niveaux d'expression de gènes de défense comme *MYB51*, *ICS1*, *ACS6*, *CYP71A12* ont été mises en évidence dans cette partie du travail selon la méthode d'application.

Les résultats obtenus ont permis de démontrer que la préparation d'homogénats de cellules broyées aux doses de 10 et 2 mg.mL⁻¹ pouvaient induire des effets éliciteurs puisqu'une augmentation de l'expression des gènes *WRKY11*, *ACS6* et *ZAT12* ont été observées chez les plantes traitées. Cet effet a été mis en évidence au niveau foliaire après 24h de traitement en milieu liquide. En revanche pour les plantes traitées avec la préparation d'AIR, aucune modification de l'expression des gènes n'a été reportée. Des analyses phénotypiques ont mis en évidence un effet phytotoxique de l'homogénat de cellules broyées à la dose 10 mg.mL⁻¹ sur les plantes d'*Arabidopsis thaliana*. La phytotoxicité semble liée à un effet dose puisque la dose 2 mg. mL⁻¹ n'a pas induit d'effets délétères sur la croissance des plantules.

Pour la suite de ces travaux, nous avons donc choisi de continuer l'étude avec l'homogénat de microalgue à la dose de 2 mg. mL⁻¹ et d'appliquer ce traitement sur plantules entières et en milieu liquide afin d'avoir des effets inducteurs de défenses plus marqués, dans le but de déceler le potentiel d'efficacité du traitement.

Partie II :

Article I : Homogenates from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are able to trigger plant immunity in *Arabidopsis thaliana*

Article I: Homogenates from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are able to trigger plant immunity in *Arabidopsis thaliana*

Dans l'environnement marin, la diatomée *P. tricornutum* est présente sous la forme de trois morphotypes distincts : fusiforme, triradié et ovale. Par conséquent, nous avons choisi de comparer l'effet inducteur de défense des homogénats issus des trois morphotypes d'une seule et même souche Pt3 sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* en comparaison avec la souche (Pt1.8.6) dont le morphotype majoritaire est le morphotype fusiforme (De Martino et al. 2011). Cette étude a d'abord été réalisée *via* l'utilisation de plantes transformées GUS et YFP, puis dans une seconde partie, une caractérisation plus fine des voies de biosynthèse activées dans des plantes d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à un traitement par les homogénats a été réalisée par analyse moléculaire (qRT-PCR).

Des tests d'infections ont été réalisés sur des plantes préalablement traitées ou non avec les homogénats de cellules broyées dans le but d'évaluer l'efficacité de protection induite par ces traitements. Deux pathosystèmes ont été testés : un pathosystème bactérien *Pseudomonas syringae* DC3000/*Arabidopsis thaliana* et un pathosystème fongique *Mycosphaerella pinodes*/*Pisum sativum*.

Dans cette partie, les résultats présentés sous forme d'un article soumis au journal Marine Drugs, démontrent des modifications pariétales et moléculaires à la suite d'un traitement avec des homogénats de cellules broyées à 2 mg.mL⁻¹ de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum*. Une augmentation de la production de callose ainsi que de l'expression des gènes *PR-1*, *PAD3*, *WRKY40* et *ACS6* ont en effet été observées sur les plantes traitées avec les homogénats de cellules broyées Pt3. De plus, les résultats des tests de pathogénicité suggèrent que les homogénats du morphotype fusiforme de la souche Pt3 sont capables d'augmenter le niveau de protection des plantes contre la bactérie *Pseudomonas syringae* DC3000. Ces résultats ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour la recherche de nouveaux éliciteurs de défense chez les microalgues.

Article

Homogenates from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are able to trigger plant immunity in *Arabidopsis thaliana*

Coralie Chuberre^{1, 2}, Muriel Bardor^{1, 2,3}, Marie-Laure Gueye^{1, 2}, Marie-Christine Kiefer Meyer^{1,2}, Azeddine Driouich^{1,2}, Bruno Gugi^{1, 2*}, Maïté Vicré^{1, 2*}

1. Normandie Univ, UNIROUEN, Laboratoire Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale EA4358, 76000 Rouen, France
2. Fédération de Recherche "NORVEGE"- FED 4277, 76000 Rouen, France
3. Institut Universitaire de France (I.U.F.), 1 rue Descartes, 75005 Paris Cedex

* Correspondence : Bruno Gugi, bruno.gugi@univ-rouen.fr ; Maïté Vicré, maite.vicre@univ-rouen.fr

Abstract: The increasing need for sustainable and environmentally safe agricultural practices requires the development of new agronomic approaches. In this context, the use of natural elicitor molecules has emerged as an effective and eco-friendly method to promote agriculture. Microalgae are photosynthetic organisms, and they possess immense potential for use in modern agriculture. Indeed, these organisms produce a wide range of metabolites that could act as natural elicitor molecules. In the present work, a crude cell homogenate was prepared from the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* and its effects on the defense responses of *Arabidopsis thaliana* plants were assessed. The expression of defense related genes in the aerial parts of *Arabidopsis thaliana* plants was analyzed using GUS and YFP constructs under the control of ethylene and salicylic acid signaling promoters. Plants treated with *P. tricornutum* homogenates exhibited a significant increase in PR-1 expression. Microalgae homogenates also enhanced protection against the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* DC3000 after 2 days of treatment and exhibited *in vitro* bactericidal activity. These results suggest that *P. tricornutum* homogenates are able to induce plant immunity and offer new perspectives for the development of agronomic products of natural origin.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, plant immunity, defense gene expression, callose, bacterial protection

1. Introduction

Plants interact with their microbial environment through the perception of molecules able to induce defense responses. These molecules, known as elicitors, can originate from microorganisms (Microbe/Pathogen Associated Molecular Patterns, MAMPs/PAMPs) [1–3] or from the plant itself (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs) [4,5]. The perception of such elicitors by the plant membrane pattern recognizing receptors (PRRs) leads to the activation of a non-host resistance known as pathogen- or pattern-triggered immunity (PTI) [6,7]. PTI is accompanied by a set of induced defenses such as the expression of defense related genes that encoded Pathogenesis-Related proteins and other antimicrobial compounds [8] as well as factors involved in cell wall reinforcement [9], thus contributing to plant resistance. Plants have also the capacity to induce resistance in the distal tissues which provides long-lasting and broad-spectrum protection at the whole plant level [10]. Therefore, if a plant is appropriately stimulated prior to pathogen infection, defense mechanisms are triggered to limit the spread of the disease [11]. Two forms of induced resistance can be activated by a plant: the systemic acquired resistance (SAR), which is dependent on the phytohormone salicylic acid (SA) [12,10] and the induced systemic resistance (ISR) which relies on pathways regulated by jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) [13,14]. The use of molecules that can mimic pathogen aggression is a good alternative to the application of phytochemicals. These molecules, also called elicitors or plant defense stimulators (PDS), are applied as a preventive measure to prime plant defense responses.

Seaweeds extracts are a natural source of elicitor molecules. Recent studies have demonstrated the ability of seaweeds to induce the plant immune system [15,16]. For example, an extract from the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* was shown to increase *Arabidopsis thaliana* resistance against two bacterial pathogens, *Pseudomonas syringae* DC3000 and *Pseudomonas aeruginosa* [17]. Seaweeds contain polysaccharides that are recognized by plants as MAMPs, resulting in defense response activation and increased resistance [18]. Laminarin, a $\beta(1-3)$ -glucan extracted from the macroalga *Laminaria digitata*, is an algal polysaccharide that is widely used to elicit plant immunity [19–21]. Defense reactions triggered by laminarin include cell wall reinforcement, specific phytoalexin/enzymes production, and disease reduction by preventing infection by *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* [20]. Ulvans, polysaccharides from green macroalgae (*Ulva* sp.), were found to enhance resistance against powdery mildew in wheat and barley plants [22] and against *Colletotrichum* sp. in *Phaseolus vulgaris* and *Medicago truncatula* [23,24]. Carrageenans, polysaccharides extracted from red macroalgae (*Eucheuma* sp., *Gigartina* sp.), are able to induce resistance against fungal and bacterial pathogens [25,26]. Fucans, polysaccharides extracted from brown macroalgae (*Fucus* sp. *Pelvetia canaliculata*), also induce defense-related mechanisms [27,28].

Although macroalgae represent a natural source of elicitor molecules, their culture requires large natural culture areas and long culture times. In contrast, microalgae, which are taxonomically related to macroalgae, present the advantage of growing faster in smaller areas [29]. Furthermore, microalgae include a diverse group that produce a wide range of metabolites with many potential agricultural uses such as crop fertilization and protection [30–32]. For example, crude polysaccharides extracted from several microalgae were reported to stimulate immune defenses in tomato plants [30]. However, the effects of such polysaccharides appear to be both strain and plant specific [33]. The use of microalgae as a new potential source of elicitor molecules is highly promising to improve crop protection, but additional information about their use is needed to improve their effectiveness.

Phaeodactylum tricornutum is probably one of the most well-studied diatoms because of its ease of cultivation in seawater and its sequenced genome [34]. *P. tricornutum* has the specificity to be pleiomorphic, providing broad adaptability to the cells [35]. Three distinct morphotypes, fusiform, triradiate, and oval cells, can be found, mostly depending on the environmental conditions [36]. Recently, a transcriptome-wide characterization of the three morphotypes originating from the same Pt3 strain was performed [37]. This study revealed that the fusiform and triradiate morphotypes presented only small differences (less than a 1% difference in transcriptomes), whereas oval cells differentially expressed up to 60% of their genes [37]. These findings suggest that the oval morphotype consists of highly metabolically cells compared to the two other morphotypes. Moreover, cell-specific fractions from *P. tricornutum*, such as fatty acids or volatile organic compounds (VOCs), were reported to possess antimicrobial activities against bacteria [38–40].

In this context, *P. tricornutum* is a promising candidate for the production of new elicitor molecules dedicated to plant defense. In the present study, we investigated the effect of *P. tricornutum* crude cell homogenates on the immune responses of the plant model *Arabidopsis thaliana*. Our data revealed the induction of defense-related pathways and a significant reduction in the development of disease symptoms in response to *Pseudomonas syringae* DC3000 infection on *A. thaliana* plants.

2. Results

2.1. *P. tricornutum* homogenates cause a drastic inhibition of root growth depending on the dose applied.

The activation of defense mechanisms by elicitors requires a large amount of energy and can impair plant growth and development [41]. In the context of crop production, this impairment of growth and development in the absence of pathogens is not acceptable. In order to identify a dose of *P. tricornutum* homogenate that does not compete with these parameters, the effects of two crude cell homogenate concentrations (10 mg/mL and 2 mg/mL) applied to the roots of 7-day-old *Arabidopsis thaliana* seedlings were evaluated. The length of the primary root and the biomass of roots and leaves were recorded, and the chlorophyll content was determined.

The results indicated that the higher homogenate concentration (10 mg/mL) markedly reduced the length of the primary root by 50% compared to the length in water-treated plants (Supplemental figure 1a). The chlorophyll content (Supplemental figure 1b) and leaf and root biomass were also markedly reduced by 10 and 2 times, respectively, compared to the values in water-treated plants (Supplemental figure 1c-1d). In addition, roots treated with 10 mg/mL homogenate exhibited a swollen phenotype and a higher density of root hairs (Supplemental figure 1e).

By contrast, when the homogenate concentration was decreased to 2 mg/mL, a drastic inhibitory effect did not occur. Slight reductions in the primary root length (**figure 51a**), chlorophyll content (**figure 51b**), and biomass (leaves and roots) production (**figures 51c-51d**) were observed in homogenate-treated plants. However, plants treated with 1 μ M Flagellin 22 (Flg22), a well-known elicitor of plant defense responses, displayed parameter levels similar to those of the homogenate-treated plants. The data also revealed that the abnormal root phenotype was absent when the homogenate concentration was decreased (**figure 51e**). These results indicate that the homogenate had dose-dependent effects on plant growth. Therefore, we conducted the subsequent experiments using the crude cell homogenate at 2 mg/mL, which does not affect growth.

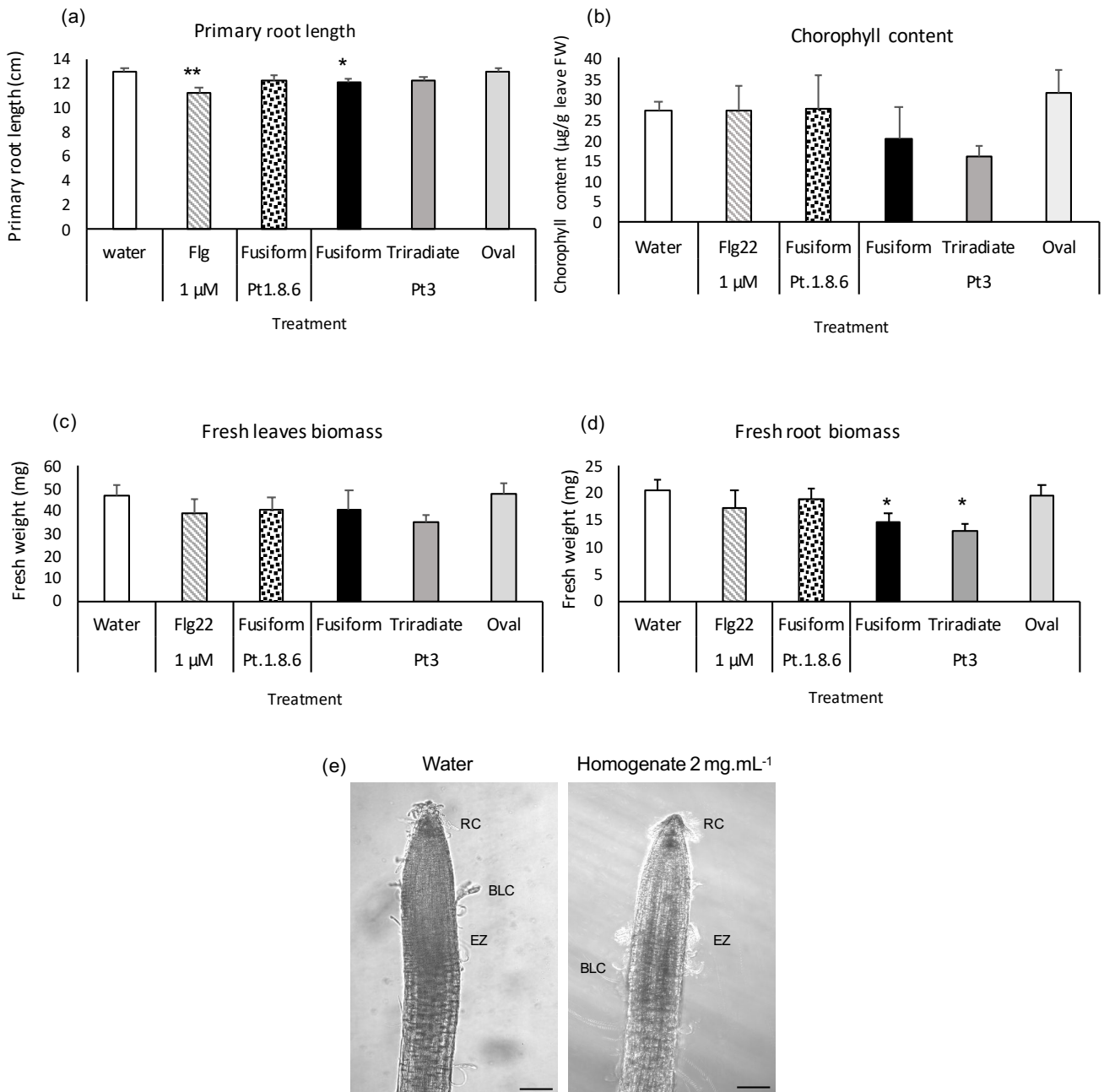


Figure 51 : Effects of *P. tricornutum* crude cell homogenates on (a) primary root length, (b) chlorophyll content, (c) leaf and (d) root biomass, and (e) root phenotype at a homogenate concentration of 2 mg/mL.

These parameters were measured 11 days after treatment. Flagellin 22 (Flg22) 1 μ M treatment was used for positive elicitation. In each experiment, 6 to 10 plants were assayed in 4 replicates. Scale bars = 100 μ m. Asterisks indicate significant differences with Dunnett's test: *** p-value < 0.001; **p-value < 0.01; *p-value < 0.5.

2.2. *P. tricornutum* homogenates activate innate immune responses in *Arabidopsis thaliana*

To determine whether microalgae crude cell homogenates (2 mg/mL) induce immune responses associated with defense mechanisms, a primary screen was performed using the different morphotypes of *P. tricornutum*, fusiform, triradiate, and oval cells, to prepare the homogenates. These morphotypes were reported to exhibit different metabolic activities such as the secretion of exopolysaccharides and the production of antimicrobial compounds [40]. To assess the potential elicitor effects of the different *P. tricornutum* homogenates, we selected two defense-associated gene markers, previously described in the literature, whose promoters were fused to either the β -glucuronidase (GUS) or the yellow fluorescent protein (YFP) reporter [42,43]. The GUS and YFP reporter genes were put under the control of the pathogen-inducible promoters *PR-1* (*PATHOGENESIS RELATED PROTEIN 1*) and *ACS6* (*1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE*) [42,43]. These markers are known to be induced in response to the bacterial elicitor Flagellin-22 (Flg22), which was used as a positive control. *PR-1* is commonly used as a marker of the salicylic acid (SA) signaling pathway [44,45]. This gene is induced by various environmental stimuli such as pathogen attack or exposure to elicitors of plant defense responses [46,47]. *ACS6* catalyzes the conversion of S-adenosyl-L-methionine to 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, a direct precursor of ethylene. Ethylene (ET) acts in plants either alone or synergistically with jasmonic acid (JA) or SA in basal and induced resistance against various pathogens [48]. The *PR-1* and *ACS6* promoters were fused to either the β -glucuronidase (GUS) or the yellow fluorescent protein (YFP) reporter [42,43].

In this experiment, the *PR-1* promoter was fused to the GUS reporter gene. Therefore, a blue coloration resulting from GUS activity indicated the expression of the *PR-1* gene. Mock-treated plants were colorless indicating the absence of GUS activity after 24 h and 48 h of treatment. Following treatment with the homogenate of each Pt3 morphotype (2 mg/mL), a strong blue coloration was induced in *PR-1*: GUS plants at 24 h and 48 h, suggesting the upregulation of the *PR-1* gene (**figure 52a**). In contrast, Flg22-treated plants only exhibited GUS activity at 48 h, suggesting that the *PR-1* gene was induced after this elicitation period (**figure 52b**). These findings suggest that cell homogenates were able to induce the expression of *PR-1* more rapidly than Flg22. We also used, as a control, the *P. tricornutum* Pt1.8.6 strain obtained from the Scottish Association for Marine Science campus (<https://www.ccap.ac.uk>), which has axenic fusiform cells. In contrast, the Pt1.8.6 homogenate did not induce expression

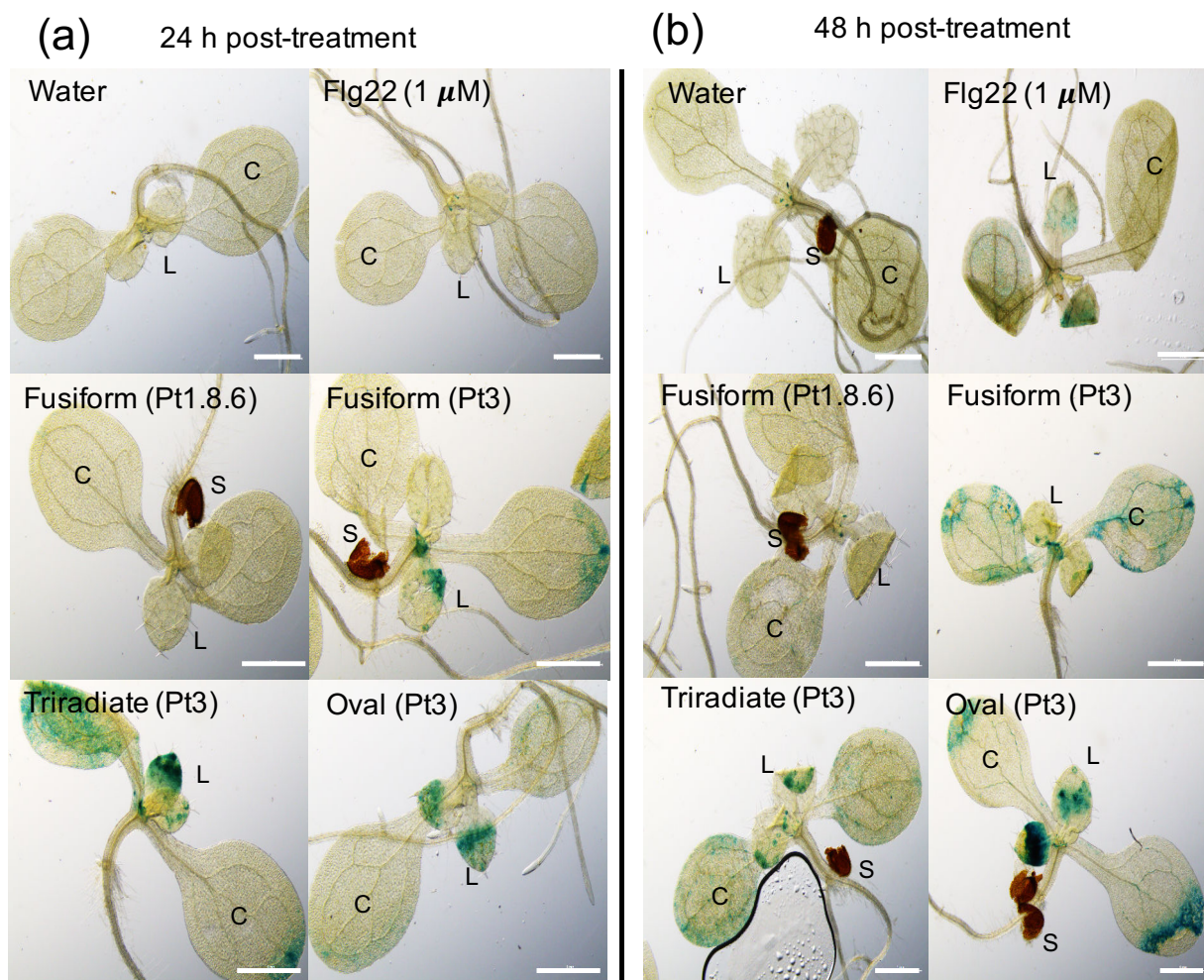


Figure 52 : Induction of *PR1* : GUS expression in 9-day-old leaves treated for (a) 24 h with water, 1 μ M Flg22, or cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, or Pt3 oval or for (b) 48 h.

Scale bars = 1 mm. L, leaves; C, cotyledons; S, remaining seed coat. Observations were performed on 6 to 10 plants with 4 replicates.

of *PR-1* unlike the similar fusiform Pt3 strain, indicating that strains originating from the same morphotype differ in their ability to induce plant immune responses. In plants, ET acts either alone or synergistically with JA or SA in basal and induced resistance against various pathogens [48]. *ACS6 : YFP* was studied using confocal microscopy to reflect ET synthesis. The fluorescence of YFP is localized in the nuclei of leaves [43]. Examination of the *ACS6 : YFP* Arabidopsis line revealed that all homogenates originating from the Pt3 strain elicited immune responses in the Arabidopsis seedlings (**figure 53**). There was a slight induction in the Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, and Pt3 oval morphotypes as in the negative control seedlings. A stronger fluorescent signal was observed in the Pt3 triradiate morphotype, as *ACS6 : YFP* is expressed throughout the leaves.

Callose deposition is another marker of plant defense responses and is involved in cell wall reinforcement [9,49,50]. Callose deposition was investigated using aniline blue staining after 48 h of elicitor treatment. As illustrated in **figure 54a**, a punctiform staining was observed in plants treated with Flg22 and homogenates originating from Pt3, confirming the production of callose deposits. Relative quantification of callose deposition revealed that the fusiform and triradiate Pt3 treatments induced more deposits (10% of relative fluorescent surface) than the oval and Flg22 treatments (only 5% of relative fluorescent surface) (**figure 54b**). Consistent with our previous observations with the transgenic GUS and YFP lines, the homogenate originating from Pt1.8.6 did not induce the deposition of callose.

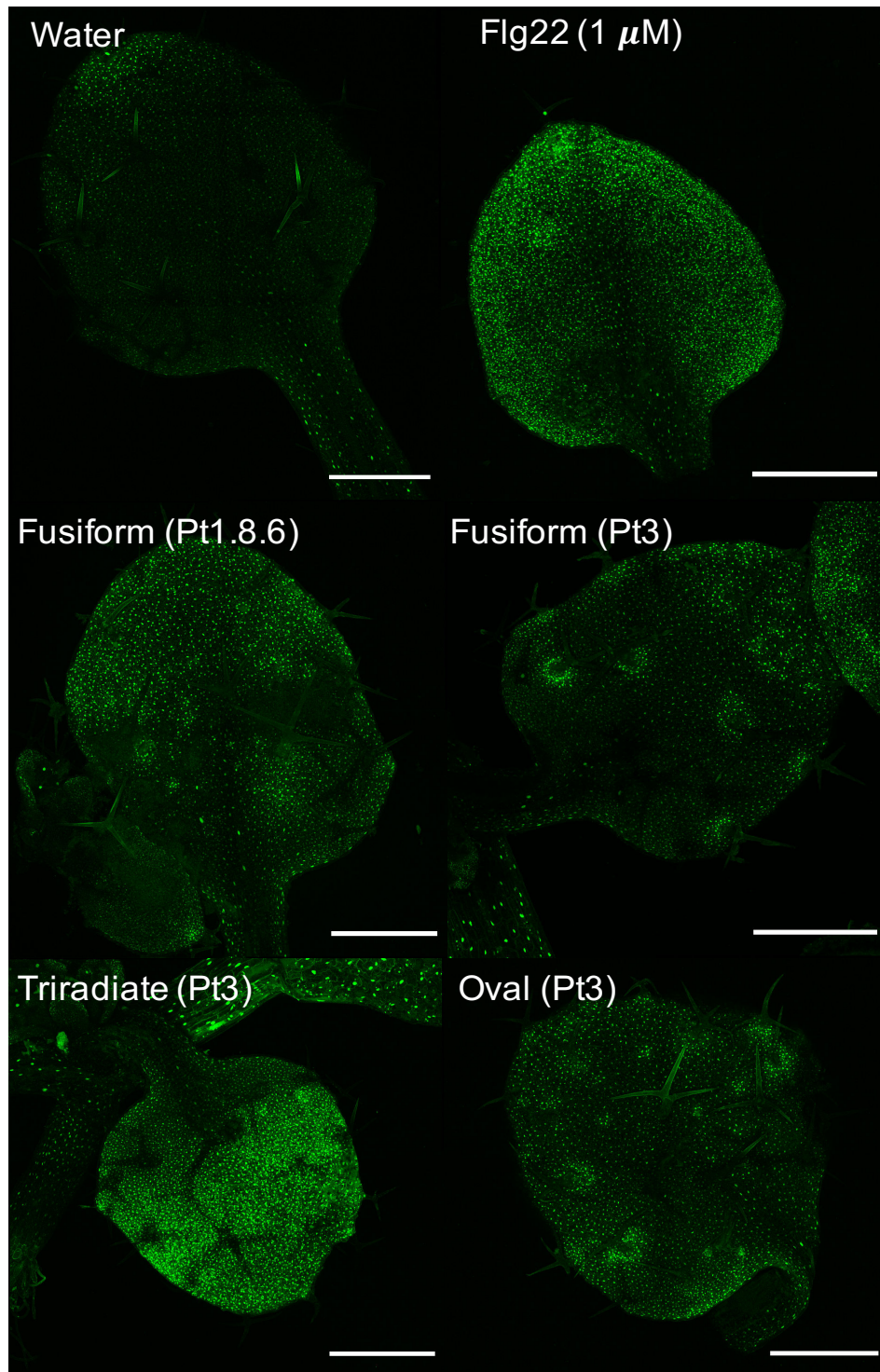


Figure 53 : Effects of *P. tricornutum* cell homogenates on “*ACS6*” gene expression tested on ACS6 : YFP Arabidopsis seedlings expression ACS6 :YFP.

Nine-day-old seedlings were treated with water, 1 μ M Flg22, and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval. Fluorescence (green spots in leaf nuclei) was recorded with a laser confocal microscope. Scale bars = 500 μ m. Representative pictures of 3 plants in 3 biological replicates.

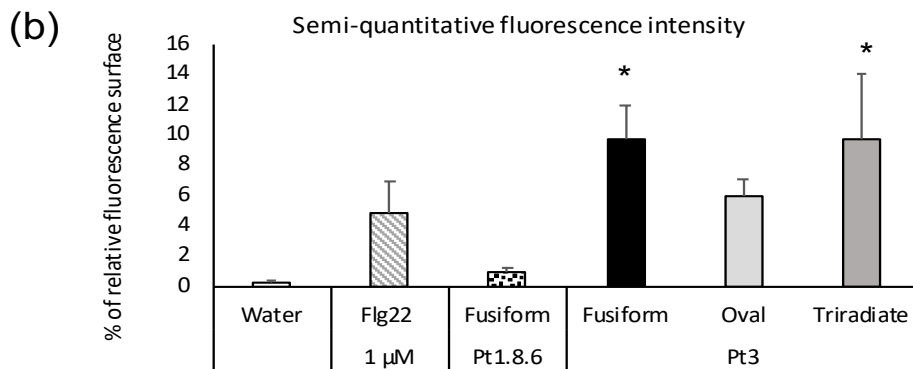
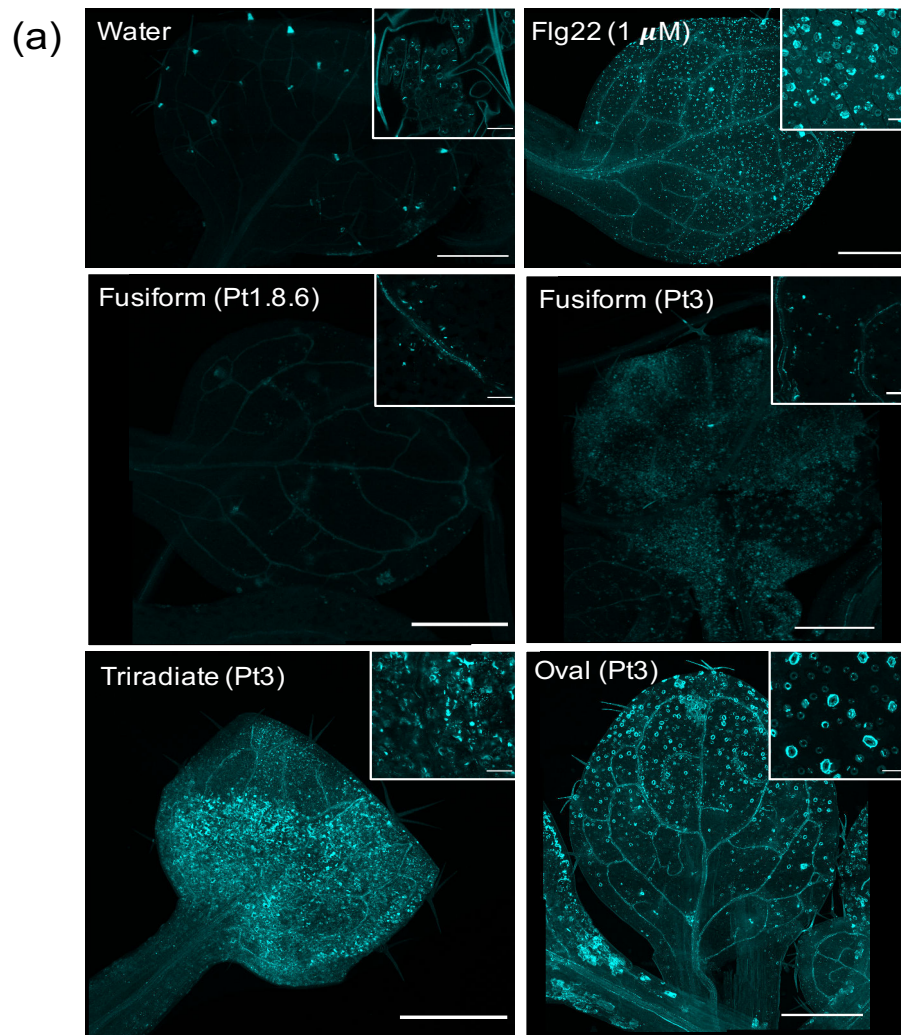


Figure 54 : Effects of *P. tricornutum* cell homogenates (2 mg/mL) on callose deposition in 9-day-old *Arabidopsis* leaves treated for 48 h with water, 1 μ M Flg22, and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval.

(a) Callose deposits were stained with 0.1% aniline blue. Observations were performed with a confocal laser-scanning microscope (excitation : 405 nm; emission: 473-493 nm). Scale bars = 500 μ m and 50 μ m for the magnification images.

(b) Relative fluorescence was estimated using ImageJ software over 5 to 8 plants from 4 independent repetitions. Asterisks indicate significant differences with Dunnett's test : *** p-value < 0.001; **p-value < 0.01; *p-value < 0.5.

2.3 *P. tricornutum* homogenate activates transcriptomic responses in *Arabidopsis thaliana*

To confirm and further investigate the responses induced by *P. tricornutum* homogenates, the expression of defense-related genes involved in early, mid, and late immune responses was analyzed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) (**figure 55**).

One of the rapid responses to MAMPs and/or pathogen perception is the production of ROS. The high production of ROS after pathogen recognition is dependent on NADPH oxidase (RBOH) [51,52]. After Flg22 treatment, the expression of *RBOHD* was upregulated from 1 h to 6 h of treatment (**figure 55a**), but treatment with Pt3 cell homogenates did not have any effect on *RBOHD* expression. This lack of an effect of cell homogenates on specific ROS production was confirmed by detection of ROS using nitro-blue staining (Supplemental figure S2).

MAMP-triggered immunity leads to the activation of mid and later responses, including the activation of hormone signaling pathways that lead to transcriptional reprogramming and a cascade of defense responses. Plant defense signaling is regulated through a complex network of phytohormones with a fine-tuned crosstalk between the main actors: SA, JA, and ET [48]. The SA pathway is mainly effective against biotrophs and allows the establishment of local resistance at the site of pathogen infection and subsequent systemic resistance within the whole plant. Within this complex signaling pathway, the gene encoding *ISOCHORISMATE SYNTHASE 1* (*ICS1*) is one of the central genes triggered by SA. Pt3 cell homogenates did not induce *ICS1* (**figure 55b**) compared to the level induced by the positive control Flg22. The highest transcript level following Pt3 cell homogenate treatment was found for *PR-1* mRNA, and the level was even higher than that obtained with Flg22 treatment (**figure 55c**). There were no differences in the data among the three different Pt3 morphotypes in terms of the intensity of the response. However, as previously observed in the primary screening, the fusiform Pt1.8.6 cell homogenate did not induce the expression of any of the investigated defense-related genes.

WRKY transcription factors play a central role in plant immunity by controlling pathogen-triggered cellular responses. *WRKY40*, an SA-marker that is pathogen inducible [53], was induced 9 times after 1 h of Flg22 treatment, and the expression started to decrease after 3 h (**figure 55d**).

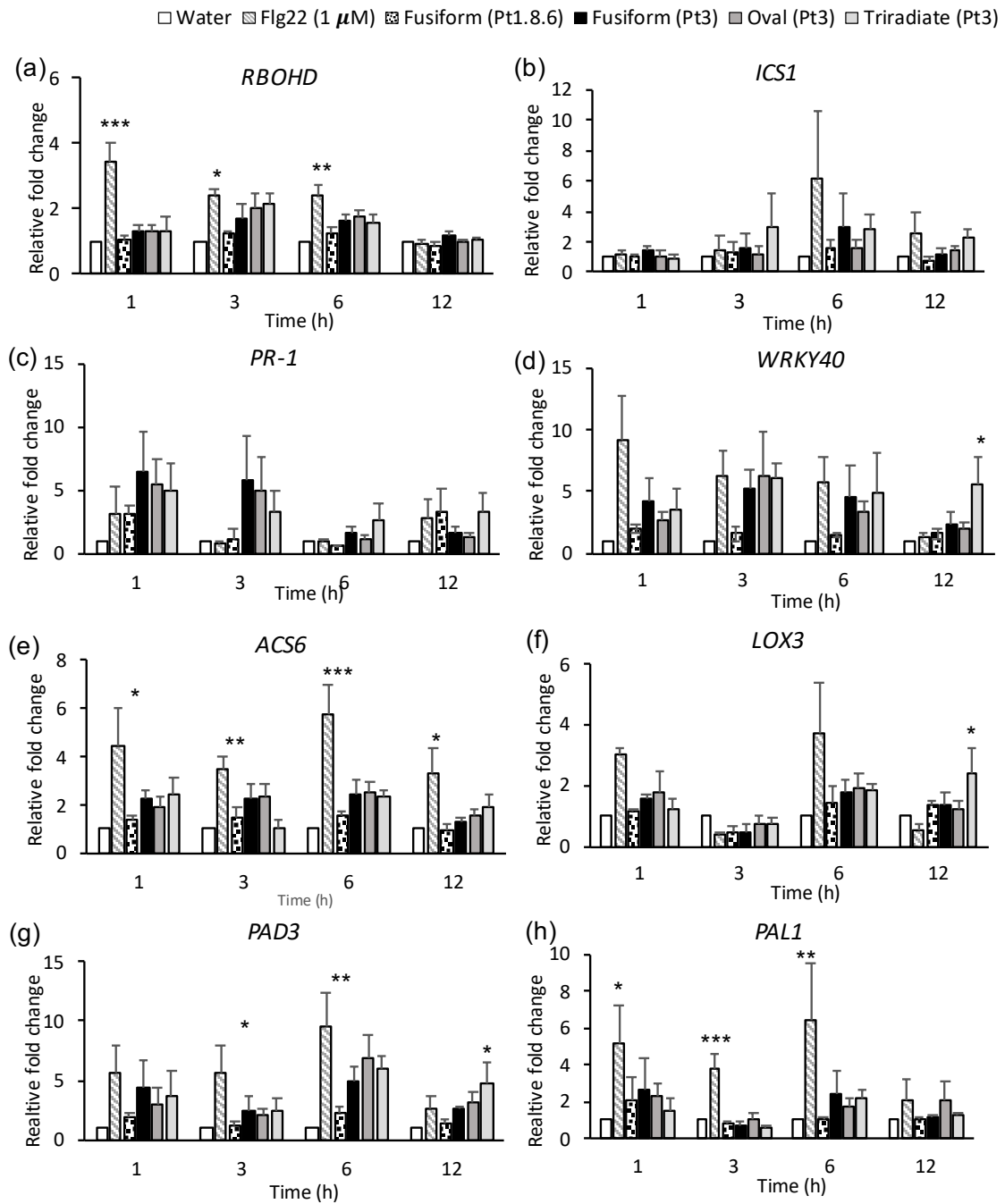


Figure 55 : Effects of *P. tricornutum* cell homogenates on the expression of the defense-related genes (a) *RBOHD*, (b) *ICS1*, (c) *PR-1*, (d) *WRKY40*, (e) *ACS6*, (f) *LOX3*, (g) *PAD3*, and (h) *PAL1* using qRT-PCR in 9-day-old *Arabidopsis Col-0* seedlings.

Plants treated with water, 1 μ M Flg22, and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval were harvested after 1, 3, 6, and 12 hours of treatment. Expression was normalized by comparing each treatment with the water treatment at the same induction times. Histograms with standard errors represent the mean of 4 biological replications. Asterisks indicate significant differences with Dunnett's test: *** p-value < 0.001; **p-value < 0.01; *p-value < 0.5.

In contrast, *WRKY40* expression is up-regulated from 1h in Pt3 crude cell homogenate-treated plant to a lesser extent as compared to flg22 (3-fold). However, after 3h post-treatment the levels of the transcription factor *WRKY40* transcripts increased in each Pt3 crude cell homogenates treated plants at the same level than flg22 (by 6 folds) (**figure 55d**). The jasmonate/ethylene signaling pathway is mainly triggered as defense response against necrotrophs. *ACS6* is known to be involved in ethylene biosynthesis. In accordance with the microscopic analysis of the *ACS6* :YFP transformed plants, Pt3 cell homogenates induced the accumulation of *ACS6* mRNA by 2 times compared to that in water-treated plants (**figure 55e**). Pt3 cell homogenates did not induce *LOX3* a JA marker (**figure 55f**), was observed, in contrast to the results found for Flg22 treatment.

Late defense consists of strengthening the cell wall and producing antimicrobial compounds and secondary metabolites to limit pathogen invasion. We showed that Pt3 cell homogenates induced an increase in the expression of the *PHYTOALEXIN DEFICIENT3 (PAD3)* gene involved in the production of the main *Arabidopsis thaliana* phytoalexin that exhibits antimicrobial activity. The increase in *PAD3* transcripts occurred 6 h after elicitation with Flg22 and Pt3 cell homogenates (10- and 7-fold, respectively) (**figure 55g**). However, no induction of the *PHENYL-AMMONIA LYASE (PAL)* gene, which is involved in secondary phenylpropanoid metabolism, was observed in response to Pt3 cell homogenates, whereas Flg22 upregulated this gene by 6-fold after 6 h of treatment (**figure 55h**).

Altogether, these results demonstrate that only cell homogenates of the Pt3 morphotypes were able to induce the overexpression of genes implicated in early (*WRKY40*), mid (*ACS6*), and late (*PAD3*; *PR-1*) defense pathways.

2.4. *P. tricornutum* crude cell homogenate protects *Arabidopsis thaliana* against the bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000

To characterize their putative protective effects, plants were pretreated with Pt3 crude cell homogenates for 2 days and then inoculated with *Pseudomonas syringae* DC3000 or *Mycosphaerella pinodes*. Disease susceptibility was evaluated 10 days after infection by counting infected leaves and comparing the value to the total number of leaves. Consistent with the activation of defense responses, micro-algae homogenates sprayed on *Arabidopsis thaliana* leaves at a concentration of 2 mg/mL helped to reduce disease development in Pt3 fusiform homogenate-treated plants (40% of infected leaves) compared to water-treated plants (55%) (**figure 56a-56b**). However, no efficient protection was found for Pt1.8.6, oval, and triradiate Pt3 cell homogenate-treated plants. The protective effect of the fusiform Pt3 cell homogenate was much more pronounced in vitro in 3-week-old plants (**figure 56c** ; Supplemental figure S3). Fusiform Pt3 homogenate-treated plants had green leaves, whereas in all of the other treatment groups, the leaves appeared to be completely yellow and chlorotic. To rule out direct antimicrobial activity of *P. tricornutum*, we investigated the in vitro effect of adding cell homogenates to the Luria Bertani bacterial culture media on *Pseudomonas syringae* DC3000. This experiment revealed that fusiform Pt1.8.6 and oval Pt3 crude homogenates did not exhibit any inhibitory activity on the growth of *Pst* DC3000. In contrast, the inhibition of *Pst* DC3000 in nutritive LB media containing fusiform and triradiate Pt3 cell homogenates was observed (**Table XI**). This result suggests that both fusiform and triradiate Pt3 homogenates have antibacterial activity and are as effective as the antibiotic rifampicin at 100 µg/mL.

In contrast, none of the treatments protected *Pisum sativum* against the fungi *Mycosphaerella pinodes* under the tested conditions (**figure 57**).

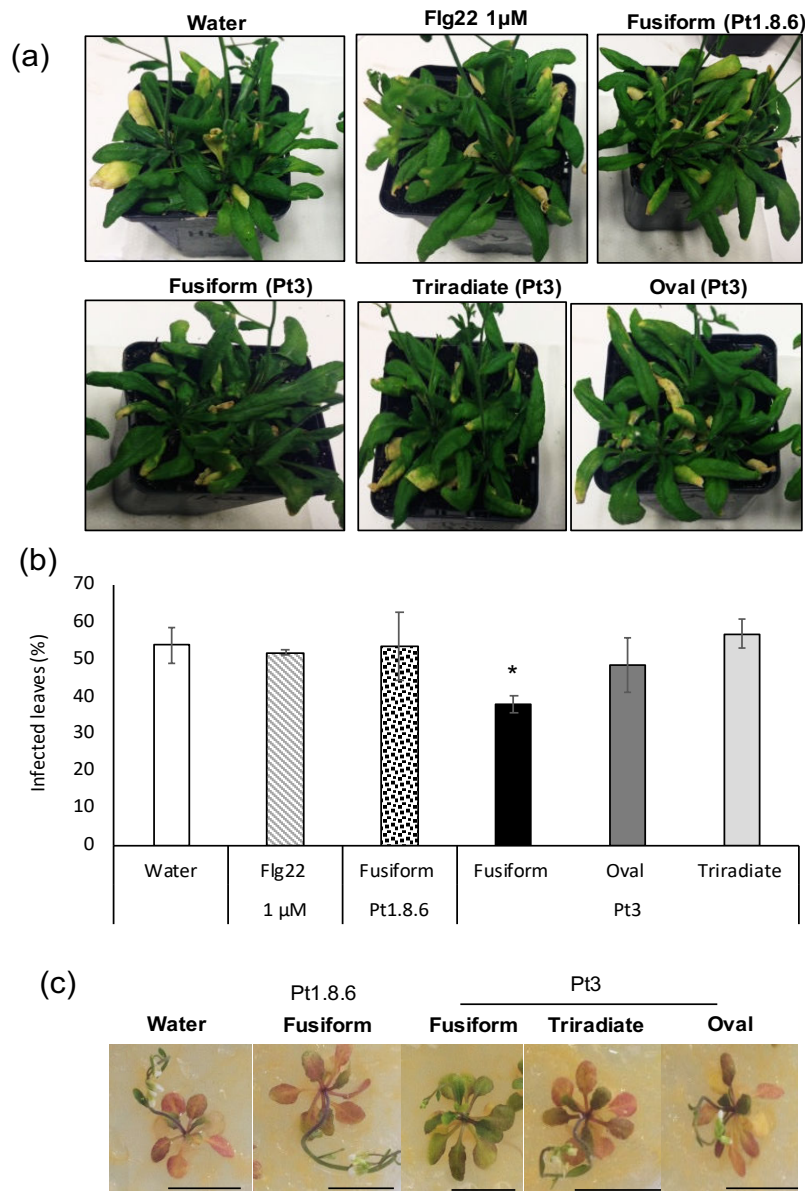


Figure 56 : Effects of *P. tricornutum* cell homogenates on disease symptom development caused by *Pseudomonas syringae* DC3000 (*Pst*) in 4-week-old *Arabidopsis thaliana* plants.

Plants treated with water, 1 μ M Flg22, and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval were inoculated with 5.10^6 CFU/mL *Pst* 48 h after treatment. (a) Disease symptoms caused by *Pst* infection after 10 days of infection triggered necrotic lesions in all treated plants. Note, disease symptoms were less pronounced in fusiform Pt3-treated plants than in water-treated plants. (b) Number of infected leaves compared to total number of leaves. (c) Effects of *P. tricornutum* cell homogenates on disease symptom development caused by *Pseudomonas syringae* DC3000 (*Pst*) *in vitro* in 3-week-old *Arabidopsis thaliana*. Histograms with standard errors represent the mean of 3 biological replicates with 4 to 6 plants per condition. Asterisks indicate significant differences with Dunnett's test: *** p-value < 0.001; **p-value < 0.01; *p-value < 0.5.

Tableau XI : Direct effect of *P. tricornutum* cell homogenates on the biotrophic bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000 24 h after treatment.

Culture LB media containing water, rifampicin (100 µg/mL), and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval were inoculated with 5.10^6 CFU/mL *Pseudomonas syringae* DC3000. Bacteria growth was estimated 24 h after treatment by counting bacterial colonies on LB agar plates. Data represent the mean of 3 biological replicates with 2 technical replicates per condition.

Treatment	CFU/mL	Standard Errors
Water	$1,40. 10^8$	22,73
Rifampicin 100 µg/mL	$< 10^3$	0
Fusiform (Pt1.8.6)	$9,03. 10^7$	15,88
Fusiform (Pt3)	$< 10^3$	0
Triradiate (Pt3)	$< 10^3$	0
Oval (Pt3)	$7,43. 10^7$	50,5

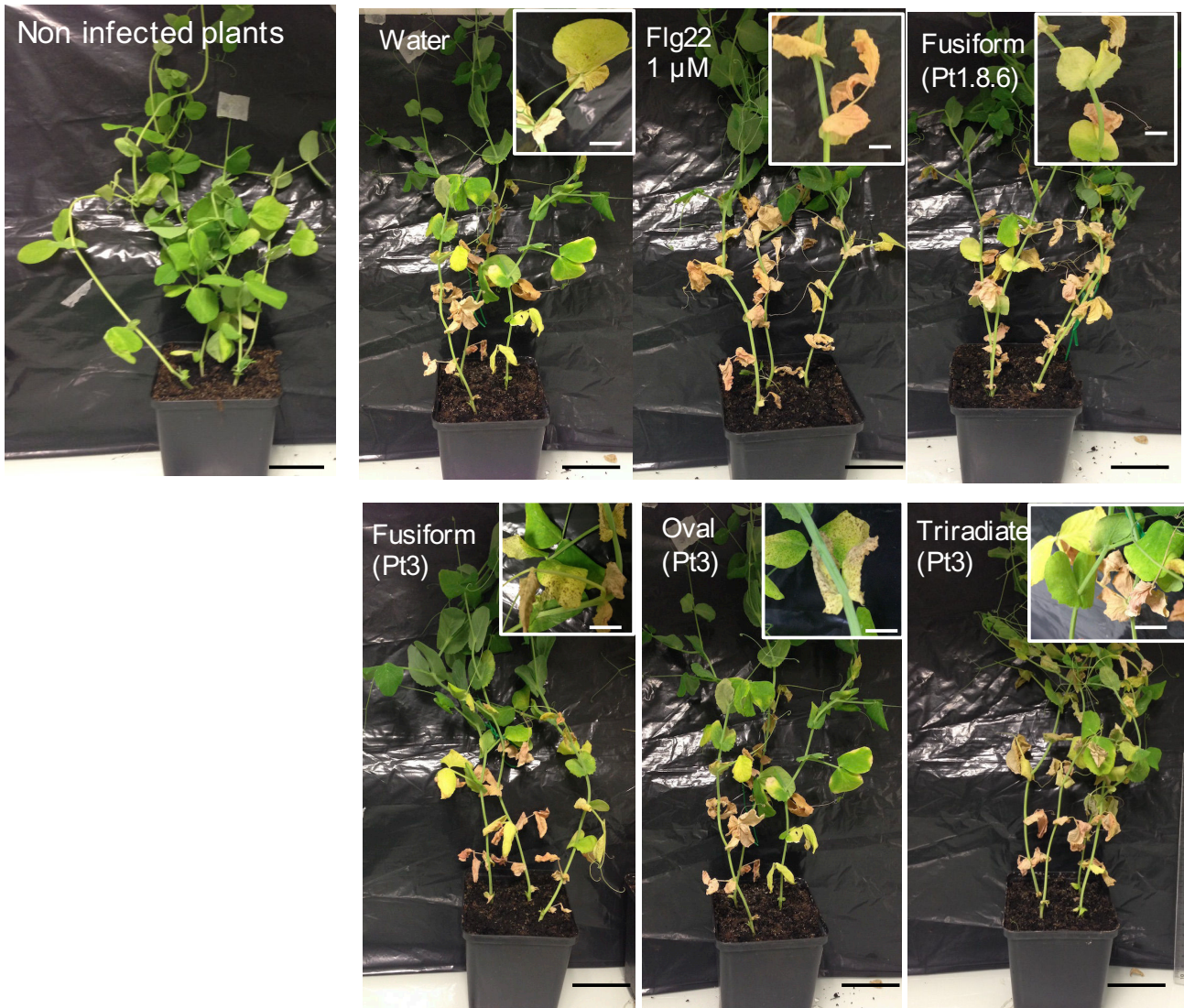


Figure 57: Effects of *P. tricornutum* cell homogenates on disease symptom development caused by the fungi *Mycosphaerella pinodes*.

Pisum sativum cv Le Normand-Mangetout plants were grown in a growth chamber at 20°C/16°C with 16-h/8-h day/night. Then, 15-day-old plants were treated with water, 1 μ M Flg22, and *P. tricornutum* cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval. After 48 h of treatment, the plants were sprayed with a solution of 10^5 spores/mL, and disease symptoms were evaluated 10 and 20 days post-infection. Pictures obtained 20 days post-infection are representative of 3 biological replicates with 4 plants per pot. Scale bars = 1 cm

3. Discussion

The screening performed on transgenic plants with GUS or YFP reporter genes followed by examining callose deposition revealed the potential of *P. tricornutum* cell homogenates to induce plant defense responses. This result is in agreement with recent findings in which microalgal extracts from *P. tricornutum* were used to induce plant resistance against *Plasmopara viticola* [54]. Although this extract was found to be enriched in polysaccharides, the exact biologically active molecules in this extract remain to be identified. Furthermore, the mode of action of this putative elicitor also requires further study.

Here, we showed that cell homogenates prepared from the various morphotypes (fusiform, triradiate, oval) of the strain Pt3 were able to induce cell wall reinforcement by increasing the amount of callose and trigger the expression of the defense-related genes *PR-1* and *ACS6*. These results were confirmed by qRT-PCR, in which the expression fold changes of *ACS6* and *PR-1* were higher in Pt3 homogenate-treated plants than in the control plants. Interestingly, the transcriptional responses of *PR-1* were higher in Pt3-treated plants than in Flg22-treated plants. Under our experimental conditions, Flg22-induced *PR-1*: GUS expression was detected only after 48 h of treatment. This result suggests that Pt3 cell homogenates may more efficiently prime *PR-1* expression in treated plants than the Flg22 elicitor. The effect on the expression of *PR-1*, which is generally used as a marker of salicylic acid, indicated that Pt3 cell homogenates stimulated the SA pathway. SA synthesis may occur through two separate pathways, one requiring PALs activity [55] and the other one requiring *ICS1* [56]. Moreover, the transcription factor *WRKY40* was previously shown to be involved in the SA signaling pathway [57] by increasing *ICS1* and *PR-1* expression. However, in our study, even though *WRKY40* expression was higher in Pt3-treated plants, the increase in *PR-1* expression did not correlate with the increase in either *PAL1* or *ICS1* expression. Because *WRKY40* is responsive to exogenous SA treatment [57], it could be hypothesized that the microalgae homogenate could be an exogenous source of SA, explaining why SA precursors were not induced. Although the presence of SA has not been investigated in *P. tricornutum*, the presence of other endogenous phytohormones such as auxins and cytokinins have been reported in several microalgal strains [58]. Therefore, in future studies, it would be of interest to investigate further the phytohormonal contents of *P. tricornutum* to confirm this hypothesis. In plants, another hormonal pathway that is dependent on JA and often antagonistic to the SA pathway has been shown to be important in the regulation of basal resistance [59,60]. In our experiments, the activation of defense mechanisms might have preferentially occurred through the SA-dependent pathway, as SA markers were consistently expressed much higher (*WRKY40*, *PR-1*) compared to levels in mock-treated plants. By

contrast, Pt3 cell homogenates did not induce the expression of *LOX3*, whose product is involved in the synthesis of a direct precursor of JA, and in leaves, the SA and JA signaling pathways are mutually antagonistic [48]. However, our data suggest a possible cross-talk between the SA and ET pathways, as *ACS6* was expressed, to a lower extent, in Pt3-treated plants. The role of plant hormones, including ET, in plant defenses is complex and intertwined with other pathways [48]. ET has been reported to positively interact with SA [48,61,62] by potentiating SA-mediated *PR1* gene expression [63].

SA was shown to be involved in the protection against biotrophic pathogens, whereas JA was found to be more effective against necrotrophic pathogens [64]. The involvement of the SA pathway in response to Pt3 homogenate treatments is supported by the fact that disease development caused by the biotrophic bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000 was reduced in fusiform Pt3-treated plants. This protective effect was correlated with the increase in the *PR-1* gene [65] and the increase in *PAD3*, a gene involved in the biosynthesis of camalexin, which is the major antimicrobial phytoalexin of Arabidopsis plants [66]. In addition, our results indicated a direct bactericidal effect of fusiform and triradiate Pt3 homogenates on *Pst* DC3000 growth.

Priming agents such as sulfated laminarin and β -aminobutyric acid (BABA) are not able to induce early events such as ROS production [67,68]. Interestingly, in response to BABA, the phytoalexin-related gene *PAL* as well as the JA-marker *LOX* are not upregulated in grapevine [68]. However BABA induces the direct activation of *PR-1* gene expression in *A. thaliana* [41]. Consequently, it can be hypothesized that a similar defense pathway might be induced in *A. thaliana* in response to *P. tricornutum* homogenate treatment.

In the present study, whole *P. tricornutum* homogenates were used to boost plant immunity. Although *P. tricornutum* was recently reported to be a potential candidate for the development of new plant elicitors [54], the biological molecules involved and their mode of action remain unknown. *P. tricornutum* is a diatom taxonomically related to brown macro-algae. It contains chrysolaminarin, which is structurally similar to laminarin [69], a known plant defense stimulator [19,20]. Moreover, diatoms contain silica in their cell wall. Interestingly, some studies have demonstrated that silica can alleviate many abiotic and biotic stresses in plants by boosting defense mechanisms such as the accumulation of lignin, phytoalexins, and callose [70]. These beneficial effects on plants have led to the incorporation of silicates into many fertilizers [71,72]. In our study, we found different levels of elicitation with the fusiform strains Pt3 and

Pt1.8.6. As previously reported in the literature [73], *P. tricornutum* cultures are associated with the presence of bacteria. Various attempts to eliminate bacteria from *P. tricornutum* cultures were proven to be inefficient (Supplemental Table 2) [74]. One hypothesis to explain this close relationship could be the existence of a symbiotic microalgae-bacteria interaction. *P. tricornutum* is able to secrete EPS into the extracellular environment to attract the bacteria needed for its growth [75]. When the microalga is cultured with bacteria, the growth rate and the number of cells are higher than those in axenic conditions [75]. Thus, we should not exclude the possibility that the eliciting effect might also be due to the presence of the co-cultured bacteria. In order to test this hypothesis, we used the only axenic strain Pt1.8.6 (<http://ccap.ac.uk>). Because of the lack of elicitation induced by the Pt1.8.6 strain, it is tempting to speculate that the presence of associated bacteria could modulate plant defense responses. Differences in antimicrobial activities between the oval and fusiform morphotypes have been previously shown [39,40]. Therefore, we hypothesize that microalga under non-axenic conditions and each morphotype produce different metabolites, and these metabolites have different effects on the activation of plant immunity. The nature of the compound responsible for inducing plant defense mechanisms remains unclear, and further studies are needed to determine whether molecule(s) derived from the bacteria or molecule(s) produced by the microalga are involved in this specific interaction.

4. Conclusions

To date, research on elicitor molecules from marine sources has predominantly focused on macroalgae. Little attention has been paid to microalgae, despite their rapid growth. The results of the present study demonstrate the ability of *P. tricornutum* homogenates to induce plant defense responses, including the expression of defense-related genes such as *PR-1*, *WRKY40*, *PAD3*, and *ACS6* and to have a protective effect against *P. syringae* DC3000. These findings indicate that microalgae represent a promising renewable source of elicitor molecules for plant defense and crop protection.

5. Materials and Methods

Plant growth conditions

The plant material used were *Arabidopsis thaliana* Col-0, a transgenic GUS line obtained from the NASC center: PR-1: GUS (N6357), and transgenic YFP lines [43] obtained from Lehman Silke (University of Warwick, Coventry, United Kingdom). Seeds were surface sterilized with 70% (v/v) ethanol for 5min and 10% (v/v) bleach for 2 min before being washed 5 times with sterilized water and sown on Arabidopsis medium (Duchefa, Nertherlands) supplemented with 1% (w/v) of bacteriological agar. Seeds were stratified for 48 h at 4°C in the dark and grown vertically for 9 days at 22°C under a 16 h/8 h light/night cycle (120 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$). *Arabidopsis thaliana* and *Pisum sativum* plants were sown on the surface of sterilized soil and cultivated in growth chamber in long day photoperiod (16h/8h light/night cycle 20°C/16°C).

For Phaeodactylum strains, Pt3 (CCAP 1052/1B) was obtained from the Chris Bowler Laboratory (ENS, Paris) and Pt1.8.6 (CCAP1055/15, fusiform cells treated with antibiotics) was obtained from the Scottish Association for Marine Science campus respectively. Pt3 cultures enriched in the fusiform, oval, and triradiate morphotypes were adapted in the laboratory. Diatom cells were grown at 19°C under a 16 h/8 h light/night cycle. Fusiform and triradiate cells were cultivated in sterilized 100% natural seawater (SW) (33.3g/L, Instant Ocean) and oval cells were cultivated in 10% SW (3.3g/L). SW was then complemented with a nutrient medium (Conway 1 ml/L) and a metasilicate sodium solution (80 mg/L). *P. tricornutum* cells were grown until their density reached 1.10^7 cells/mL.

Elicitor treatments

Flg22 was synthesized by Dr. J. Leprince, (PRIMACEN platform, Normandie University) and used at a final concentration of $1\mu\text{M}$. *P. tricornutum* cells were centrifuged at $4.500 \times g$ for 5 min and washed once with 10% SW and twice with sterilized water. Cell pellets were resuspended in sterile water in order to reach a final concentration of 5.10^8 cells/mL. Cell suspensions were transferred to a 2 mL tube of lysing matrix D (MP Biomedicals) and homogenized by 12 runs of 30 s at 6.5 m/s with the FastPrep® system (MP Biomedicals). The obtained microalgae extract was diluted 5 times in order to obtain a final concentration of 2 mg/mL (dry weight/volume). For inhibition of root growth, seedlings were treated after 7 days of growth by applying elicitors directly on roots and the root length was measured with ImageJ software. For germination assays, seeds were sown on Arabidopsis medium and treated with 10 μL of elicitors. For quantitative PCR and microscopic analyses, 9-days-old seedlings were transferred into liquid Arabidopsis medium containing the respective elicitors. Seedlings used for quantitative PCR were harvested after 1, 3, 6, and 12 h of treatment,

and seedlings used for microscopic analysis were harvested after 24 h of treatment. The promoter :: YFP lines were observed using a confocal microscope (Leica SP8, excitation 488 nm; emission: 516-540 nm).

GUS histochemical assay

For the GUS histochemical assay, plants were fixed in 80% acetone for 20 minutes at 4°C after 24 and 48 h of elicitor treatment. Plants were washed twice with GUS solution (50 mM sodium phosphate pH 7, 2 mM K₄[Fe(CN)₆], 2 mM K₃[Fe(CN)₆], 0.2% (v/v) Triton). Plants were then incubated in the dark at 37°C in GUS solution supplemented with 1 mM X-Glucuronic for 16 h. Tissues were fixed in ethanol: acetic acid (3:1 v/v) for 2 h and progressively rehydrated in a series of 75%, 50%, 25% ethanol and water. Tissues were cleared in NaOH solution (10% v/v) at 37°C for 5 min and observed with a stereomicroscope (Leica).

Callose staining

Callose deposits were detected as described by Millet et al. (2010) [9] with some modifications. After 48 h of treatment, seedlings were fixed in ethanol: acetic acid (3:1 v/v) for 2 h followed by successive ethanol and water baths, as previously described. Seedlings were cleared in NaOH solution (10% v/v) at 37°C for 1h and stained overnight at 4°C with 0.1 % (w/v) decolorized aniline blue prepared in 150 mM K₂HPO₄, pH 12. Roots and leaves were examined using a confocal microscope (Leica SP8, Laser intensity: 15%, Excitation: 405 nm; Emission: 443-490). Quantification of the aniline blue fluorescence-emitted by callose deposits was performed using ImageJ software. The fluorescent callose area was compared to the total area of plant material and expressed as the percentage of the relative fluorescence surface.

RNA isolation and qRT-PCR

For quantitative PCR, 9 day-old seedlings were transferred into liquid Arabidopsis medium containing the respective elicitors. Seedlings were harvested after 1, 3, 6 and 12 h of treatment and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-nagel) following the manufacturer's instructions with a RNA elution procedure in two steps : a first elution with the standard elution volume of 30 µL of RNase free-water followed by the application of the eluate once more onto the column for reelution in order to obtain high yield and high concentration of RNA. Prior to qRT-PCR, contaminating genomic DNA was eliminated using a Turbo DNA-free kit (Invitrogen™). First-stand cDNA was synthesized from 800 ng of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Real time qRT-PCR was performed using a qRT-PCR ABI PRISM 7500 machine and a PCR mix including 1X Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), cDNA template and each of the forward/reverse primers pairs. The PCR cycling conditions were the following : 20 s at 95 °C, followed by 40 cycles at 95°C for 30s, 60°C for 30s, and finally 15s at 95 °C. After completion of

the cycling parameters, dissociation melt curve analyses (60 °C for 1 min, followed by 15 s at 95 °C and 15 s at 60 °C) were conducted to check the possible primer-dimers formation and the reaction specificity. Relative genes expressions levels were calculated by the efficiency correction method [76,77] which has been improved using the combination of housekeeping genes in one mathematical model. The combination of the best housekeeping genes was identified using Normfinder software (MOMA). The expression ratio (R) of a target gene was calculated based on the efficiency of the primers (E) and the threshold cycle (Ct) of sample1 against a reference sample (0), and expressed by comparison to several (n) housekeeping genes (Hk):

$$E. R = \frac{E_{\text{target}}^{(Ct_{\text{target}0} - Ct_{\text{target}Sample1})}}{[E_{\text{Hka}}^{(Ct_{\text{Hka}0} - Ct_{\text{Hka}Sample1})} \cdot E_{\text{Hkb}}^{(Ct_{\text{Hkb}0} - Ct_{\text{Hkb}Sample1})}]^{1/n}}$$

The investigated genes were *PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN1 (PR-1)*, *PHYTOALEXIN DEFICIENT3 (PAD3)*, *PHENYLALANINE AMMONIA LYASE1 (PAL1)*, the transcription factor *WRKY-40*, *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN D (RBOHD)*, *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 6 (ACS6)* and *LIPOXYGENASE 3 (LOX3)*. *MYB-LIKE TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY PROTEIN* and *PEROXIN 5* were used as housekeeping genes [78]. The list of primers used is shown in Suppl. Table S1.

Pathology tests

Plant infection

The *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain DC3000 (*Pst*) was used as a pathogenic model to infect *in vivo* 4-week-old *Arabidopsis thaliana* plants and *in vitro* 3-week-old *Arabidopsis thaliana* plants. *Pst* was grown at 28 °C in Luria Bertani (LB) liquid growth medium under 150 rpm agitation. *Pst* suspension cells was grown in a new medium for 12 h and centrifuged at 2500 x g for 5 minutes at ambient temperature. Dilution in sterile physiological saline solution (0.9% NaCl, pH 7) was performed to reach a final density of 5.10⁶ CFU/mL. After 48 h treatment with water, 1 µM Flg22 and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate and Pt3 oval, 2 mL of the bacterial suspension was sprayed on the leaves. After 10 days, the number of infected leaves was counted and compared to the total number of leaves.

Mycosphaerella pinodes (*Mp* 91.31.12) was grown on sterilized V8 medium composed of 99 mL vegetable juice (V8) and 30 g agar in 801 mL distilled water at 20°C under a 12 h/12 h light/night cycle (120 µmol m⁻²/s). After 10 days of growth, cultures were flooded with distilled water, the agar surface was gently scraped, and the suspension was filtered through a 40 µm cell strainer. Spore concentration was adjusted to 1.10⁵ spores/mL. After 48 h of treatment with water, 1 µM Flg22 and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval, 2 mL of the spore suspension was sprayed on the leaves.

The experiments were carried out three times with three biological cell homogenates and with two technical replicates.

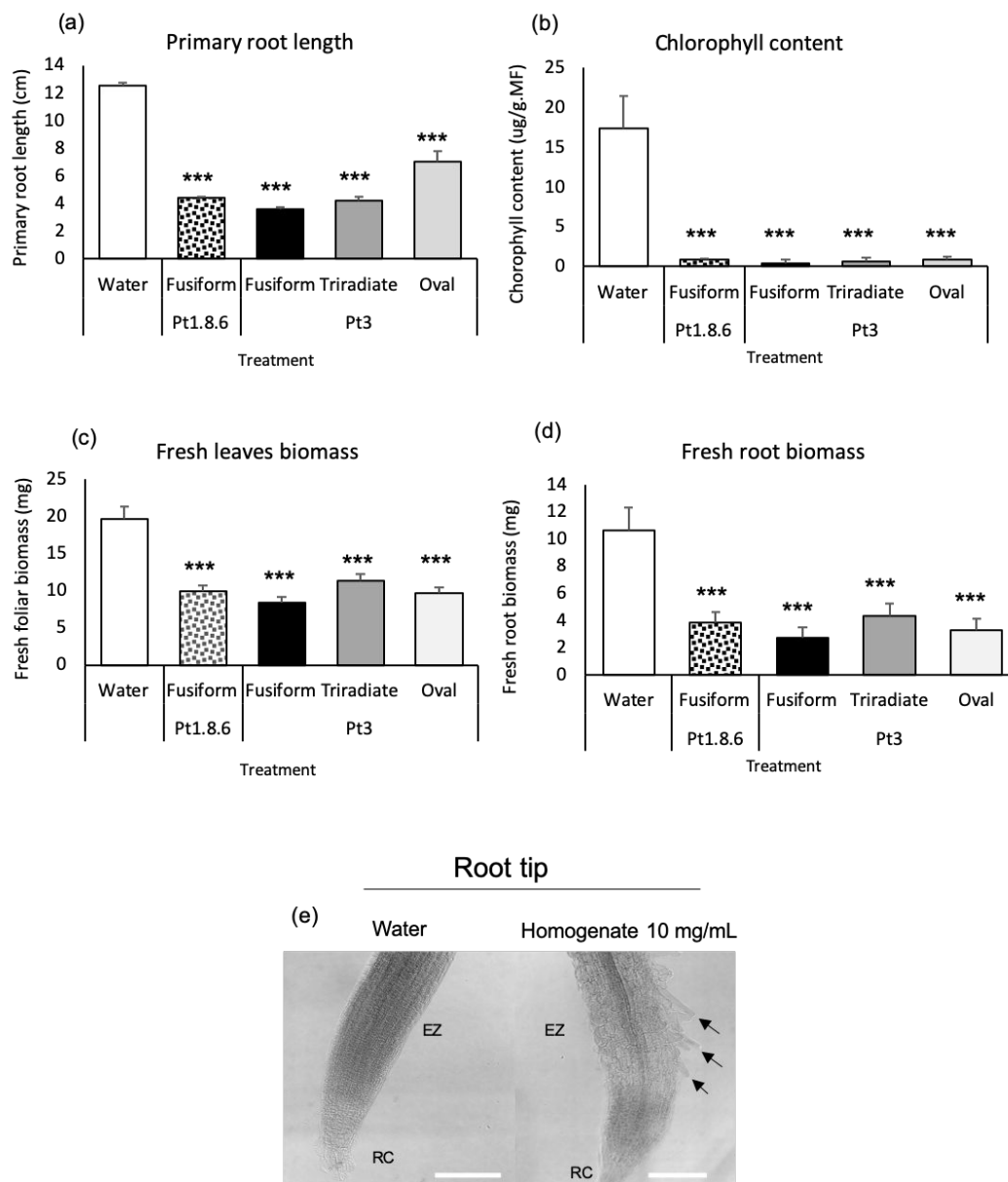
Bactericidal effect

Pst was grown at 28 °C in Luria Bertani (LB) liquid growth medium supplemented with water (negative control), 100 µM rifampicin (positive control), and cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval for 24 h under 150 rpm agitation. The extracts were diluted by serial dilution at 1/10, spotted on solid LB medium, and incubated for 2 days at 28°C. The number of bacterial colonies (CFU) was counted.

Statistical analysis

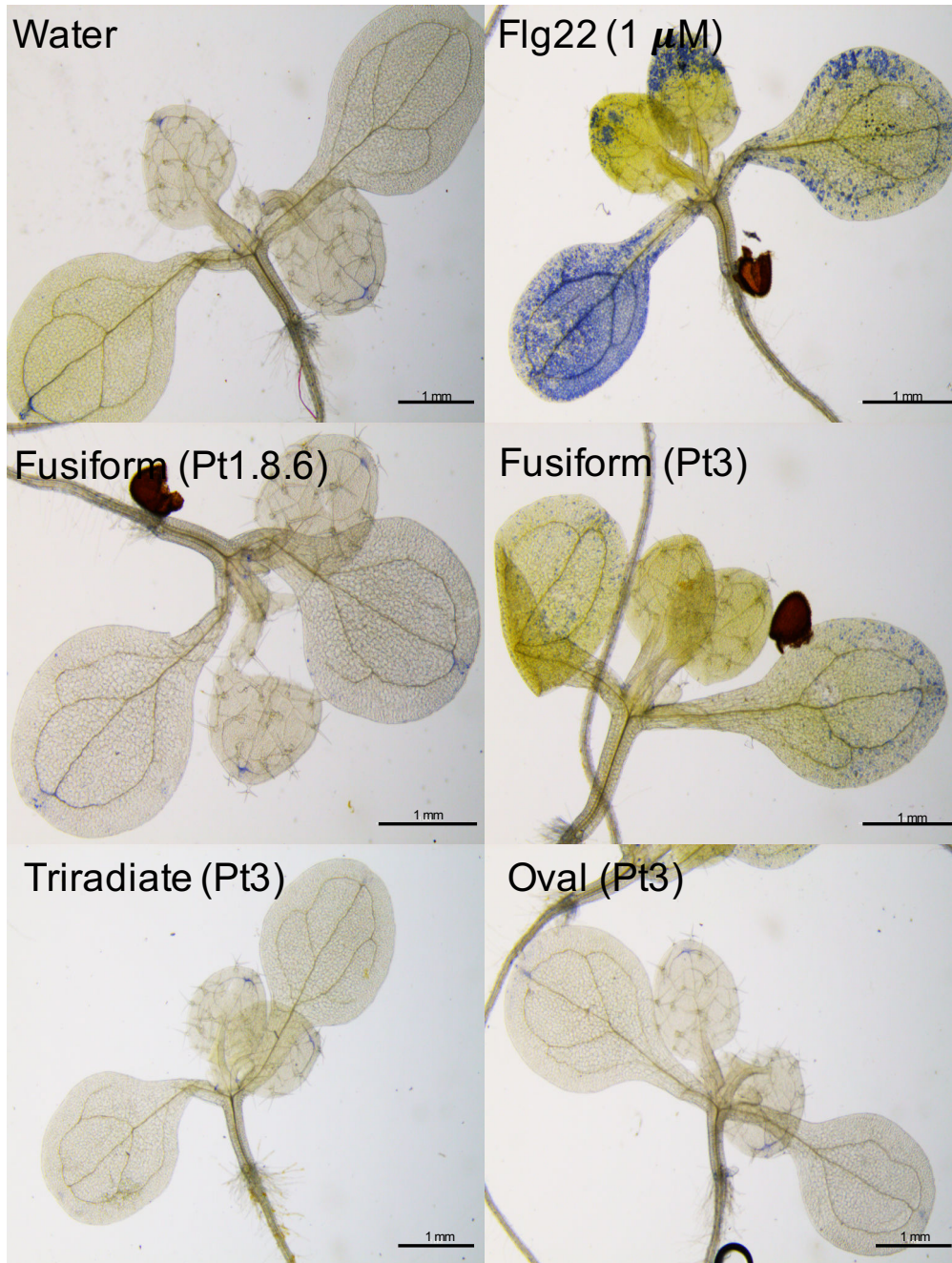
Statistical analyses were performed with the R Program [79] using the Dunnett test that permit to compare each treatment with the single negative control. The results were compared to water-treated plants: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$).

Supplementary Materials:



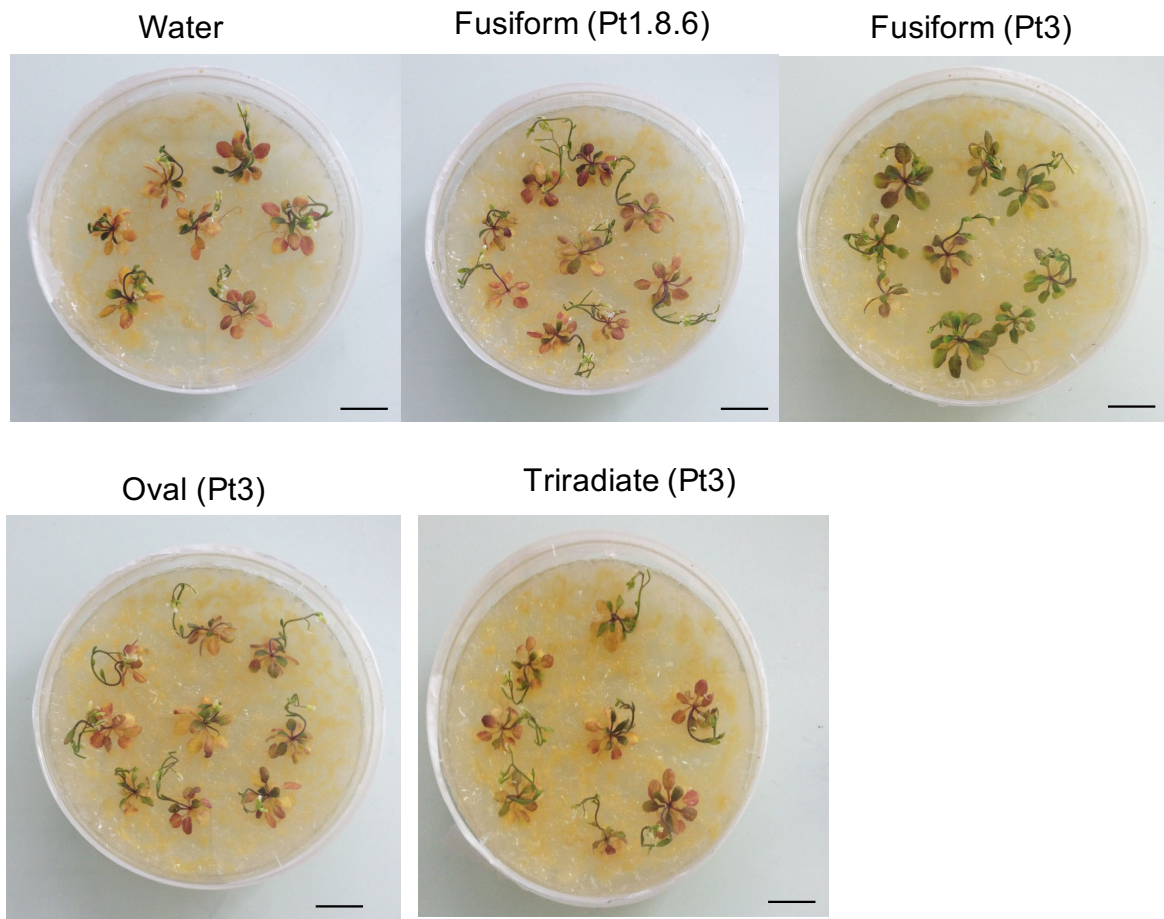
Supplemental Figure S1 : Effects of 10 mg/mL *P. tricornutum* crude cell homogenates on the growth of *Arabidopsis thaliana* Col-0 seedlings.

Seedlings were vertically sown on *Arabidopsis* synthetic growth medium. The treatment was applied to 7-day-old seedlings. (a) Primary root length, (b) chlorophyll content, and (c) leaf and (d) root biomass were measured after 7 days of treatment. Confocal microscopic observations of the root tip and root elongating zone were performed after the water (e) and *P. tricornutum* crude cell homogenate (10 mg/mL) treatments. Arrows indicate the presence of a root hair in the elongating zone. Chlorophyll content was measured by a spectrophotometric method following acetone extraction. In each experiment, 6 to 10 plants were assayed in 4 biological replicates. Scale bars = 100 μ m. Asterisks indicate significant differences with Dunnett's test: *** p-value < 0.001; **p-value < 0.01; *p-value < 0.5.



Supplemental figure S2: ROS detection using nitro blue tetrazolium staining in 9-day-old Arabidopsis leaves after 10 min of treatment with water, 1 μM Flg22, and *P. tricornutum* cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval.

Pictures obtained with a binocular microscope are representative of 11 to 15 seedlings from 3 biological replicates. Scale bars = 1 mm.



Supplemental figure S3: Effects of *P. tricornutum* cell homogenates on disease symptom development caused by *Pseudomonas syringae* DC3000 (*Pst*).

Plants were grown *in vitro* on Arabidopsis synthetic growth medium. Water, 1 μ M Flg22, and *P. tricornutum* cell homogenates (2 mg/mL) of Pt1.8.6 fusiform, Pt3 fusiform, Pt3 triradiate, and Pt3 oval treatment were sprayed on 3-week-old leaves, and bacterial inoculation was performed 48 h after treatment by foliar spraying with $5 \cdot 10^6$ CFU/mL. Pictures were obtained 1-week post-infection with a binocular microscope. Observations are representative of 3 biological replicates. Scale bars = 1 cm

Supplemental table S1 : List of the primers genes sequences used for the Real-Time qRT- PCR analyses.

	Accession number	Gene	Gene names	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
Defense related gene	At5g47910	RBOHD	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D	CTGGACACGTAAGCTCAGGA	GCCGAGACCTACGAGGAGTA
	At2g37040	WRKY40	WRKY transcription factor 40	GTGTGCACTCAGAAAGGAA	GGCTTGTTCCTTCGTGCTT
	At4g11280	ACS6	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 6	GGTGGTTCAGATCGCAAGGA	TGCTCTCGCGGATAAACTCG
	At3g26830	PAD3	CAMALEXIN SYNTHASE	GTGGAGTCGCTGGCATAACA	GTCCCAAGTGTGTCCGAA
	At2g37040	PAL1	PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 1	GTGTGCACTCAGAAGGAA	GGCTTGTTCCTTCGTGCTT
	At1g74710	ICS1	SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2	GAGACTTACGAAGGAAGATGATGAG	TGATCCCAGCTGCAAATTCACTCTC
	At1g17420	LOX3	LIPOXYGENASE 3	CCCGACAAATCATCCGAGCT	GCTCTCCGCTTTTATCAGA
	At2g14610	PR-1	PATHOGENESIS RELATED PROTEIN 1	TTCTTCCCTCGAAAGCTCAA	AAGGCCACCAGAGTGTATG
Reference gene	At2g47210	SWC4	MYB-LIKE TRANSCRIPTION FACTOR FAMILY PROTEIN	ATCGTGAAGGGTCGTATGCC	CCAGGACCCCTTGGCTTTTITG
	At5g56290	PEX5	PEROXIN 5	AGTGTCCAGAGTGCTGATGC	CATGTTTGCCCAAGCACGAA

Supplemental table S2 : Antibiotic cocktails used to prevent contamination by *Pt3 P. tricornutum* culture. Antibiotics were added to 1 mL of *P. tricornutum* culture for 2 days.

Antibiotic-treated cultures were grown in 10 mL of sea water (10% for oval cells, 100% for triradiate and fusiform cells). The presence or absence of bacteria was estimated after 2 weeks of culture by spreading *P. tricornutum* on LB solid growth medium at 20°C, 30°C, and 37°C. NA: absence of bacteria; +: presence of bacteria; strain Pt1.8.6 did not exhibit any contamination.

<i>P. tricornutum</i> strain		Antibiotics	Concentration	Temperature			Ref.	
				37°C	30°C	20°C		
Pt3	medium 1	Kanamycin	100 µg.mL ⁻¹	NA	+	+	[79]	
		Cefotaxin	100 µg. mL ⁻¹					
		Rifampicin	10 µg. mL ⁻¹					
		Gentamycin	100 µg. mL ⁻¹					
	medium 2	Penicillin	0,1 mg. mL ⁻¹	NA	+	+	[35,80]	
		Spectomycin	0,1 mg. mL ⁻¹					
	medium 3	Gentamycin	50 µg. mL ⁻¹	NA	+	+	[74]	
		Spectinomycin	50 µg. mL ⁻¹					
		Kanamycin	200 µg. mL ⁻¹					
		Ampicillin	100 µg. mL ⁻¹					
			Chloramphenicol	2,2 µg. mL ⁻¹				
	Pt1.8.6	-	-	-	NA	NA	NA	

Funding: This work was supported by La Région de Normandie (Projects VIVEPOIS and LICORNE 2016-2019), la Structure Fédérative de Recherche “Normandie Végétale” (FED 4277), the University of Rouen Normandy.

Acknowledgments:

We are grateful to Dr. Silke Lehmann, University of Warwick, for providing the YFP construct lines and assistance.

We thank Dr. Christophe LeMay, UMR IGEPP Inra Le Rheu, for sending us the *Mycosphaerella pinodes* strain.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chinchilla, D. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The plant cell online* **2006**, *18*, 465–476.
2. Gust, A.A.; Biswas, R.; Lenz, H.D.; Rauhut, T.; Ranf, S.; Kemmerling, B.; G?tz, F.; Glawischnig, E.; Lee, J.; Felix, G.; et al. Bacteria-derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 32338–32348.
3. Henry, G.; Thonart, P.; Ongena, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2012**, *16*, 257–268.
4. Choi, H.W.; Klessig, D.F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology* **2016**, *16*.
5. De Lorenzo, G.; Ferrari, S.; Cervone, F.; Okun, E. Extracellular DAMPs in Plants and Mammals: Immunity, Tissue Damage and Repair. *Trends in Immunology* **2018**.
6. Jones, J.D.G.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* **2006**, *444*, 323–329.
7. Bigeard, J.; Colcombet, J.; Hirt, H. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant* **2015**, *8*, 521–539.
8. Boller, T.; Felix, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **2009**, *60*, 379–406.
9. Millet, Y.A.; Danna, C.H.; Clay, N.K.; Songnuan, W.; Simon, M.D.; Werck-Reichhart, D.; Ausubel, F.M. Innate Immune Responses Activated in Arabidopsis Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell* **2010**, *22*, 973–990.
10. Shine, M.B.; Xiao, X.; Kachroo, P.; Kachroo, A. Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science* **2019**, *279*, 81–86.
11. Choudhary, D.K.; Prakash, A.; Johri, B.N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* **2007**, *47*, 289–297.
12. Durrant, W.E.; Dong, X. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2004**, *42*, 185–209.
13. Pieterse, C.M.J. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* **1998**, *10*, 1571–1580.

14. Ton, J.; Van Pelt, J.A.; Van Loon, L.C.; Pieterse, C.M.J. Differential Effectiveness of Salicylate-Dependent and Jasmonate/Ethylene-Dependent Induced Resistance in *Arabidopsis*. *MPMI* **2002**, *15*, 27–34.
15. Ben Salah, I.; Aghrouss, S.; Douira, A.; Aissam, S.; El Alaoui-Talibi, Z.; Filali-Maltouf, A.; El Modafar, C. Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against verticillium wilt of olive. *Journal of Plant Interactions* **2018**, *13*, 248–255.
16. Ali, O.; Ramsubhag, A.; Jayaraman, J. Biostimulatory activities of *Ascophyllum nodosum* extract in tomato and sweet pepper crops in a tropical environment. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216710.
17. Cook, J.; Zhang, J.; Norrie, J.; Blal, B.; Cheng, Z. Seaweed Extract (Stella Maris®) Activates Innate Immune Responses in *Arabidopsis thaliana* and Protects Host against Bacterial Pathogens. *Marine Drugs* **2018**, *16*, 221.
18. Stadnik, M.J.; Freitas, M.B. de Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology* **2014**, *39*, 111–118.
19. Klarzynski, O.; Plesse, B.; Joubert, J.M.; Yvin, J.C.; Kopp, M.; Kloareg, B.; Fritig, B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 1027–1038.
20. Aziz, A.; Poinssot, B.; Daire, X.; Adrian, M.; Bézier, A.; Lambert, B.; Joubert, J.M.; Pugin, A. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2003, pp. 1118–1128.
21. Renard-Merlier, D.; Randoux, B.; Nowak, E.; Farcy, F.; Durand, R.; Reignault, P. Ioduric acid, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1156–1164.
22. Paulert, R.; Ebbinghaus, D.; Urlass, C.; Moerschbacher, B.M. Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants: Priming effect of ulvan in cereal cells and plants. *Plant Pathology* **2010**, *59*, 634–642.
23. de Freitas, M.B.; Stadnik, M.J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2012**, *78*, 8–13.
24. Cluzet, S.; Torregrosa, C.; Jacquet, C.; Lafitte, C.; Fournier, J.; Mercier, L.; Salamagne, S.; Briand, X.; Esquerre-Tugaye, M.-T.; Dumas, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant, Cell and Environment* **2004**, *27*, 917–928.
25. Mercier, L.; Lafitte, C.; Borderies, G.; Briand, X.; Esquerre-Tugaye, M.-T.; Fournier, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist* **2001**, *149*, 43–51.
26. Vera, J.; Castro, J.; Contreras, R.A.; González, A.; Moenne, A. Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **2012**, *79*, 31–39.
27. Klarzynski, O.; Descamps, V.; Plesse, B.; Yvin, J.-C.; Kloareg, B.; Fritig, B. Sulfated Fucan Oligosaccharides Elicit Defense Responses in Tobacco and Local and Systemic Resistance Against Tobacco Mosaic Virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2003**, *16*, 115–122.
28. Lapshina, L.A.; Reunov, A.V.; Nagorskaya, V.P.; Zvyagintseva, T.N.; Shevchenko, N.M. Inhibitory effect of fucoidan from brown alga *Fucus evanescens* on the spread of infection induced by tobacco mosaic virus in tobacco leaves of two cultivars. *Russian Journal of Plant*

Physiology **2006**, *53*, 246–251.

29. Acién, F.G.; Fernández, J.M.; Magán, J.J.; Molina, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 1344–1353.
30. Farid, R.; Mutale-joan, C.; Redouane, B.; Mernissi Najib, E.; Abderahime, A.; Laila, S.; Arroussi Hicham, E. Effect of Microalgae Polysaccharides on Biochemical and Metabolomics Pathways Related to Plant Defense in *Solanum lycopersicum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2018**.
31. Renuka, N.; Guldhe, A.; Prasanna, R.; Singh, P.; Bux, F. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology Advances* **2018**, *36*, 1255–1273.
32. Chiaiese, P.; Corrado, G.; Colla, G.; Kyriacou, M.C.; Roupheal, Y. Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1782.
33. Elarroussi, H.; Elmernissi, N.; Benhima, R.; Kadmiri, I.M.E.; Bendaou, N.; Smouni, A. Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. **2016**, *10*.
34. Bowler, C.; Allen, A.E.; Badger, J.H.; Grimwood, J.; Jabbari, K.; Kuo, A.; Maheswari, U.; Martens, C.; Maumus, F.; Otililar, R.P.; et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **2008**, *456*, 239–244.
35. De Martino, A.; Bartual, A.; Willis, A.; Meichenin, A.; Villazán, B.; Maheswari, U.; Bowler, C. Physiological and Molecular Evidence that Environmental Changes Elicit Morphological Interconversion in the Model Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protist* **2011**, *162*, 462–481.
36. Tesson, B.; Gaillard, C.; Martin-Jézéquel, V. Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Botanica Marina* **2009**, *52*.
37. Ovide, C.; Kiefer-Meyer, M.-C.; Bérard, C.; Vergne, N.; Lecroq, T.; Plasson, C.; Burel, C.; Bernard, S.; Driouich, A.; Lerouge, P.; et al. Comparative in depth RNA sequencing of *P. tricorutum*'s morphotypes reveals specific features of the oval morphotype. *Scientific Reports* **2018**, *8*.
38. Desbois, A.P.; Lebl, T.; Yan, L.; Smith, V.J. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *81*, 755–764.
39. Desbois, A.P.; Mearns-Spragg, A.; Smith, V.J. A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricorutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology* **2009**, *11*, 45–52.
40. Prestegard, S.; Erga, S.; Steinrücken, P.; Mjøs, S.; Knutsen, G.; Rohloff, J. Specific Metabolites in a *Phaeodactylum tricorutum* Strain Isolated from Western Norwegian Fjord Water. *Marine Drugs* **2015**, *14*, 9.
41. van Hulten, M.; Pelsler, M.; van Loon, L.C.; Pieterse, C.M.J.; Ton, J. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 5602–5607.
42. Shapiro, A.D.; Zhang, C. The Role of NDR1 in Avirulence Gene-Directed Signaling and Control of Programmed Cell Death in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **2001**, *127*, 1089–1101.
43. Poncini, L.; Wyrsh, I.; Dénervaud Tendon, V.; Vorley, T.; Boller, T.; Geldner, N.; Métraux, J.-P.; Lehmann, S. In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular

- pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *Plos one* **2017**, *12*, e0185808.
44. Van Loon, L.C.; Van Strien, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1999**, *55*, 85–97.
 45. van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **2006**, *44*, 135–162.
 46. Menard, R. -1,3 Glucan Sulfate, but Not -1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and Arabidopsis. *The plant cell online* **2004**, *16*, 3020–3032.
 47. Vera, J.; Castro, J.; Gonzalez, A.; Moenne, A. Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. *Marine Drugs* **2011**, *9*, 2514–2525.
 48. Kunkel, B.N.; Brooks, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **2002**, *5*, 325–331.
 49. Voigt, C.A. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science* **2014**, *5*.
 50. Ellinger, D.; Voigt, C.A. Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany* **2014**, *114*, 1349–1358.
 51. Rushton, P.J.; Somssich, I.E.; Ringler, P.; Shen, Q.J. WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **2010**, *15*, 247–258.
 52. Pandey, S.P.; Somssich, I.E. The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *PLANT PHYSIOLOGY* **2009**, *150*, 1648–1655.
 53. Birkenbihl, R.P.; Kracher, B.; Roccaro, M.; Somssich, I.E. Induced Genome-Wide Binding of Three Arabidopsis WRKY Transcription Factors during Early MAMP-Triggered Immunity. *Plant Cell* **2017**, *29*, 20–38.
 54. Emiliano G. Microalgae extract for agricultural use 2018, 27.
 55. Dempsey, D.A.; Vlot, A.C.; Wildermuth, M.C.; Klessig, D.F. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book* **2011**, *9*, e0156.
 56. Wildermuth, M.C.; Dewdney, J.; Wu, G.; Ausubel, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **2001**, *414*, 562–565.
 57. Abeysinghe, J.K.; Lam, K.-M.; Ng, D.W.-K. Differential regulation and interaction of homoeologous WRKY18 and WRKY40 in Arabidopsis allotetraploids and biotic stress responses. *Plant J* **2019**, *97*, 352–367.
 58. Stirk, W.A.; Ördög, V.; Novák, O.; Rolčák, J.; Strnad, M.; Bálint, P.; van Staden, J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains ¹. *J. Phycol.* **2013**, *49*, 459–467.
 59. Takahashi, H.; Kanayama, Y.; Zheng, M.S.; Kusano, T.; Hase, S.; Ikegami, M.; Shah, J. Antagonistic Interactions between the SA and JA Signaling Pathways in Arabidopsis Modulate Expression of Defense Genes and Gene-for-Gene Resistance to Cucumber Mosaic Virus. *Plant and Cell Physiology* **2004**, *45*, 803–809.
 60. Thaler, J.S.; Humphrey, P.T.; Whiteman, N.K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* **2012**, *17*, 260–270.
 61. Adie, B.; Chico, J.M.; Rubio-Somoza, I.; Solano, R. Modulation of Plant Defenses by Ethylene. *J Plant Growth Regul* **2007**, *26*, 160–177.
 62. Häffner, E.; Diederichsen, E. Belowground Defence Strategies Against Verticillium Pathogens. In *Belowground Defence Strategies in Plants*; Vos, C.M.F., Kazan, K., Eds.;

Springer International Publishing: Cham, 2016; pp. 119–150 ISBN 978-3-319-42317-3.

63. Lawton, K.A.; Potter, S.L.; Uknes, S.; Ryals, J. Acquired Resistance Signal Transduction in Arabidopsis Is Ethylene Independent. *Plant Cell* **1994**, *6*, 581–588.
64. Glazebrook, J. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 205–227.
65. Flors, V.; Ton, J.; Van Doorn, R.; Jakab, G.; García-Agustín, P.; Mauch-Mani, B. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*: Role of callose and ABA in resistance. *The Plant Journal* **2007**, *54*, 81–92.
66. Zhou, N. Arabidopsis PAD3, a Gene Required for Camalexin Biosynthesis, Encodes a Putative Cytochrome P450 Monooxygenase. *THE PLANT CELL ONLINE* **1999**, *11*, 2419–2428.
67. Gauthier, A.; Trouvelot, S.; Kelloniemi, J.; Frettinger, P.; Wendehenne, D.; Daire, X.; Joubert, J.-M.; Ferrarini, A.; Delledonne, M.; Flors, V.; et al. The Sulfated Laminarin Triggers a Stress Transcriptome before Priming the SA- and ROS-Dependent Defenses during Grapevine's Induced Resistance against *Plasmopara viticola*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88145.
68. Dubreuil-Maurizi, C.; Trouvelot, S.; Frettinger, P.; Pugin, A.; Wendehenne, D.; Poinssot, B. β -Aminobutyric Acid Primes an NADPH Oxidase-Dependent Reactive Oxygen Species Production During Grapevine-Triggered Immunity. *MPMI* **2010**, *23*, 1012–1021.
69. Caballero, M.A.; Jallet, D.; Shi, L.; Rithner, C.; Zhang, Y.; Peers, G. Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research* **2016**, *20*, 180–188.
70. Bélanger, R.R.; Benhamou, N.; Menzies, J.G. Cytological Evidence of an Active Role of Silicon in Wheat Resistance to Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). *Phytopathology* **2003**, *93*, 402–412.
71. Currie, H.A.; Perry, C.C. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Ann. Bot.* **2007**, *100*, 1383–1389.
72. Guntzer, F.; Keller, C.; Meunier, J.-D. Benefits of plant silicon for crops: a review. *Agron. Sustain. Dev.* **2012**, *32*, 201–213.
73. Moejes, F.; Succurro, A.; Popa, O.; Maguire, J.; Ebenhöf, O. Dynamics of the Bacterial Community Associated with *Phaeodactylum tricornutum* Cultures. *Processes* **2017**, *5*, 77.
74. Moejes, F.W.; Wanjiku, F. Dynamics of the bacterial community associated with *Phaeodactylum tricornutum* cultures: a novel approach to scaling up microalgal cultures, Dissertation, Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, 2016, 2016.
75. Buhmann, M.T.; Schulze, B.; Förderer, A.; Schleheck, D.; Kroth, P.G. Bacteria may induce the secretion of mucin-like proteins by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Phycology* **2016**, *52*, 463–474.
76. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45.
77. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **2008**, *3*, 1101–1108.
78. Kudo, T.; Sasaki, Y.; Terashima, S.; Matsuda-Imai, N.; Takano, T.; Saito, M.; Kanno, M.; Ozaki, S.; Suwabe, K.; Suzuki, G.; et al. Identification of reference genes for quantitative expression analysis using large-scale RNA-seq data of *Arabidopsis thaliana* and model crop plants. *Genes & Genetic Systems* **2016**, *91*, 111–125.
79. Su, J.; Yang, X.; Zheng, T.; Hong, H. An efficient method to obtain axenic cultures of

Alexandrium tamarense—a PSP-producing dinoflagellate. *Journal of Microbiological Methods* **2007**, *69*, 425–430.

80. Willis, A.; Chiovitti, A.; Dugdale, T.M.; Wetherbee, R. Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): structure, composition, and adhesive characteristics. *Journal of Phycology* **2013**, n/a-n/a.

© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



III. Fractionnement de l'homogénat de cellules broyées

Un début de fractionnement de l'homogénat de cellules broyées Pt3 fusiforme a été entrepris dans le but de déterminer une fraction contenant la ou les molécule(s) élicitrices. L'homogénat total, c'est-à-dire non fractionné, est utilisé comme référentiel dans cette expérimentation puisque des effets SDP ont été observés chez des plantes traitées avec celui-ci. L'homogénat non chauffé a été centrifugé afin de récupérer le culot et le surnageant. En parallèle ces mêmes fractions, cette fois-ci chauffée à 90°C pendant 2 heures ont été testées (**figure 58**). Les résultats indiquent qu'il y a une activité lorsque les plantes PR1 : GUS sont traitées avec les fractions surnageantes et filtrées non chauffées (**figure 58A**). En revanche cette activité ne semble pas présente dans les plantes traitées avec la fraction culot. Ce résultat suggère que la molécule à l'origine de l'effet observé est une molécule soluble. De plus l'effet est également retrouvé dans la fraction surnageante chauffée à 90°C ce qui suggère que la ou les molécule(s) sont résistante à la chaleur (**figure 58B**). Il est donc peu probable que l'effet soit causé par une protéine.

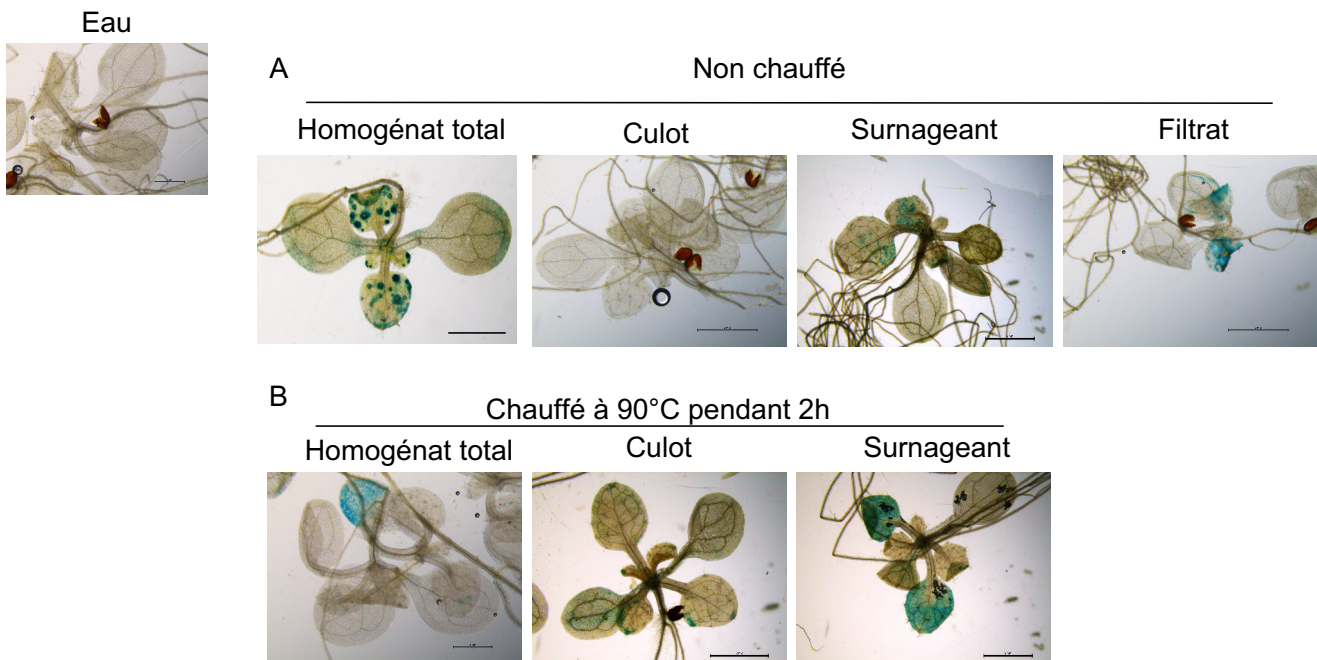


Figure 58 : Induction de l'expression du gène *PRI* chez les plantes transformées *PRI* : GUS après application de différentes fractions d'un homogénat de cellules broyées fusiforme Pt3.

Différentes fractions d'un homogénat de cellules fusiformes Pt3 ont été préparées.

(A) Homogénat (2mg. mL^{-1} , masse volume) non chauffé centrifugé à $10\ 000\ \text{g}$ 10 minutes ou filtré à travers un filtre $0,22\ \mu\text{m}$.

(B) Homogénat (2mg. mL^{-1} , masse volume) chauffé 2 heures à $90\ ^\circ\text{C}$ puis centrifugé à $10\ 000\ \text{g}$ 10 minutes. La filtration de l'homogénat a échoué.

Les préparations fractionnées (filtrat, surnageant, culot) ont été testées sur des plantes transformées *PRI* : GUS. Les plantes ont été transférées dans un milieu nutritif *Arabidopsis* contenant les fractions et traitées pendant 24h . Le volume final est de $1\ \text{mL}$ de façon à obtenir des conditions de traitement équivalente à celle obtenue pour les homogénats totaux. Les résultats sont représentatifs de 3 réplicats biologiques contenant 3 à 5 plantes exempté pour la fraction filtrat qui n'a pu être testée qu'une seule fois pour des raisons techniques. Barres d'échelle : $2\ \text{mm}$.

Discussion

Bien que présentant de sérieux avantages en matière d'efficacité et de rapidité de protection, les stratégies de lutte chimique employées en agriculture jusqu'à maintenant sont confrontées à leurs limites. L'usage des pesticides posent de nombreux problèmes sanitaires et écologiques : toxicité envers les mammifères et les microorganismes biologiques du sol, problème de dégradation dans l'environnement, non-spécificité des traitements et phénomènes de résistance sur certains organismes pathogènes (Liu, Che, et Chen 2016; Brent et Hollomon 2007). Les phénomènes de résistance causent d'importants dégâts et les traitements jusqu'alors utilisés deviennent inefficaces. Des études ont montré que certains organismes tels que *Botrytis cinerea* étaient devenus résistants aux fongicides dérivés de benzimidazoles (fongicide systémique à large spectre) alors que ceux-ci avaient montré une efficacité supérieure à celle des fongicides multisites lors de leur mise sur le marché dans les années 1970 (Hmouni et al. 2003; Mouden et al. 2010). *Mycosphaerella graminicola*, l'agent pathogène responsable de la septoriose du blé a également développé des résistances à la plupart des pesticides récents (Leroux et al. 2007). Par conséquent, la réduction de l'usage des produits phytopharmaceutiques est devenue, au fil de ces dernières années, une attente citoyenne forte et une nécessité pour préserver la santé et la biodiversité. Les citoyens se tournent donc de plus en plus vers les produits issus d'une agriculture plus durable et plus respectueuse de l'environnement. Pour répondre à cette demande, les recherches se focalisent sur la valorisation de molécules naturelles pour stimuler les défenses des plantes.

Lorsque les plantes sont attaquées par un pathogène, elles ont la capacité d'induire une résistance dans les tissus distants de manière à augmenter leur capacité de résistance lors d'une attaque ultérieure. Deux formes de résistance peuvent être induites chez la plante : la résistance systémique acquise (SAR) qui est dépendante de la voie de l'acide salicylique et la résistance systémique induite (ISR) qui dépend des voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Basé sur ce principe, l'utilisation de molécules capables de simuler une attaque pathogène apparaît comme une alternative particulièrement attrayante pour induire l'une de ces résistances et protéger la plante lors d'une réelle attaque. Ceci correspond au principe de la vaccination végétale. Plusieurs molécules telles que des polysaccharides extraits de macroalgues ont prouvé leur capacité à induire des réponses immunitaires chez plusieurs espèces végétales (Mercier et al. 2001; Aziz et al. 2003; Klarzynski et al. 2003; Paulert et al. 2010; Jaulneau et al. 2010; Sangha et al. 2010; Gauthier et al. 2014; de Freitas et al. 2015; Adrian et al. 2017; Cook et al. 2018). Les efforts de recherche se concentrent beaucoup sur le secteur algal (Burketova et al. 2015; Craigie 2011) qui suscitent un intérêt grandissant en agriculture car les algues représentent une alternative durable aux intrants. Afin de répondre à la demande grandissante

de ce secteur, la culture de macro-algues à grande échelle s'avère nécessaire. Certains pays, comme les pays asiatiques, ont déjà mis en place des systèmes de culture adaptés à ce type de production, ce sont les fermes algacoles. Cependant, la culture de macro-algues nécessite des espaces conséquents en mer et des conditions particulières (turbidité et profondeur faibles) ce qui implique de rester proche des côtes. Cette activité entre alors en conflit d'intérêts avec les activités liées à la pêche, au tourisme et au commerce. De plus, la culture de macro-algues en laboratoire est difficile. Le cycle de reproduction de certaines algues est parfois complexe et long (cycle annuel). En France, la majorité des algues est issue de la cueillette en milieu naturel. Toutefois, l'exploitation des macroalgues dans leur milieu naturel et les difficultés de production liées à leur cycle de développement constituent des freins à leur utilisation. La valorisation des microalgues comme source de SDP pourrait permettre de s'affranchir de ces contraintes. En effet, les micro-algues se distinguent des macro-algues par leur mode de culture. Celles-ci peuvent être cultivées en bassins ouverts (raceway) ou fermés (bio-réacteurs) ce qui rend possible le contrôle des conditions de cultures. De plus, elles présentent l'avantage d'avoir un cycle de reproduction rapide, certaines pouvant doubler leur biomasse en quelques heures. Les micro-algues pourraient alors représenter une alternative aux macro-algues et permettre un rythme de récolte plus soutenu et mieux contrôlé. Toutefois, encore peu d'études se sont focalisées sur la recherche de molécules élicitrices chez ces microorganismes.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la capacité de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum* à induire des mécanismes de défense chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Au cours de cette étude, un suivi des paramètres physiologiques, moléculaires, et un suivi de symptômes ont été réalisés dans le but de caractériser le mode d'action des traitements à base de microalgues sur les plantes. Afin d'optimiser les modalités d'application des traitements, une étude préliminaire a été menée sur les racines et feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, en conditions contrôlées, en appliquant plusieurs doses d'homogénats ainsi qu'un extrait pariétal de *P. tricornutum*. Cette étude a permis de mettre en avant un effet dose de l'homogénat et de définir l'organe le plus adapté pour mener la suite de l'étude.

I. Mise au point des conditions de l'expérimentation

La première expérimentation a permis d'évaluer l'impact physiologique des homogénats de cellules broyées (10 mg. mL⁻¹ et 2 mg. mL⁻¹) et des extraits pariétaux (AIR) de la microalgue *P. tricornutum* (0,1 mg. mL⁻¹) sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. Les résultats ont montré que l'homogénat à la dose de 10 mg. mL⁻¹ affecte le développement des plantes. Ce traitement a rapidement eu des effets délétères sur les plantes puisque la biomasse et la teneur en chlorophylle ont été fortement diminuées après 2 jours de traitement. En revanche, l'application de ce traitement à une dose plus faible n'a pas montré d'impact physiologique aussi marqué. Des teneurs en chlorophylles équivalentes à celles des plantes non traitées et une biomasse racinaire diminuée de 7 % sont observées avec l'homogénat de cellules fusiformes Pt3 broyées à la dose de 2 mg. mL⁻¹ par rapport aux plantes témoins (eau) alors qu'une diminution de 50 % de la biomasse était observée avec une dose 5 fois plus importante.

Des travaux ont déjà montré, que de fortes concentrations d'extraits d'algues (Kok et al. 2010) et d'éliciteurs tels que la Flagelline22 ou le BABA pouvaient induire une altération de la croissance des plantes (van Hulst et al. 2006). Cet impact sur le rendement peut être attribué à l'activation des mécanismes de défense qui s'accompagnent d'ajustements métaboliques coûteux en énergie au détriment de la croissance de la plante (van Hulst et al. 2006).

L'application des traitements au niveau racinaire et au niveau foliaire a été testé dans le but de déterminer si des mécanismes de défense pouvaient être activés dans ces deux organes.

1. Le système racinaire : une nécessité de trouver de nouveaux marqueurs de défense

Dans un premier temps, l'expression du gène *ZAT12*, marqueur général de stress oxydatif, a pu être mise en évidence chez les plantes traitées avec l'homogénat aux doses de 10 et 2 mg. mL⁻¹. Toutefois, l'effet inhibiteur de croissance observé chez les plantes traitées avec l'homogénat à 10 mg. mL⁻¹ suggère que ce traitement est perçu comme étant un stress plus sévère par les plantes en raison de la texture de l'homogénat. La texture épaisse peut altérer l'oxygénation de la racine et potentiellement induire la formation de ROS. Afin de déterminer si une réponse immunitaire est induite et si les homogénats agissent comme des éliciteurs, d'autres gènes ont été étudiés à l'échelle racinaire. En réponse à un traitement de Flg22, il est possible de voir des changements d'expression de gènes de défense tels que *CYP71A12*, *WRKY11* et *MYB51* au niveau de la zone d'élongation. En revanche, aucune augmentation de

l'expression de ces gènes n'a pu être observé chez les plantes dont les racines ont été traitées avec les homogénats ou les AIR.

D'autres gènes de défense, connus pour être des biomarqueurs dans les feuilles en réponse à la flg22 tels que les gènes *ACS6*, marqueur de l'éthylène ou *ICS1* marqueur de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique, ont été étudiés au niveau racinaire. Les résultats n'ont pas permis de mettre en avant de modification de leur expression même après traitement avec la flg22. Les données bibliographiques permettent d'expliquer ce résultat. En effet, il a été démontré que les mécanismes de défense dans les racines impliquaient des acteurs cellulaires et moléculaires différents de ceux répertoriés dans les feuilles chez plusieurs espèces végétales dont *Arabidopsis thaliana* (Badri et al. 2008; Attard et al. 2010; Marcel et al. 2010; Tytgat et al. 2013; De Coninck et al. 2015; Lyons et al. 2015; Papadopoulou et al. 2018). De plus, il a récemment été mis en évidence que l'immunité racinaire est compartimentée et spécifique d'un éliciteur donné (Millet et al. 2010; Gotté et al. 2016; Chuberre et al. 2018).

Dans l'état actuel des connaissances, l'étude de l'effet inducteur de défense d'éliciteur au niveau racinaire reste difficile et peu documentée. Pourtant, plusieurs arguments avaient encouragé à entreprendre ces essais. En effet, lorsque les éliciteurs sont appliqués par arrosage du sol ou directement sur les racines, la résistance induite par des éliciteurs tels que le BABA ou l'acibenzolar-*S*-methyl (ASM) semble plus efficace et plus durable en comparaison à une élévation par pulvérisation foliaire (Francis et al. 2009; Molinari et Baser 2010). De plus, les racines sont une importante voie d'entrée pour de nombreux organismes pathogènes racinaires (H. Liu et al. 2017) et également pour des organismes pathogènes vasculaires affectant ensuite la partie aérienne (Sesma et Osbourn 2004; Sukno et al. 2008). Stimuler l'immunité des organes racinaires permettrait de prévenir le risque d'infection par les pathogènes. L'efficacité de cette méthode d'élévation a d'ailleurs été démontrée contre l'oomycète *Plasmodiophora brassicae* responsable de la hernie du chou où un traitement racinaire réduisait de manière plus efficace le développement de la maladie par rapport à un traitement foliaire (McGrann et al. 2017). Il serait ainsi intéressant d'étudier les réponses transcriptomiques et métaboliques des racines soumises à un traitement avec la flg22 (Denoux et al. 2008; Poncini et al. 2017), afin de déterminer les marqueurs géniques à l'origine de la défense dans les racines. Ces marqueurs pourraient être utilisés pour la recherche de nouveaux éliciteurs racinaires.

Des études ont déjà mis en avant certaines modifications cellulaires en réponse à la flg22 chez les racines. Par exemple, il a été démontré que les extensines, qui sont des glycoprotéines pariétales riches en hydroxy-proline, sont impliquées dans le remodelage de la paroi végétale racinaire en réponse à une infection (Ribeiro 2006; Wu et al. 2017) ou à un traitement à la flg22 (Plancot et al. 2013; Castilleux et al. 2018, 2019). La détection et la localisation des extensines s'effectuent à l'aide d'anticorps monoclonaux commerciaux tels que LM1, JIM11, JIM12 qui reconnaissent des épitopes spécifiques de résidus monosaccharidiques mais dont la séquence exacte reste inconnue (Castilleux et al. 2018, 2019). L'étude du remodelage pariétal et plus spécifiquement de l'organisation structurale des extensines pourraient s'avérer être de nouveaux marqueurs de défense racinaire *via* des approches microscopiques et géniques.

2. Étude de la réponse foliaire : choix de la méthode d'élicitation

Les conditions d'application initialement choisies pour provoquer une élicitation foliaire se sont avérées contraignantes. Il n'a pas été possible de montrer des modifications de l'expression de gènes de défense notables par élicitation en déposant les substances à tester sur de jeunes feuilles d'*Arabidopsis*. En revanche, avec l'élicitation de la plantule entière par immersion en milieu liquide, l'expression des gènes *WRKY11*, *ACS6*, *ICSI* a clairement été observée par fluorescence en réponse à la flg22. Cette différence peut s'expliquer par le caractère hydrophobe de la cuticule qui réduit la mouillabilité de surface (Müller et Riederer 2005) et ne permet pas un échange de matière suffisant entre les feuilles et l'éliciteur. L'élicitation des plantes entières par immersion dans un milieu liquide contenant directement les éliciteurs a été envisagée. Cette méthode, utilisée dans d'autres travaux, a permis de mettre en évidence des différences significatives entre plusieurs traitements contenant des éliciteurs (de Jonge, Hofius, et Hennig 2017; Poncini et al. 2017; Pečenková, Pleskot, et Žárský 2017; Joglekar et al. 2018). Cependant, il est évident que cette méthode d'élicitation n'est pas transposable dans des conditions de production agricole. Toutefois, en conditions contrôlées et dans l'optique de trouver d'autres sources de molécules élicitrices, cette méthode semble la plus adaptée pour mettre en avant l'effet SDP d'un mélange complexe comme des broyats cellulaires. Il sera ensuite possible d'identifier par fractionnement la ou les molécule(s) responsable(s) de l'effet inducteur des défenses afin de mettre au point un traitement plus efficace et qui pourra être appliqué sur des plantes en conditions réelles.

L'ensemble des informations acquises au cours de cette étude préliminaire révèlent que l'homogénat de microalgue semble induire des effets dépendant de la dose appliquée sur les plantes. Des concentrations trop élevées seraient néfastes à leur développement contrairement à l'application d'une dose plus faible. L'étude réalisée au niveau racinaire n'a pas permis de mettre en avant des modifications de l'expression de gènes de défense, les marqueurs de défense utilisés pour les feuilles n'étant pas transposables aux racines (Attard et al. 2010; Marcel et al. 2010; Papadopoulou et al. 2018). C'est donc grâce à l'étude des mécanismes de défense au niveau foliaire *via* élicitation de la plantule entière en milieu liquide qu'a pu être réalisé un suivi des plantes soumises à un traitement avec l'homogénat à la dose de 2 mg. mL⁻¹.

3. Étude de l'impact des homogénats de cellules broyées de *P. tricornutum* et des morphotypes sur l'induction des défenses des plantes

Ce projet de thèse s'est focalisé sur l'étude de l'effet inducteur de défense d'homogénats de cellules broyées réalisés à partir de cellules de la souche Pt1.8.6 qui dérive d'une culture monoclonale de Pt1 et de la souche Pt3. Ces deux souches proviennent de la même zone géographique et sont issues du même génotype A (De Martino et al. 2007). Ainsi, la capacité d'élicitation de ces deux souches a pu être comparée en tenant compte du morphotype majoritaire de l'une ou l'autre de ces souches. La souche de microalgue Pt1.8.6 est majoritairement fusiforme et la souche Pt3 présente l'avantage de pouvoir être enrichie en l'un ou l'autre des morphotypes fusiformes, triradiés ou ovales selon les conditions de culture (Ovide et al., 2018).

a) Caractérisation des voies métaboliques

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence des modifications cellulaires et moléculaires chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* à la suite d'un traitement avec les homogénats issus des cultures ovales, fusiformes et triradiés de la souche Pt3 (**Tableau XII**). Ces résultats d'abord obtenus par le biais d'un premier criblage ont démontré que l'application d'un homogénat de microalgues broyées (2 mg. mL⁻¹) induit l'apparition de callose, un polymère de $\beta(1-3)$ -glucane, connu pour renforcer la paroi végétale en réponse à une infection par un pathogène (Ellinger et Voigt 2014; Voigt 2014). Parallèlement, deux gènes impliqués dans des voies hormonales de défense tel que l'éthylène (*ACS6*) et l'acide salicylique (*PR-1*) ont montré une expression plus importante chez les plantes traitées avec l'homogénat.

Tableau XII : Tableau récapitulatif des différents marqueurs utilisés pour évaluer l'induction des défenses chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* après un traitement avec les homogénats fusiforme Pt1.8.6, fusiforme Pt3, ovale Pt3, triradié Pt3 en comparaison aux réponses des plantes contrôle traitées avec de l'eau ou de la flg22.

Les réponses de défense ont été évaluées au travers de l'utilisation de plantes transformées dont le promoteur des gènes WRKY11, ACS6, ICS1, PR-1 contrôle l'expression d'un gène rapporteur de type GUS ou YFP. L'expression des gènes de défenses RBOHD, ICS1, PR-1, WRKY40, ACS6, LOX3, PAD3, PAL1 ont été quantifié par méthode qRT-PCR. La callose a été observée après coloration à l'aniline bleue. Le niveau de protection induit par les homogénats a été évalué en mesurant le taux de croissance bactérienne et la gravité de maladie après traitement avec les éliciteurs.

+ : induction du marqueur considéré ; ++ : forte induction du marqueur ; - : absence d'effet

		Traitements					
		-	1 μ M	Pt1.8.6	Pt3		
Constructions gènes rapporteurs		Eau	Flg	Fusifforme	Fusifforme	Oval	Triradié
Voie de l'acide jasmonique	<i>WRKY11</i>	+	++	+	+	+	+
Voie de l'éthylène	<i>ACS6</i>	-	+	+	+	+	+
Voie de l'acide salicylique	<i>ICS1</i>	-	+	-	-	-	-
Composés antimicrobiens	<i>MYB51</i>	-	+	-	-	-	-
Voie de l'acide salicylique	<i>PR-1</i>	-	+	-	++	++	++
Expression de gènes par qRT-PCR							
Stress oxydatif	<i>RBOHD</i>	-	+	-	-	-	-
Voie de l'acide salicylique	<i>ICS1</i>	-	+	-	-	-	-
Voie de l'acide salicylique	<i>PR-1</i>	-	+	-	+	+	+
Voie de l'acide salicylique	<i>WRKY40</i>	-	+	-	+	+	+
Voie de l'éthylène	<i>ACS6</i>	-	++	-	+	+	+
Voie de l'acide jasmonique	<i>LOX3</i>	-	+	-	-	-	-
Composés antimicrobiens	<i>PAD3</i>	-	+	-	+	+	+
Voie des phénylpropanoïdes	<i>PAL1</i>	-	++	-	-	-	-
Modification pariétale	<i>callose</i>	-	+	-	++	++	++
Protection des plantes							
Effet bactéricide Pst DC3000		-	-	-	+	-	+
Effet fongicide <i>M. pinodes</i>		-	-	-	-	-	-
Protection des plantes contre <i>Pst DC3000</i>		-	-	-	+	-	-
Protection des plantes contre <i>M. pinodes</i>		-	-	-	-	-	-

Il est tentant de corréliser l'activation de l'expression du gène de défense *PR-1* avec l'activation de la voie de biosynthèse de SA ce qui pourrait suggérer l'induction de la SAR chez les plantes traitées. En effet, il a été reporté à de nombreuses reprises que le gène *PR-1* est un gène marqueur de la SAR et que son expression dépend de la voie de biosynthèse de SA (Van Loon et Van Strien 1999; Cameron et al. 1999; van Loon, Rep, et Pieterse 2006; Narusaka et al. 2009). La synthèse de SA est activée par le biais de deux voies métaboliques : la voie des phényl-propanoïdes caractérisée par l'enzyme clé, la phenyl-ammonia lyase (PAL) et la voie de biosynthèse impliquant le gène *ICS1* (Dempsey et al. 2011).

Les résultats obtenus par qRT-PCR n'ont pas permis de valider l'implication directe de SA étant donné que l'expression de gènes impliqués dans ces deux voies de biosynthèse n'est pas augmentée par rapport aux plantes non traitées. Toutefois, les résultats ont montré que le facteur de transcription *WRKY40*, également impliqué dans la voie de signalisation de SA, avait un niveau d'expression plus important chez les plantes traitées. De manière intéressante, l'expression de *WRKY40* peut être modulée en réponse à un apport exogène de SA (Abeyasinghe, Lam, et Ng 2019). Il peut alors être envisagé qu'un analogue de SA ou bien que SA puisse être apporté par les homogénats Pt3 ce qui contribuerait à augmenter l'expression du gène *PR-1* chez les plantes traitées. En effet, les algues sont composées de diverses molécules dont de nombreuses phytohormones telles que des auxines, des cytokinines, des bêtaines qui peuvent jouer un rôle dans la défense contre des stress abiotiques et biotiques (Craigie 2011). Ces phytohormones sont également retrouvées chez les microalgues (Stirk et al. 2013) et à l'origine d'une augmentation de la croissance des plantes. Afin de confirmer l'implication de la voie hormonale SA chez les plantes traitées, un dosage de cette hormone pourrait être envisagé afin de compléter cette analyse. Un suivi de l'expression de gènes impliqués dans la voie de SA tels que *EDS5*, *NPRI* et *PBS3* qui catalysent la conversion de métabolites précurseurs en SA permettrait de confirmer ces hypothèses (Dempsey et al. 2011; Rekhter et al. 2019).

Nos résultats ont aussi montré une modification de l'expression du gène *PAD3* chez les plantes traitées avec les homogénats Pt3 fusiforme, ovale et triradié. Le gène *PAD3* est un gène important pour la mise en place des défenses de la plante *Arabidopsis thaliana* puisqu'il intervient dans les premières étapes de la synthèse de la camalexine (Schuhegger et al. 2006). La production de cette phytoalexine, synthétisée à partir de l'acide aminé tryptophane a été reportée suite à des infections bactériennes (*Pseudomonas syringae* DC3000) (Beets et al. 2012; Zhang et al. 2014) et fongiques (*Plectosphaerella cucumerina*) (Denby, Kumar, et Kliebenstein 2004; Sanchez-Vallet et al. 2010). La camalexine joue un rôle important dans la défense en

déstabilisant la membrane cellulaire des agents pathogènes (Zhou 1999). Elle participe ainsi de manière active à la défense de la plante contre les infections (Zhou 1999; Ferrari et al. 2003).

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en avant une augmentation de l'expression des gènes *ICS1* et *PAL1*, impliqué dans la synthèse de SA, bien que le gène *PR-1* dont l'expression dépendant de SA, présente une induction de son expression à la suite des traitements. Ce type de réponse a déjà été reportée dans des études mettant en avant un effet potentialisateur de certains éliciteurs (Conrath et al. 2006; Aranega-Bou et al. 2014). Par exemple, le BABA augmente le niveau de résistance des plantes traitées en potentialisant l'accumulation d'ARNm PR-1 sans induire les mécanismes de défense (Zimmerli et al. 2000). De manière intéressante, un traitement avec le BTH augmente également le niveau des ARNm PR-1 sans induire d'augmentation d'ARNm correspondant au gène PAL (Kohler, Schwindling, et Conrath 2002). Toutefois, lorsque les plantes sont confrontées à une attaque pathogène le niveau d'expression du gène PAL est fortement augmenté par rapport à des plantes non traitées (Kohler, Schwindling, et Conrath 2002). Cet état, bien que non perceptible de manière significative d'un point de vue moléculaire permet cependant à la plante de mettre en place de manière plus rapide les mécanismes de défense. Ainsi, lors d'une éventuelle agression par des pathogènes, la plante répond de manière plus efficace à l'infection et l'expression du gène PAL est activée de manière plus importante chez les plantes traitées (Kohler, Schwindling, et Conrath 2002; Conrath et al. 2006).

Il n'est donc pas à exclure que ce mécanisme d'action soit impliqué dans les réponses observées en qRT-PCR ce qui expliquerait l'absence d'expression du gène PAL dans nos conditions. L'hypothèse que les homogénats de *P. tricornutum* puissent agir comme un potentialisateur de défense peut être admise.

b) Étude de la protection induite par les homogénats cellulaires contre des phytopathogènes foliaires

La comparaison des résultats obtenus pour les plantes témoins traitées avec de l'eau et les plantes traitées avec les homogénats suggèrent que les homogénats Pt3 et plus particulièrement ceux obtenus à partir du morphotype fusiforme pourraient induire un ralentissement du développement de la maladie provoquée par *Pseudomonas syringae* DC3000.

Les résultats ont montré que le pourcentage de feuilles infectées chez les plantes traitées avec l'homogénat était inférieur à celui des plantes témoins traitées avec de l'eau après 10 jours d'infection. Ce résultat peut être expliqué par l'activation des défenses de la plante et plus particulièrement par l'expression des gènes *PR-1* et *PAD3* chez les plantes traitées avec l'homogénat Pt3. En effet, *Pseudomonas syringae DC3000 (Pst)* est un pathogène bactérien de type biotrophe qui infecte les plantes en libérant un analogue de JA, la coronatine, de manière à supprimer la voie de SA et promouvoir le développement de symptômes (Laurie-Berry et al. 2006). Chez les plantes résistantes, la voie de SA est activée et le gène *PR-1* est davantage exprimé (Laurie-Berry et al. 2006). L'effet de protecteur peut également être renforcé par la présence d'une activité biocide des morphotypes fusiformes et triradiés. En effet, lorsque les bactéries étaient inoculées dans un milieu LB contenant les homogénats, leur croissance était stoppée. Le ralentissement de l'infection peut donc être expliquée par la combinaison d'une augmentation des niveaux d'expression de gène de défense et un effet bactéricide sur les bactéries *Pst*. La capacité des homogénats de *P. tricornutum* à induire un effet protecteur est d'ailleurs renforcée par le récent dépôt d'un brevet montrant un effet protecteur de *P. tricornutum* contre l'oomycète pathogène de la vigne *Plasmopora viticola* (Emiliano 2018). Les mécanismes de défense à l'origine de cette résistance n'ont pas encore été renseignés. Cependant, des études ont montré que les plantes qui présentaient des niveaux d'expression du gène *PR-1* plus important avaient une meilleure résistance contre le pathogène *Plasmopora viticola* (Dufour et al. 2013; Guerreiro et al. 2016).

Un schéma global résumant l'ensemble des modifications moléculaires et cellulaires observées au cours de travail est présenté dans la **figure 59** (page 208-209). Cette figure suggère que les homogénats agissent comme des potentialisateurs de défense (A) qui permettront, lors d'une attaque par un agent pathogène de type biotrophe, de répondre plus rapidement et de manière plus efficace dans la mise en place des défenses (B).

En conclusion, nos résultats suggèrent que les homogénats Pt3 stimulent l'expression du gène *PAD3* impliqué dans la biosynthèse de la camalexine, des gènes *PR-1* et *WRKY40* dont l'expression dépend de la voie de SA et du gène *ACS6* impliqué dans la voie de biosynthèse de ET. D'importants dépôts de callose ont aussi été observés dans les organes foliaires des plantes traitées avec les homogénats Pt3. L'ensemble de ces données mettent ainsi en avant la capacité des homogénats Pt3 à induire des réactions associées à la mise en place des défenses. L'induction de ces marqueurs chez les plantes traitées peut être mise en relation avec une augmentation significative de la résistance des plantes traitées avec l'homogénat Pt3 fusiforme contre la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae DC3000* (pathogène biotrophe). Cependant, aucune différence concernant le niveau de protection n'a été observé chez les plantes de Pois infectées par le champignon *Mycosphaerella pinodes* (pathogène hémibiotrophe). Ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux agents pathogènes possèdent des modes trophiques différents. En effet, lorsque la plante est infectée par des pathogènes hémibiotrophes la réponse immunitaire végétale dépendante de SA est efficace durant les premières phases du cycle d'infection du pathogène. En revanche, celle-ci devient inefficace dans les stades plus avancés de l'infection car l'agent pathogène se comporte comme un organisme nécrotrophe, qui *a contrario* des organismes biotrophes, est sensible aux voies de défense hormonale JA et ET (Spoel, Johnson, et Dong 2007).

Figure 59 :Modèle proposé pour expliquer le mode d'action des homogénats de cellules Pt3 broyées sur les cellules végétales.

(A) Application d'un traitement préventif pour l'induction des défenses des plantes

1. Lorsque les homogénats sont appliqués sur les feuilles par pulvérisation foliaire, ils sont reconnus par des récepteurs de type RLK ou RLP localisés au niveau de la membrane plasmique. Il est probable que cette reconnaissance induise dans un premier temps la phosphorylation des MAPK et/ou un influx ionique. Toutefois la production des formes actives de l'oxygène (ROS) n'est pas détectée en réponse aux homogénats.
2. La voie hormonale de l'éthylène est activée à la suite d'une augmentation de l'expression du gène *ACS6*. De manière complémentaire, la voie hormonale de l'acide salicylique serait également activée.
3. L'acide salicylique stimule l'expression du facteur de transcription *WRKY40* qui va à son tour agir sur l'expression du gène marqueur de l'acide salicylique *PR-1*. L'expression du gène *PAD3* est également augmentée.
4. Il est possible d'imaginer que la phytoalexine majeure d'*A. thaliana*, la camalexine, est induite à la suite de l'expression du gène *PAD3* et qu'il y a une accumulation de protéines *PR-1* suite à l'expression du gène *PR-1*. Toutefois, si l'homogénat agit comme un potentialisateur ces métabolites ne seront peut-être pas synthétisés.
5. Un renforcement pariétal engendré par de nombreux dépôt de callose est également observé en réponse aux homogénats.

(B) Après traitement par les homogénats, si la plante est ensuite attaquée par un agent bactérien de type biotrophe, la cellule végétale sera plus efficace dans l'induction de ses défenses.

1. La flg22, peptide du flagelle bactérien, est reconnue par le complexe protéique constitué des récepteurs FLS2/BAK1. Cette reconnaissance induit l'activation des cascades MAPK et des flux ioniques.
2. La voie hormonale de l'acide salicylique est à nouveau activée *via* l'expression du gène *PAL1*. L'acide salicylique s'accumule dans la cellule végétale et s'ajoute aux molécules déjà présentes à la suite du traitement par les homogénats. De manière similaire, la synthèse d'éthylène est à nouveau stimulée.
3. L'expression des gènes *WRKY40*, *PR-1* et *PAD3* est activée de manière plus importante.
4. S'en suit une accumulation de camalexine et de protéines PR-1 qui agissent comme molécules antimicrobiennes.
5. Le renforcement pariétal est à nouveau induit afin de confiner le pathogène au niveau du site d'infection.

4. Hypothèse quant au mode d'action des homogénats

a) Un éliciteur dérivé de la microalgue *P. tricornutum*

Dans le cadre de cette étude, il a été décidé d'utiliser un homogénat sous forme de broyat cellulaire afin de renforcer l'effet SDP potentiel. Les microalgues ont été broyées afin de libérer leur contenu intracellulaire ainsi que leur polysaccharide de réserve. Les niveaux d'expression des gènes de défense peuvent être liés au fait qu'un extrait total ait été utilisé. Il est possible d'imaginer que la résistance induite par les homogénats ne soit pas au maximum de ses possibilités. L'effet de la ou les molécule(s) d'intérêt(s) pouvant être masqué ou dilué par la présence de nombreux débris cellulaires. Au regard de la composition biochimique de la microalgue *P. tricornutum*, il est possible d'émettre plusieurs hypothèses concernant l'origine de l'activité SDP :

- Les diatomées possèdent un polysaccharide de réserve soluble dans l'eau de $\beta(1-3)$ -glucose ramifié en $\beta(1-6)$ appelé la chrysolaminarine (Caballero et al. 2016). Ce polysaccharide possède une structure similaire à la laminarine, un polysaccharide connu pour induire des réactions de défense chez les plantes (Aziz et al. 2003; Bernardon-méry, Joubert, et Hoareau 2013; Gauthier et al. 2014). La chrysolaminarine pourrait alors être reconnue par les plantes de façon similaire à la laminarine et induire l'immunité des plantes.
- La présence de silice dans la paroi des diatomées peut également être un facteur contribuant à l'augmentation de la résistance chez les plantes traitées. La silice participe à l'amélioration de la tolérance contre des stress biotiques (Ghanmi et al. 2004) et abiotiques (Frew et al. 2018) d'où son incorporation dans de nombreux fertilisants (Currie et Perry 2007; Guntzer, Keller, et Meunier 2012). Plusieurs études ont révélé l'efficacité de la silice dans le contrôle de maladies engendrées par des pathogènes fongiques et bactériens chez différentes espèces végétales (Bélanger, Benhamou, et Menzies 2003; Fauteux et al. 2005; Mburu et al. 2016). En effet, la silice participe à l'amélioration de la tolérance aux stress biotiques en formant une barrière physique qui empêche la pénétration d'organismes pathogènes dans la plante. Elle favorise également le renforcement pariétal en induisant la production de callose (M. Wang et al. 2017). Des modifications biochimiques tels que l'induction de l'activité et de l'expression d'enzymes et de gènes de défenses, la production de molécules antimicrobiennes et l'activation de voie de signalisation hormonale ont également été observé chez les

plantes traitées (Fauteux et al. 2005; Van Bockhaven, De Vleeschauwer, et Höfte 2013; M. Wang et al. 2017).

- Un brevet récemment déposé par Emiliano (2018) mentionne qu'une fraction polysaccharidique extrait de *P. tricornutum* présente des effets éliciteurs de défense sur le couple plante/pathogène *Vitis sp./Plasmopara viticola*. Les plantes traitées ont montré une élévation du niveau de production en métabolites associés à des mécanismes de résistance chez les plantes tels que des protéines PR. Toutefois, ce brevet ne mentionne pas clairement si cet extrait a été obtenu à partir de la microalgue *P. tricornutum* ou à partir d'une coculture *P. tricornutum*/cyanobactéries.

Les résultats issus de l'étude de l'expression des transcrits et de l'étude phytopathologique ont permis de mettre en avant différents niveaux d'élicitation concernant les homogénats issus des souches Pt3 et Pt1.8.6. En effet, bien que ces deux souches présentent le même fond génétique, l'homogénat obtenu à partir de la souche Pt1.8.6 ne semble pas augmenter le niveau de résistance des plantes contre la bactérie *Pseudomonas syringae DC3000*. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'aucune modification cellulaire et métabolique n'a été observée chez les plantes traitées avec cet homogénat.

Notre travail permet de formuler une hypothèse pouvant expliquer le lien entre l'effet des homogénats de cellules Pt3 et le manque d'effet des homogénats de cellules Pt1.8.6. Contrairement aux cultures de cellules Pt3, les cultures Pt1.8.6 ont toujours été des cultures dites axéniques, c'est-à-dire dépourvues en bactéries viables cultivables. De manière inverse, les microorganismes présents dans les cultures Pt3 n'ont jamais pu être éliminés malgré plusieurs tentatives de décontamination des cultures par usage de multiples antibiotiques. Il est alors possible de supposer que l'effet positif des homogénats Pt3 sur l'induction des mécanismes de défense soit attribué à l'établissement d'une coculture microalgues/bactéries. En admettant cette hypothèse, les effets bénéfiques des homogénats de cellules Pt3 broyées peuvent être attribués soit uniquement à la présence de bactéries soit exclusivement à la coprésence des microalgues et des bactéries.

b) Interactions microalgues/bactéries

Il a déjà été reporté que les bactéries marines peuvent avoir un effet biostimulant sur les plantes. En effet, les cyanobactéries permettent une augmentation de la croissance de *Pisum sativum* par le biais d'hormones (auxines) et d'acides gras (acide linoléique, palmitoléique) (Gayathri et al. 2017). Elles produisent également des composés à propriétés antifongique, antibactérienne, insecticide et nématocide (Gupta et al. 2013; Hernández-Carlos et Gamboa-Angulo 2011; Desbois et Smith 2015). De plus, de nombreuses données bibliographiques ont déjà reporté l'effet biostimulant de plusieurs microalgues et cyanobactéries (Chiaiese et al. 2018; Renuka et al. 2018; Oancea et al. 2013). Par exemple, des extraits de la cyanobactérie *Spirulina maxima* et de la microalgue *Chlorella ellipsoïda* ont permis d'augmenter les taux de composés antioxydants (caroténoïdes, tocophérols, composés phénoliques) chez des grains de blé contribuant à une augmentation de la tolérance aux stress salins (Abd El-Baky, El-Baz, et El Baroty 2010). Des extraits de *Chlorella sp.*, *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena sp.* ont permis d'augmenter les performances photosynthétiques et la croissance de *Salix viminalis* (Grzesik, Romanowska-Duda, et Kalaji 2017). Les microalgues *Dunaliella salina* et *P. tricornutum* permettent d'augmenter la résistance aux sels au cours de la germination de *Capsicum annuum* (Guzmán-Murillo, Ascencio, et Larrinaga-Mayoral 2013). Bien que la plupart des études relate des effets biostimulants, la cyanobactérie *Microcoleus vaginatus* permet une réduction de 65% des galles racinaires causées par le nématode *Meloidogyne incognita* chez la tomate (Khan et al. 2005). L'efficacité de ces traitements semble dépendant des espèces végétales puisque des différences d'efficacité d'extrait polysaccharidique de *Spirulina platensis* sur *Solanum lycopersium* et *Capsicum annum* ont été mises en évidence (Elarroussi et al. 2016). Cependant, ces données bibliographiques ne précisent pas si l'effet biostimulant ou éliciteur des défenses est lié à l'interaction microalgues/bactéries ou aux bactéries seules.

Les bactéries pourraient induire une reconnaissance de la plante *via* les récepteurs PRRs grâce à des molécules constitutives telles que le peptidoglycane, les lipopolysaccharides ou des protéines du flagelle, considérés comme étant des MAMPs chez les plantes. Cette reconnaissance pourrait induire des mécanismes d'induction des défenses similaires à ceux observés avec la flg22. Toutefois, les résultats obtenus pour le gène *PR-1* *via* analyse microscopique et analyse des transcrits montrent des régulations différentielles de l'expression de ce gène chez les plantes traitées avec les homogénats Pt3 comparativement aux plantes traitées avec la flg22. Ce résultat permet de supposer que l'activité inductrice des défenses ne serait pas liée exclusivement à la présence de flg22 dans les cultures et que l'homogénat de

microalgues broyées présenterait un avantage par rapport à la flg22. Les plantes traitées ont en effet montré une induction des mécanismes de défense plus importante avec un nombre de dépôt de callose plus élevé et un niveau de protection plus efficace contre la bactérie *P. syringae*.

Il est aussi possible d'envisager que les bactéries soient favorables au développement voire essentiel à la croissance des microalgues. Une étude menée par Buhman et ses collaborateurs (2016), a permis de mettre en évidence que la croissance de *P. tricornutum* et que le rendement algal étaient augmentés en présence de l'alpha-protéobactérie *Roseovarius* sp. (R217). De façon complémentaire, il a été observé que lorsque les diatomées étaient cultivées en conditions axéniques, le biofilm formé par les cellules ovales était constitué par des agrégats cellulaires de petite taille alors que lorsque la bactérie *Roseovarius* sp (R217) était ajoutée dans le milieu, les cellules ovales formaient des biofilms de taille plus importante et avec un enrichissement en cellules ovales plus élevé (90% contre 66% en culture axénique) (Buhmann et al. 2016). Cette hypothèse est également confortée par le fait que Pt1.8.6 est la seule souche axénique disponible (<https://www.ccap.ac.uk/>) et que dans nos conditions de culture, les cellules Pt1.8.6 présentaient un taux de croissance inférieur à celui des cellules Pt3.

Les interactions bactéries/microalgues sont finement régulées par la production de molécules bioactives (Sasso et al. 2012; Labeeuw, Bramucci, et Case 2017). Ces molécules permettent l'établissement d'une communication chimique et vont gouverner la nature de l'interaction (Labeeuw, Bramucci, et Case 2017). Les algues peuvent attirer et sélectionner les communautés bactériennes en sécrétant diverses molécules. Ainsi, les exopolysaccharides sécrétés par *P. tricornutum* pourraient être un moyen d'attirer certaines populations bactériennes en leur fournissant une source de carbone (Gügi et al. 2015). En échange, la microalgue pourra bénéficier de molécules favorisant leur croissance (Buhmann et al. 2016) ou une protection contre des agresseurs (Amin, Parker, et Armbrust 2012; Labeeuw, Bramucci, et Case 2017). Par exemple, la division cellulaire de la microalgue *Pseudo-nitzschia multiseries* est favorisée par l'acide indole-3-acétique produit par la bactérie *Sulfitobacter* sp. à partir de tryptophane sécrété par la microalgue (Amin et al. 2015). La microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* sécrète dans son environnement de la riboflavine (vitamine B2) et un dérivé appelé Lumichrome qui miment l'action d'une molécule impliquée dans le quorum sensing bactérien : la *N*-acétyl-homosérine lactone (Teplitski et al. 2004). En réponse, les bactéries du genre *Pseudomonas spp* ou *Vibrio spp* vont induire la production de molécules antimicrobiennes qui permettront de protéger l'algue contre de possibles attaques pathogènes (Teplitski et al. 2004; Rajamani et al. 2008). De manière intéressante, les bactéries du genre *Roseobacter* produisent

des antibiotiques spécifiques qui leur permettent de contrôler les communautés bactériennes environnantes et leur permet d'avoir un accès exclusif aux nutriments sécrétés par la microalgue (Rao et al. 2007).

Des bactéries algicides peuvent aussi altérer la croissance des algues, en conséquence celles-ci ont développé des mécanismes de défense. Les diatomées produisent des acides gras polyinsaturé (PUFA) qui possèdent des propriétés antimicrobiennes (Ribalet et al. 2008; Amin, Parker, et Armbrust 2012). *Phaeodactylum tricornerum* est connue pour produire des PUFA responsables de l'inhibition des bactéries *S. aureus* et *L. anguillarum* (Desbois et al. 2008; Desbois, Mearns-Spragg, et Smith 2009). La synthèse de telles molécules, dans nos conditions de culture, pourrait peut-être expliquer l'action bactéricide observée *in vitro* sur les bactéries *Pseudomonas syringae* DC3000. De manière complémentaire, *P. tricornerum* est capable d'induire des réactions de défense en produisant des protéines similaires à celles associées à des mécanismes de défense chez les plantes supérieures (β -glucanase) lorsqu'elle est cultivée en présence de bactérie algicide telle que *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (Buhmann et al. 2016). *P. tricornerum* produit également des molécules terpéniques telles que le limonène ou 1.8 cinéole (Prestegard et al. 2015). Chez les végétaux supérieurs, ces métabolites secondaires interviennent dans la protection contre des agents pathogènes. Il serait donc intéressant d'isoler ces molécules et de les tester sur différents pathogènes végétaux, y compris *P. syringae*, afin d'évaluer l'impact de ces molécules sur le fitness des bactéries. La présence de ces molécules ouvre ainsi de nouvelles perspectives de recherche sur la valorisation des molécules bioactives issues de microalgues.

c) Les homogénats de la microalgue *P. tricornerum*

A ce stade de l'étude, il est toutefois impossible de dire si l'effet inducteur de défense observé est lié à la seule présence des bactéries ou à l'association microalgues/bactéries qui pourrait modifier la production en métabolites des algues (Gebser et Pohnert 2013). L'identification des bactéries présentes dans les cultures Pt3 pourrait ainsi constituer une nouvelle piste de recherche pour la découverte de nouvelles molécules naturelles à activités biostimulantes, biocides et protectrices pour les plantes à condition que celles-ci ne présentent pas de risques environnementales et sanitaires.

Les résultats obtenus au cours de projet n'ont malheureusement pas permis de mettre en avant un effet de l'algue seule sur l'induction des défenses des plantes. D'un point de vue industriel, le fait que les homogénats Pt3 fusiformes semblent les plus efficaces dans l'induction

des défenses constitue un avantage non négligeable pour la production à grande échelle. En effet, si l'association microalgue/bactérie est à l'origine de la défense, la production de la souche Pt3 sera moins onéreuse et le rendement sera plus élevé en comparaison à la souche axénique Pt1.8.6. De plus, le morphotype fusiforme est considéré comme étant le plus stable en conditions de laboratoire. De ce fait, il est donc plus facile à maintenir dans des conditions contrôlées. La présence de bactéries peut également favoriser la production de biomolécules spécifiques de l'interaction et jouer un rôle important dans les procédés industriels (Ramanan et al. 2016). Par exemple, il a été démontré que les bactéries *Flavobacterium sp.*, *Terrimonas sp.*, et *Sphingobacterium sp.*, contribuaient à la floculation de la microalgue *C. vulagris* (Lee et al. 2013). Ces arguments sont valables uniquement dans le cas où les bactéries ne présentent aucun risque environnemental et sanitaire.

Récemment une start-up bordelaise nommée ImmunRise a réalisé des essais menés en laboratoire dans le but d'évaluer les effets biocide d'une microalgue prélevée au large des côtes bretonnes. Selon les essais, cette poudre de microalgue possède une efficacité biocide de 100% sur le mildiou, de 50% sur le botrytis et sur quatre des sept champignons responsables de l'esca, une maladie du bois qui fait des ravages dans les vignobles du monde entier (<https://www.immunrisebiocontrol.fr>). A terme l'objectif de cette strat-up est de récupérer de l'eau de mer sur les côtes d'Aquitaine et de faire proliférer la microalgue dans des bassins pour l'épandre sur les vignobles. A l'heure actuelle la composition exacte de l'extrait développé par la société ImmunRise n'a pas été communiqué mais il y a fort à penser que cet extrait est issu d'un mélange de microorganismes comprenant à la fois des microalgues et des bactéries marines (« Le champs des possibles » 2018).

Conclusion & Perspectives

L'objectif de ce projet de thèse était d'explorer le potentiel éliciteur de défense de la microalgue *Phaeodactylum tricornutum* et d'élucider les voies métaboliques mises en œuvre chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Des comparaisons entre des plantes traitées avec un broyat cellulaire de *P. tricornutum* et des plantes traitées avec de l'eau ont permis de mettre en avant des modifications métaboliques par analyses de l'expression de gènes marqueurs soit par observations microscopiques, soit par le suivi de l'expression de gènes de défense (qRT-PCR). Enfin, l'évolution des symptômes sur des plantes infectées par un pathogène bactérien a été suivie en comparant des plantes préalablement traitées avec les homogénats de cellules de microalgues broyées et des plantes non traitées afin d'évaluer l'effet protecteur des homogénats.

Les analyses microscopiques, réalisées grâce à des plantes transformées possédant un gène rapporteur (GUS ; YFP) sous le contrôle de promoteurs spécifiques de gènes de défense, ont d'abord permis de définir les modalités de traitement et d'optimiser la méthode d'élicitation pour cette étude. L'apparition de callose, témoin du renforcement pariétal, a pu être observée par microscopie à fluorescence dans les organes foliaires des plantes traitées par les homogénats de cellules Pt3 broyées. De plus, l'utilisation des plantes transformées avec les constructions rapportrices a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression des gènes *PR-1* et *ACS6* chez les plantes traitées avec les homogénats de cellules Pt3 broyées.

Une étude complémentaire de la régulation de l'expression de gènes impliqués dans différentes voies métaboliques de défense par qRT-PCR a révélé que les homogénats issus de la souche Pt3 permettaient d'augmenter l'expression des gènes *WRKY40*, *PR-1* et *PAD3* chez les plantes traitées. L'induction de ces gènes impliqués dans la régulation des mécanismes de défense suggère que les homogénats sont capables de stimuler l'immunité végétale.

Les analyses de suivi de symptômes ont permis d'apprécier le niveau de protection induit par les homogénats de microalgues broyées sur des plantes infectées par des pathogènes bactériens et fongiques. Les tests de pathogénicité en présence de la bactérie biotrophe *Pseudomonas syringae* DC3000 ont révélé une atténuation des symptômes de l'infection chez les plantes traitées avec l'homogénat Pt3 fusiforme par rapport aux autres traitements. En revanche, les essais pratiqués sur le pois avec le pathogène fongique *Mycosphaerella pinodes*, n'ont pas remporté le même succès.

Dès lors, il peut être envisagé que cette protection passe par l'augmentation de l'expression des gènes *PR-1* et *PAD3* et par dépôt de callose entraînant un renforcement

pariétal. Le niveau de protection peut également être associé à l'effet bactéricide de l'homogénat de cellules broyées observé *in vitro* sur *P. syringae DC3000*.

Une caractérisation plus détaillée des voies métaboliques activées à la suite des traitements pourrait être envisagée en ciblant d'autres gènes impliqués dans la voie de SA tels que *EDS5*, *NPRI* et *PBS3* qui catalysent la conversion de métabolites précurseurs en SA. Par ailleurs, il serait intéressant de tester l'efficacité de protection des homogénats sur des plantes de grande culture comme le blé ou la vigne. Ceci pourrait être effectué en utilisant une puce à faible densité quantitative. Cet outil de diagnostic moléculaire permet d'étudier l'expression de 28 gènes cibles localisés sur différentes voies de défenses dont l'expression renseigne sur l'état de stimulation des défenses des plantes testées (Marolleau et al. 2013). Cette approche permettrait de tester simultanément plusieurs plantes d'intérêt agronomiques telles que la vigne, la tomate, la pomme de terre, le blé.

Afin de répondre à l'hypothèse émise dans la partie discussion, l'effet potentialisateur des homogénats pourrait être évalué en étudiant le niveau d'expression de gènes de défense après infection par un agent pathogène. En effet, le niveau d'expression du gène *PAL* est augmenté chez des plantes après infection par un agent pathogène. En revanche, aucune modification de son expression n'est observée après traitement par des potentialisateurs tels que le BABA ou le BTH. Cette étude pourrait permettre de mieux comprendre le mode d'action de l'homogénat sur les plantes et d'expliquer pourquoi l'expression du gène *PR-1* est induit dans nos conditions à l'inverse des gènes *PAL1* et *ICS1*.

L'étude de l'expression génique et l'étude phytopathologique ont permis de mettre en évidence une différence de niveau d'élicitation par les homogénats de cellules broyées Pt3 et Pt1.8.6. En effet, bien que ces deux souches présentent le même fond génétique, l'homogénat obtenu à partir de la souche Pt1.8.6 ne semble pas augmenter le niveau de résistance des plantes. De manière intéressante, la culture de la souche Pt3 est en réalité une coculture microalgue/bactérie alors que la culture de la souche Pt1.8.6 est axénique. Si l'effet éliciteur mis en évidence dans ce travail est attribué à la présence conjointe de microalgues et bactéries, les interactions entre ces microorganismes méritent d'être étudiées pour expliquer l'effet éliciteur de la souche Pt3. Le brevet déposé en 2018 par Emiliano Guido montrant l'effet bénéfique de l'utilisation de *Phaeodactylum* pour la résistance des plantes mentionne la présence de cyanobactéries dans les cultures de microalgues utilisées pour produire un produit phytosanitaire à effet éliciteur. Afin de compléter ce travail, il pourrait être intéressant de

caractériser les populations bactériennes associées aux cultures Pt3. Les souches bactériennes pourraient être testées de manière indépendante sur les plantes afin de vérifier si les bactéries seules ou bien au contraire si l'association microalgues/bactéries est à l'origine de l'effet éliciteur observé. Ceci est valable à condition d'une part que celles-ci soient cultivables et d'autre part qu'elles ne présentent aucun danger pour les êtres vivants et l'environnement. Les effets éliciteurs pourraient être testés par l'outil de criblage des plantes transformées *PR-1* : GUS qui permettent d'obtenir une réponse rapide, à moindre coût et avec des résultats répétables. Si les résultats obtenus montrent un effet éliciteur plus prononcé de l'homogénat obtenu à partir de la coculture, il faudra prendre en compte les interactions microalgues-bactéries pour la caractérisation de la ou des molécule(s) à l'origine de l'activité élicitrice. Les interactions microalgues-bactéries sont finement régulées par la production de molécules bioactives qui permettent l'établissement d'une communication chimique entre les deux organismes. Ces molécules peuvent alors être secrétées dans le milieu extracellulaire et agir sur l'un ou l'autre des partenaires. Une caractérisation métabolique et protéique pourrait être effectuée dans le but d'isoler et de caractériser le ou les principes actifs à l'origine de l'effet éliciteur.

Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la recherche de molécules élicitrices chez les microalgues. Ces microorganismes présentent un avantage majeur par rapport aux macroalgues. D'un point de vue industriel, la culture des microalgues s'effectue en conditions contrôlées et il est possible d'obtenir de la biomasse assez rapidement en dépit des saisons et des conditions climatiques. Certains co-produits des microalgues sont déjà valorisés dans d'autres domaines d'exploitation. C'est le cas par exemple des pigments, des terpénoïdes, des corps gras dans les secteurs de l'alimentation, du parapharmaceutique et des biocarburants.

Références bibliographiques

A

AbdEl-Baky H.H., El-Baz F.K., ElBaroty G.S., 2010. « Enhancing antioxidant availability in wheat grains from plants grown under seawater stress in response to microalgae extract treatments ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (2): 299-303.

Abeyasinghe JK., Jayami K., Lam KM., et Danny W.-K. Ng. 2019. « Differential regulation and interaction of homoeologous WRKY18 and WRKY40 in Arabidopsis allotetraploids and biotic stress responses ». *The Plant Journal* 97 (2): 352-67.

Acién FG., Fernández JM., Magán JJ., et Molina E. 2012. « Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it ». *Biotechnology Advances* 30 (6): 1344-53.

Adie B, Chico JM, Rubio-Somoza I, Solano R. 2007. « Modulation of Plant Defenses by Ethylene ». *Journal of Plant Growth Regulation* 26 (2): 160-77.

Adrian, M., Lucio, M., Roullier-Gall, C., Héloir, M. C., Trouvelot, S., Daire, X., Kanawati, B., Lemaître-Guillier, C., Poinssot, B., Gougeon, R., and Schmitt-Kopplin, P. 2017. « Metabolic fingerprint of PS3-induced resistance of grapevine leaves against *Plasmopara viticola* revealed differences in elicitor-triggered defenses ». *Frontiers in Plant Science* 08.

Almagro, L., Gómez Ros LV., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., et Pedreño M. A. 2009. « Class III peroxidases in plant defence reactions ». *Journal of Experimental Botany* 60 (2): 377-90.

Almeida RPP et Purcell A.H. 2003. « Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera cicadellidae) ». *Journal of Economic Entomology* 96 (2): 264-71.

Amin SA., Hmelo LR., Van Tol HM., Durham BP., Carlson LT., Heal KR., Morales RL., et al. 2015. « Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria ». *Nature* 522 (7554): 98-101.

Amin SA., Parker MS., et Armbrust E. V. 2012. « Interactions between diatoms and bacteria ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (3): 667-84.

Andersen CL., Jensen JL, et Ørntoft TF. 2004. « Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR Data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets ». *Cancer Research* 64 (15): 5245-50.

Aranega-Bou P, De la O Leyva M, Finiti I, García-Agustín P, et González-Bosch C. 2014. « Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model ». *Frontiers in Plant Science* 5: 488.

Asai T, TenaG, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, et Sheen J. 2002. « MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity ». *Nature* 415 (6875): 977-83.

Attard A, Gourgues M, Callemeyn-Torre N, et Keller H. 2010. « The immediate activation of defense responses in arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection ». *New Phytologist* 187 (2): 449-60.

Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Joubert JM, et Pugin A. 2003. « Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003.

B

Bacete L, Mélida H, Miedes E, et Molina A. 2018. « Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses ». *The Plant Journal* 93 (4): 614-36.

Badri DV., Loyola-Vargas VM, Du J, Stermitz FR, Broeckling C.D, Iglesias-Andreu L, et Vivanco J.M. 2008. « Transcriptome analysis of arabidopsis roots treated with signaling compounds: A focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion ». *New Phytologist* 179 (1): 209-23.

Badri DV, Weir TF, Van der Lelie D, et Vivanco JM. 2009. « Rhizosphere chemical dialogues: Plant–Microbe interactions ». *Current Opinion in Biotechnology* 20 (6): 642-50.

Baetz U, et Martinoia E. 2014. « Root exudates: The hidden part of plant defense ». *Trends in Plant Science* 19 (2): 90-98.

Baïet Hamonic B. 2013. « Étude de la voie de N-glycosylation et caractérisation de la N-acétylglucosaminyltransférase I chez la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* ». Université de Rouen.

Bais HP., Weir TF, Perry LG, Gilroy S, et Vivanco JM. 2006. « The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms ». *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233–266.

Balmer D, et Mauch-Mani B. 2013. « More beneath the surface ? Root versus shoot antifungal plant defenses ». *Frontiers in Plant Science* 4.

Balmer D, Villacres de Papajewski D, Planchamp C, Glauser G, et Mauch-Mani B. 2013. « Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses ». *The Plant Journal* 74 (2): 213-25.

Bari R, et Jones J. 2009. « Role of plant hormones in plant defence responses ». *Plant Molecular Biology* 69 (4): 473-88.

Battacharyya D, Zamani Babgohari M, Rathor P, et Prithiviraj B. 2015. « Seaweed extracts as biostimulants in horticulture ». *Scientia Horticulturae* 196: 39-48.

Bebber DP., Ramotowski M, et Gurr S. 2013. « Crop pests and pathogens move polewards in a warming world ». *Nature Climate Change* 3 (11): 985-88.

Beets CA, Huang JC, Madala NE, et Dubery I. 2012. « Activation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* in response to perception of bacterial lipopolysaccharides: a gene-to-metabolite study ». *Planta* 236 (1): 261-72.

Bélangier RR., Benhamou N, et Menzies JG. 2003. « Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. Sp. *tritici*) ». *Phytopathology* 93 (4): 402-12.

Ben SI, Aghrouss S, Douira A, Aissam S, El Alaoui-Talibi Z, Filali-Maltouf A, et El Modafar C. 2018. « Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against *Verticillium* wilt of olive ». *Journal of Plant Interactions* 13 (1): 248-55.

Benedetti M, Pontiggia D, Raggi S, Cheng Z, Scaloni F, Ferrari S, Ausubel FM, Cervone F, et De Lorenzo G. 2015. « Plant immunity triggered by engineered in vivo release of oligogalacturonides, damage-associated molecular patterns ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (17): 5533-38.

Berens ML., Berry HM, Mine A, Argueso CT, et Tsuda K. 2017. « Evolution of hormone signaling networks in plant defense ». *Annual Review of Phytopathology* 55 (1): 401-25.

Bernardon-méry A, Joubert JM, et Hoareau A. 2013. « La laminarine contre la tavelure du pommier ». *Phytoma* 662 : 32-35

Bezemer TM., Wagenaar R, Van Dam NM, Van Der Putten WH, et Wäckers FL. 2004. « Above-and below-ground terpenoid aldehyde induction in cotton, *Gossypium herbaceum*, following root and leaf injury ». *Journal of chemical ecology* 30 (1): 53–67.

Bigeard J, Colcombet J, et Hirt H. 2015. « Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI) ». *Molecular Plant* 8 (4): 521-39.

Bittel P, et Robatzek S. 2007. « Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity ». *Current Opinion in Plant Biology* 10 (4): 335-41.

Blumwald E, Aharon GS, et Lam BCH. 1998. « Early signal transduction pathways in plant–pathogen interactions ». *Trends in Plant Science* 3 (9): 342–346.

Boller T et Felix G. 2009. « A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors ». *Annual Review of Plant Biology* 60 (1): 379-406.

Borowitzka MA et Volcani BE. 1978. « The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum* : ultrastructure of its morphotypes ». *Journal of Phycology* 14 (1): 10-21.

Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, et al. 2008. « The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes ». *Nature* 456 (7219): 239-44.

Brent KJ et Hollomon DW. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens : How can it be managed ? *FRAC Monograph*, no. 1.

Broekaert WF., Delauré SL, De Bolle MFC, et Cammue BPA. 2006. « The role of ethylene in host-pathogen interactions ». *Annual Review of Phytopathology* 44 (1): 393-416.

Buhmann MT, Schulze B, Förderer A, Schleheck D, et Kroth PG. 2016. « Bacteria may induce the secretion of mucin-like proteins by the diatom *Phaeodactylum tricornutum* » *Journal of Phycology* 52 (3): 463-74.

Burketova L, Trda L, Ott PG, et Valentova O. 2015. « Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens ». *Biotechnology Advances* 33 (6): 994-1004.

C

Caballero MA., Jallet D, Shi L, Rithner C, Zhang Y, et Peers G. 2016. « Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* ». *Algal Research* 20: 180–188.

Cai MZ, Wang FM, Li RF, Zhang SN, Wang N, et Xu GD. 2011. « Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 105 (7): 966-71.

Cai M, Wang N, Xing C, Wang F, Wu K, et Du X. 2013. « Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max L* ». *Environmental Science and Pollution Research* 20 (12): 8924-33.

Camejo D, Guzmán-Cedeño A, et Moreno A. 2016. « Reactive oxygen species, essential molecules during plant–pathogen interactions ». *Plant Physiology and Biochemistry* 103 : 10-23.

Cameron RK., Paiva NL, Lamb CJ, et. Dixon RA. 1999. « Accumulation of salicylic acid and *PR-I* gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response

induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Arabidopsis ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55 (2): 121-30.

Canarini A, Kaiser C, Merchant A, Richter A, et Wanek W. 2019. « Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli ». *Frontiers in Plant Science* 10: 157.

Canet JV., Dobon A, Ibanez F, Perales L, et Tornero P. 2010. « Resistance and biomass in arabidopsis: a new model for salicylic acid perception ». *Plant Biotechnology Journal* 8 (2): 126-41.

Cannesan MA., Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye ML, Driouich A, et Vicre-Gibouin M. 2012. « Effect of arabinogalactan proteins from the root caps of pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* zoospore chemotaxis and germination ». *Plant Physiology* 159 (4): 1658-70.

Cannesan MA., Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, et Vicre-Gibouin M. 2011a. « Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches* ». *Annals of Botany* 108 (3): 459-69.

Cargnello M et Roux PP. 2011. « Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (1): 50-83.

Carpita N, Ralph J, et McCann M. 2015. « The cell wall ». In *Biochemistry & molecular biology of plants*, Second edition. John Wiley & Sons Inc.

Castilleux R, Plancot B, Gügi B, Attard A, Loutelier-Bourhis C, Lefranc B, Nguema-Ona E, et al. 2019. « Extensin arabinosylation is involved in root response to elicitors and limits oomycete colonization ». *Annals of Botany*,

Castilleux R, Plancot B, Ropitiaux M, Carreras A, Leprince J, Boulogne I, Follet-Gueye ML, Popper ZA, Driouich A, et Vicré M. 2018. « Cell wall extensins in root-microbe interactions and root secretions ». *Journal of Experimental Botany* 69 (18): 4235-47.

Castro MJL, Ojeda C, et Fernández Cirelli A. 2014. « Advances in surfactants for agrochemicals ». *Environmental Chemistry Letters* 12 (1): 85-95.

Catanzariti AM, Dodds PN, et Ellis JG. 2007. « Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens: avirulence proteins from haustoria-forming pathogens ». *FEMS Microbiology Letters* 269 (2): 181-88.

Cerutti A, Jauneau A, Auriac MC, Lauber E, Martinez Y, Chiarenza S, Leonhardt N, Berthomé R et Noël LD. 2017. « Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv *campestris* ». *Plant Physiology* 174 (2): 700-716.

Chandra S, Chakraborty N, Dasgupta A, Sarkar J, Panda K, et Acharya K. 2015. « Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants ». *Scientific Reports* 5 (1).

Chatterjee A, Singh, S, Agrawal C., Yadav S., Rai R., et Rai L.C.. 2017. « Role of algae as a biofertilizer ». In *Algal Green Chemistry*, 189-200. Elsevier.

Chiaiese P, Corrado G, Colla G, Kyriacou MC et Roupael Y. 2018. « Renewable sources of plant biostimulation: microalgae as a sustainable means to improve crop performance ». *Frontiers in Plant Science* 9: 1782.

Chinchilla D. 2006. « The arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception ». *The Plant Cell Online* 18 (2): 465-76.

Chisholm ST., Coaker G, Day B, et Staskawicz BJ. 2006. « Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response ». *Cell* 124 (4): 803-14.

Cho DH, Ramanan R, Heo J, Lee J, Kim BH, Oh HM, et Kim HS. 2015. « Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community ». *Bioresource Technology* 175 : 578-85.

Choi HW et Klessig DF. 2016. « DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity ». *BMC Plant Biology* 16 (1).

Chojnacka K et Kim SK. 2015. « Introduction of marine algae extracts ». In *Marine Algae Extracts*, 1-14. Book Chapter Wiley Online Library

Choudhary DK., Prakash A et Johri BN. 2007. « Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action ». *Indian Journal of Microbiology* 47 (4): 289-97.

Chuberre C, Plancot B, Driouich A, Moore JP, Bardor M, Gügi B et Vicié M. 2018. Plant immunity is compartmentalized and specialized in roots. *Frontiers in Plant Science* 9.

Clarke CR, Chinchilla D, Hind SR, Taguchi F, Miki R, Ichinose Y, Martin GB, Leman S, Felix G, et Vinatzer BA. 2013. « Allelic variation in two Distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility ». *New Phytologist* 200 (3): 847-60.

Claverie J, Teyssier L, Brulé D, Héloir MC, Connat JL, Lamotte O et Poinssot B. 2016. « Lutter contre les infections bactériennes : le système immunitaire des plantes est aussi très efficace ! » *médecine/sciences* 32 (4): 335-39.

Clos J. 2012. « les systèmes de défense de la cellule végétale : de nombreuses analogies avec les animaux ». In *L'immunité chez les animaux et les végétaux : aspects fondamentaux et physiopathologiques*, 338-52. Médecine sciences publications.

Cluzet S, Torregrosa C, Jacquet C, Lafitte C, Fournier J, Mercier L, Salamagne S, Briand X, Esquerre-Tugaye MT, et Dumas B. 2004. « Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* Spp ». *Plant, Cell and Environment* 27 (7): 917-28.

Conrath , Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman MA et al. 2006. « Priming: getting ready for battle ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (10): 1062-71.

Cook J, Zhang J, Norrie J, Blal B, et Cheng Z. 2018. « Seaweed extract (Stella Maris®) activates innate immune responses in *Arabidopsis thaliana* and protects host against bacterial pathogens ». *Marine Drugs* 16 (7): 221.

Corbaz R. 1990. *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*. PPUR presses polytechniques.

Cosgrove DJ. 2005. « Growth of the plant cell wall ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (11): 850-61.

Couto D et Zipfel C. 2016. « Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants ». *Nature Reviews Immunology* 16 (9): 537-52.

Craigie JS. 2011. « Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture ». *Journal of Applied Phycology* 23 (3): 371-93.

Curlango-Rivera G, Duclos DV, Eboho JJ et Hawes. 2010 MC. « Transient exposure of root tips to primary and secondary metabolites: impact on root growth and production of border cells ». *Plant and Soil* 332 (1-2): 267-75.

Currie HA et Perry CC. 2007. « Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies ». *Annals of Botany* 100 (7): 1383-89.

D

Darvill AG et Albersheim P. 1984. « Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants ». *Annual Review of Plant Physiology* 35 (1): 243–275.

Davletova S, Schlauch K, Coutu J et Mittler R. 2005. « The zinc-finger protein zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in arabidopsis ». *Plant Physiology* 139 (2): 847-56.

De Coninck B, Timmermans P, Vos C, Cammue BPA et Kazan K. 2015. « What lies beneath: belowground defense strategies in plants ». *Trends in Plant Science* 20 (2): 91-101.

De Lorenzo G, Ferrari S, Cervone F et Okun E. 2018. « Extracellular DAMPs in plants and mammals: immunity, tissue damage and repair ». *Trends in Immunology* 39(11) : 937-950.

De Lorenzo G, Ferrari S, Giovannoni M, Mattei B, et Cervone F. 2018. « Cell wall traits that influence plant development, immunity and bioconversion ». *The Plant Journal* 97(1):134-147.

De Martino A, Bartual A, Willis A, Meichenin A, Villazán B, Maheswari U et Bowler C. 2011. « Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* ». *Protist* 162 (3): 462-81.

De Martino A, Meichenin A, Shi J, Pan K et Bowler C. 2007. « Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) Accessions ». *Journal of Phycology* 43 (5): 992-1009.

Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Muck A, Mithöfer A, et Shetty SH. 2010. « Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence ». *Journal of Phytopathology* 158:585–593.

Dehors J, Mareck A, Kiefer-Meyer MC, Menu-Bouaouiche L, Lehner A, et Mollet JC. 2019. « Evolution of cell wall polymers in tip-growing land plant gametophytes: composition, distribution, functional aspects and their remodeling ». *Frontiers in Plant Science* 10 : 441.

Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, et Klessig DF. 2011. « Salicylic acid biosynthesis and metabolism ». *The Arabidopsis Book* 9: e0156.

Denby KJ., Kumar P, et Kliebenstein DJ. 2004. « Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana* ». *The Plant Journal* 38 (3): 473-86.

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, et Dewdney J. 2008. « Activation of defense response pathways by OGs and flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings ». *Molecular Plant* 1 (3): 423-45.

Desbois AP., Lebl T, Yan L, et Smith VJ. 2008. « Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (4): 755-64.

Desbois AP., Mearns-Spragg A, et Smith. 2009 VJ. « A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ». *Marine Biotechnology* 11 (1): 45-52.

Desbois AP., et Smith VJ. 2015. « Disk diffusion assay to assess the antimicrobial activity of marine algal extracts ». *Natural products from marine algae* 1308:403-10.

Desbois AP., Walton M, et Smith VJ. 2010. « Differential antibacterial activities of fusiform and oval morphotypes of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) ». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90 (04): 769-74.

Dixon RA., Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS, et Wang L. 2002. « The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective ». *Molecular Plant Pathology* 3 (5): 371–390.

Dowd C, Wilson IW, et McFadden H. 2004. « Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* ». *Molecular plant-microbe interactions* 17 (6): 654–667.

Driouich A, Cannesan MA, Dardelle F, Durand C, Plancot B, Bernard S, Follet-Gueye ML, et Vicro-Gibouin M. 2012. « unity is strength: the power of border cells and border-like cells in relation with plant defense ». In *Secretions and Exudates in Biological Systems*, 12:91-107.

Driouich A, Durand C, Cannesan MA, Percoco G, et Vicro-Gibouin M. 2010. « Border cells versus border-like cells: are they alike ? » *Journal of Experimental Botany* 61 (14): 3827-31.

Driouich A, Durand C, et Vicro M. 2007. « Formation and separation of root border cells ». *Trends in Plant Science* 12 (1): 14-19.

Driouich A, Follet-Gueye ML, Vicro-Gibouin M, et Hawes M. 2013. « Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense ». *Current Opinion in Plant Biology* 16 (4): 489-95.

Driouich A, Smith C, Ropitiaux M, Chambard M, Boulogne I, Bernard S, Follet-Gueye ML, Vicro M et Moore JP. 2019. « Root extracellular traps versus neutrophil extracellular traps in host defence, a case of functional convergence? » *Biological Reviews*, 94(5):1685-1700.

Dufour MC., Lambert C, Bouscaut J, Mérillon JM, et Corio-Costet MF. 2013. « benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*: elicitation and grapevine responses to mildews ». *Plant Pathology* 62 (2): 370-82.

Dumont M, Lehner A, Vauzeilles B, Malassis J, Marchant A, Smyth K, Linclau B, et al. 2016. « Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid ». *The Plant Journal* 85 (3): 437-47.

Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R, Agler M, Kemen E, Schulze-Lefert P, et Hacquard S. 2018. « Microbial interkingdom interactions in roots promote arabidopsis survival ». *Cell* 175 (4): 973-983.e14.

Durand C., Vire-Gibouin M, Follet-Gueye ML, Duponchel L, Moreau M, Lerouge P et Driouich A. 2009. « The organization pattern of root border-like cells of arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan ». *Plant physiology* 150 (3): 1411-21.

Durkin CA., Mock T, et Armbrust EV. 2009. « Chitin in diatoms and its association with the cell wall ». *Eukaryotic Cell* 8 (7): 1038-50.

Durrant WE., et Dong X. 2004. « Systemic acquired resistance ». *Annual Review of Phytopathology* 42 (1): 185-209.

E

Edwards K et Thompson C. 1991. « A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis ». *Nucleic Acids Research* 19 (6): 1349.

El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, et Daayf F. 2010. « Chitosan in plant protection ». *Marine Drugs* 8 (4): 968-87.

El Modafar C, Elgadda M, El Boutachfaiti R, Abouraicha E, Zehhar N, Petit E, El Alaoui-Talibi Z, Courtois B et Courtois J. 2012. « Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae ». *Scientia Horticulturae* 138: 55-63.

Elarroussi H, Elmernissi N, Benhima R, El Kadmiri IM, Bendaou N et Smouni A. 2016. « Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant » 7 (4): 55 eISSN: 2229–690

Ellinger D., et Voigt CA. 2014. « Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade ». *Annals of Botany* 114 (6): 1349-58.

Erb M, Lenk C, Degenhardt J et Turlings TCJ. 2009. « The underestimated role of roots in defense against leaf attackers ». *Trends in plant science* 14 (12): 653–659.

Esquerré-Tugayé MT, Boudart G et Dumas B. 2000. « Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens ». *Plant Physiology and Biochemistry* 38 (1-2): 157-63.

F

Farid R, Mutale-Joan C, Redouane B, Mernissi Najib El, Abderahime A, Laila S et Arroussi Hicham El. 2018. « Effect of microalgae polysaccharides on biochemical and metabolomics pathways related to plant defense in *Solanum lycopersicum* ». *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(1):225-240

Fauteux F, Rémus-Borel W, Menzies JG, et Bélanger R. 2005. « Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi ». *FEMS Microbiology Letters* 249 (1): 1-6

Felix G et Boller T. 2003. « Molecular sensing of bacteria in plants: the highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 6201-8.

Felix JDD, Volko S et Boller T. 1999. « Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin: plants perceive a conserved domain of bacterial flagellin ». *The Plant Journal* 18 (3): 265-76.

Ferrari S. 2013. « Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development ». *Frontiers in Plant Science* 4.

Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G et Ausubel FM. 2003. « Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4: local arabidopsis response to botrytis ». *The Plant Journal* 35 (2): 193-205.

Findla, JA et Patil AD. 1984. « Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei* ». *Journal of Natural Products* 47 (5): 815-18.

Ford CW et Percival E. 1965. « Carbohydrates of *Phaeodactylum tricornutum*. Part II. A sulphated glucuronomannan ». *J. Chem. Soc.*, 7042–7046.

Francis MI., Redondo A, Burns JK, et Graham JH. 2009. « Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker ». *European Journal of Plant Pathology* 124 (2): 283-92.

Freitas MB, Ferreira LG, Hawerth C, Duarte ME, Nosedá MD et Stadnik MJ. 2015. « Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree ». *Carbohydrate Polymers* 133 : 384-90.

Freitas MB et Stadnik MJ. 2012. « Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum* ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78: 8-13.

Frew A, Weston LA, Reynolds OL et Gurr GM. 2018. « The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approach ». *Annals of Botany* 121 (7): 1265-73.

G

Gao M, Wang X, Wang D, Xu F, Ding X, Zhang Z, Bi D, et al. 2009. « Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in arabidopsis ». *Cell Host & Microbe* 6 (1): 34-44.

Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, et Pugin A. 2006. « Early signaling events induced by elicitors of plant defenses ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 19 (7): 711-24.

Gaspar YM. 2004. « Characterization of the arabidopsis lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (Rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation ». *Plant physiology* 135 (4): 2162-71.

Gauthier A, Trouvelot S, Kelloniemi J, Frettinger P, Wendehenne D, Daire X, Joubert JM, et al. 2014. « The sulfated laminarin triggers a stress transcriptome before priming the SA- and ROS-dependent defenses during grapevine's induced resistance against *Plasmopara viticola* ». *PLoS ONE* 9 (2): e88145.

Gauvrit C. 1996. *Efficacité et selectivité des herbicides*. Paris: INRA.

Gayathri M, Shunmugam S, Thajuddin N et Muralitharan G. 2017. « Phytohormones and free volatile fatty acids from cyanobacterial biomass wet extract (BWE) Elicit Plant Growth Promotion ». *Algal Research* 26 : 56-64.

Gebser B et Pohnert G. 2013. « Synchronized regulation of different zwitterionic metabolites in the osmoadaptation of phytoplankton ». *Marine Drugs* 11 (6): 2168-82.

Ghanmi D, McNally DJ, Benhamou N, Menzies JG et Bélanger RR. 2004. « Powdery mildew of *Arabidopsis thaliana*: a pathosystem for exploring the role of silicon in plant-microbe interactions ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64 (4): 189-99.

Ghannam A, Abbas A, Alek H, Al-Waari Z et Al-Ktaifani M. 2013. « Enhancement of local plant immunity against *Tobacco Mosaic Virus* infection after treatment with sulphated-carrageenan from red alga (*Hypnea musciformis*) ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 84: 19-27.

Gigolashvili T, Berger B, Mock HP, Müller C, Weisshaar B et Flügge UI. 2007. « The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: HIG1 and glucosinolate biosynthesis ». *The Plant Journal* 50 (5): 886-901.

Glawischnig E. 2007. « Camalexin ». *Phytochemistry* 68 (4): 401-6.

Gniwotta F. 2005. « What do microbes encounter at the plant surface? chemical composition of pea leaf cuticular waxes ». *Plant physiology* 139 (1): 519-30.

Goldberg NP., Hawes MC et Stanghellini ME 1989. « Specific attraction to and infection of cotton root cap cells by zoospores of *Pythium dissotocum* ». *Canadian Journal of Botany* 67 (6): 1760–1767.

Gomezgomez, L. 2004. « Plant perception systems for pathogen recognition and defence ». *Molecular Immunology* 41 (11): 1055-62.

Gomez-Gomez L, Felix G et Boller T. 1999. « A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*: sensitivity of *A. thaliana* to bacterial flagellin ». *The Plant Journal* 18 (3): 277-84.

Gotté M, Bénard M, Kiefer-Meyer MC, Jaber R, Moore JP, Vicré-Gibouin M et Driouich A. 2016. « Endoplasmic reticulum body-related gene expression in different root zones of arabidopsis isolated by laser-assisted microdissection ». *The Plant Genome* 9 (2).

Greeff C, Roux M, Mundy J et Petersen M. 2012. « Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity ». *Frontiers in Plant Science* 3.

Grzesik M., Romanowska-Duda Z et Kalaji HM. 2017. « Effectiveness of cyanobacteria and green algae in enhancing the photosynthetic performance and growth of willow (*Salix viminalis* L.) plants under limited synthetic fertilizers application ». *Photosynthetica* 55 (3): 510-21.

Gudesblat GE., Torres PS, et Vojnov AA. 2009. « Stomata and pathogens: warfare at the gates ». *Plant Signaling & Behavior* 4 (12): 1114-16.

Guerreiro A, Figueiredo J, Silva MS et Figueiredo A. 2016. « Linking jasmonic acid to grapevine resistance against the biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* ». *Frontiers in Plant Science* 7.

Gügi B, Costaouec T, Burel C, Lerouge P, Helbert W et Bardor M. 2015. « Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms ». *Marine Drugs* 13 (9): 5993-6018.

Gunawardena U et Hawes MC. 2002. « Tissue specific localization of root infection by fungal pathogens: role of root border cells ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (11): 1128–1136.

Guntzer F, Keller C et Meunier JD. 2012. « Benefits of plant silicon for crops: a review ». *Agronomy for Sustainable Development* 32 (1): 201-13.

Guo H et Ge F. 2016. « Root nematode infection enhances leaf defense against whitefly in tomato ». *Arthropod-Plant Interactions*, novembre.

Gupta V, Prasanna R, Cameotra SS, Dureja P, Singh RN et Sharma J. 2013. « Enhancing the production of an antifungal compound from *Anabaena laxa* through modulation of environmental conditions and its characterization ». *Process Biochemistry* 48 (5-6): 768-74.

Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F et al. 2007. « Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis* ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (44): 32338-48.

Guzmán-Murillo MA., Ascencio F et Larrinaga-Mayoral JA. 2013. « Germination and ROS detoxification in bell pepper (*Capsicum annuum l.*) under NaCl stress and treatment with microalgae extracts ». *Protoplasma* 250 (1): 33-42.

H

Hahn A, Kilian J, Mohrholtz A, Ladwig F, Peschke F, Dautel R, Harter K, Berendzen K, et Wanke D. 2013. « Plant core environmental stress response genes are systemically coordinated during abiotic stresses ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4): 7617-41.

Hamel LP et Beaudoin N. 2010. « chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant–microbe interactions ». *Planta* 232 (4): 787-806.

Hammond-Kosack KE, et Jones JDG. 2015. « Responses to plant pathogens ». in *biochemistry & molecular biology of plants*, Second edition. John Wiley & Sons Inc.

Hawes GB, Cassab G et Ponce G. 2002. « Root caps and rhizosphere ». *Journal of Plant Growth Regulation* 21 (4): 352-67.

Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S et Zhao X. 2000. « The role of root border cells in plant defense ». *Trends in Plant Science* 5 (3): 128-33.

Hawes MC, Allen C, Turgeon BG, Curlango-Rivera G, Tran TM, Huskey DA et Xiong Z. 2016. « Root border cells and their role in plant defense ». *Annual Review of Phytopathology* 54 (1): 143-61.

Hawes MC, Mclain J, Ramirez-Andreotta M, Curlango-Rivera G, Flores-Lara Y et Brigham L. 2016. « Extracellular trapping of soil contaminants by root border cells: new insights into plant defense ». *Agronomy* 6 (1): 5.

Hawes MC et Pueppke SG. 1987. « Correlation between binding of *Agrobacterium tumefaciens* by root cap cells and susceptibility of plants to crown gall ». *Plant cell reports* 6 (4): 287–290.

He L, Han X et Yu Z. 2014. « A rare *Phaeodactylum tricornutum* cruciform morphotype: culture conditions, transformation and unique fatty acid characteristics ». *PLoS ONE* 9 (4): e93922.

He P, Shan L et Sheen J. 2007. « Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant microbe interactions ». *Cellular Microbiology* 9 (6): 1385-96.

Henry G, Thonart P et Ongena M. 2012. « PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors ». *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16 (2): 257-68.

Hernández-Becerril DU, Moreno-Gutiérrez SP et Barón-Campis SA. 2009. « Morphological Variability of the planktonic diatom *Thalassiosira delicatula* Ostenfeld emend. Hasle from the Mexican Pacific, in Culture Conditions ». *ACTA BOT. CROAT.*, 11.

Hernández-Carlos B et Gamboa-Angulo MM. 2011. « Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides ». *Phytochemistry Reviews* 10 (2): 261-86.

Hind SR., Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O’Doherty IM, Baccile JA et al. 2016. « Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds FlgII-28 and activates the plant immune system ». *Nature Plants* 2 (9).

Hmouni ALO, Badoc A et Douira A. 2003. « Étude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles, dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du Gharb (Maroc) », *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142: 79-100.

Hohmann U, Lau K et Hothorn M. 2017. « The structural basis of ligand perception and signal activation by receptor kinases ». *Annual Review of Plant Biology* 68 (1): 109-37.

Hopkins DL. 1989. « *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants ». *Annual Review of Phytopathology* 27 (1): 271-90.

Hu L, Robert CAM, Cadot S, Zhang X, Ye M, Li B, Manzo D et al. 2018. « Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota ». *Nature Communications* 9 (1): 2738.

Huchelmann A, Boutry M et Hachez C. 2017. « Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest ». *Plant Physiology* 175 (1): 6-22.

Hückelhoven R. 2007. « Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility ». *Annual Review of Phytopathology* 45 (1): 101-27.

Hulten MV, Pelser M, Van Loon LC, Pieterse CMJ et Ton J. 2006. « Costs and benefits of priming for defense in arabidopsis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (14): 5602-7.

I

Iven T, König S, Singh S, Braus-Stromeier SA, Bischoff M, Tietze LF, Braus GH, Lipka V, Feussner I et Dröge-Laser W. 2012. « Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in arabidopsis roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum* ». *Molecular Plant* 5 (6): 1389-1402.

J

Jaber R 2016. « Défenses naturelles des plantes : Identification de nouveaux stimulateurs de défenses des plantes (SDP) capables d'améliorer la résistance du lin contre le champignon *Fusarium oxysporum* ». Thèse Université de Rouen Normandie.

Jakab G, Cottier V, Toquin V, Rigoli G, Zimmerli L, Métraux JP et Mauch-Mani B. 2001. « β -aminobutyric acid-induced resistance in plants ». *European Journal of plant pathology* 107 (1): 29–37.

Jarvis MC. 2018. « structure of native cellulose microfibrils, the starting point for nanocellulose manufacture ». *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 376 (2112): 20170045.

Jaulneau V, Lafitte C, Corio-Costet MF, Stadnik MJ, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé MT et Dumas B. 2011. « An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens ». *European Journal of Plant Pathology* 131 (3): 393-401.

Jaulneau V, Lafitte C, Jacquet C, Fournier S, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé, MT et Dumas U. 2010. « Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1-11.

Jefferson RA., Kavanagh TA et Bevan MW. 1987. « GUS Fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants ». *The EMBO Journal* 6 (13): 3901-7.

Jenks MA et Ashworth EN. 1999. « Plant epicuticular waxes: function, production, and genetics ». In *Horticultural Reviews*, 23:1-68.

Jiang CH, Huang ZY, Xie P, Gu C, Li K, Wang DC, Yu YY, et al. 2016. « Transcription factors WRKY70 and WRKY11 served as regulators in rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156-induced systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in Arabidopsis ». *Journal of Experimental Botany* 67 (1): 157-74.

Joglekar S, Suliman M, Bartsch M, Halder V, Maintz J, Bautor J, Zeier J, Parker JE et Kombrink E. 2018. « Chemical activation of EDS1/PAD4 signaling leading to pathogen resistance in arabidopsis ». *Plant and Cell Physiology* 59 (8): 1592-1607.

Jones JD et Dangl JL. 2006. « The plant immune system ». *Nature* 444 (7117): 323-29.

Jonge J, Hofius D et Hennig L. 2017. « Salicylic acid Interferes with GFP fluorescence in vivo ». *Journal of Experimental Botany* 68 (7): 1689-96.

Jongebloed U, Szederkényi J, Hartig K, Schobert C et Komor E. 2004. « Sequence of morphological and physiological events during natural ageing and senescence of a castor bean leaf: sieve tube occlusion and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation ». *Physiologia Plantarum* 120 (2): 338–346.

K

Kaczmarek I, Ehrman JM, Bates SS, Green DH, Léger C, et Harris J. 2005. « Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseriata* (bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater ». *Harmful Algae* 4 (4): 725-41.

Kadota Y, Shirasu K et Zipfel C. 2015. « Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity ». *Plant and Cell Physiology* 56 (8): 1472-80.

Kan van JA. 2006. « Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen ». *Trends in Plant Science* 11 (5): 247-53.

Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Rehill BJ, Sardanelli S et Denno RF. 2008. « Physiological integration of roots and shoots in plant defense strategies links above- and belowground herbivory ». *Ecology Letters* 11 (8): 841-51.

Khan Z , Shin S, Bae S, Yeon I et Seo Y. 2005. « Management of on tomato by root-dip treatment in culture filtrate of the blue-green alga ». *Bioresource Technology* 96 (12): 1338-41.

Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, Yvin JC, Kloareg B et Fritig B. 2003. « Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against *Tobacco mosaic virus* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (2): 115-22.

Klarzynski O et Fritig B. 2001. « Stimulation des défenses naturelles des plantes ». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324 (10): 953-63.

Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, et Fritig B. 2000. « Linear Beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco ». *Plant Physiology* 124 (3): 1027-38.

Kliebenstein, Daniel J., et Heather C. Rowe. 2008. « Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction ». *Plant Science*, n° 174: 551-56. [https://doi.org/ 10.1016/j.plantsci.2008.03.005](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.03.005)

Koen E, Lamotte O, Besson-Bard A, Bourque S, Nicolas-Francès V, Jeandroz S et Wendehenne D. 2013. « Le monoxyde d'azote: Un acteur de l'immunité chez les plantes ». *médecine/sciences* 29 (3): 309-16.

Kohler A, Schwindling S et Conrath U. 2002. « Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIMI* gene in Arabidopsis ». *Plant Physiology* 128 (3): 1046-56.

Kok D, Bal E, Celik S, Ozer C et Karauz A. 2010. « The influences of different seaweed doses on table quality characteristics of cv.*Trakya ilkeren* (*Vitis vinifera* L.) » 7.

Kumar M et Turner S. 2015. « Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms ». *Phytochemistry* 112: 91-99.

Kunkel BN et Brooks DM. 2002. « Cross talk between signaling pathways in pathogen defense ». *Current Opinion in Plant Biology* 5 (4): 325-31.

Kunze G. 2004. « The N terminus of bacterial elongation factor TU elicits innate immunity in Arabidopsis plants ». *The plant cell online* 16 (12): 3496-3507.

L

Labeeuw L, Bramucci AR, et Case RJ. 2017. « Bioactive small molecules mediate microalgal-bacterial interactions ». In *Systems Biology of Marine Ecosystems*, 279-300.

Laberche JC. 2010. « La plante dans son milieu environnant ». In *Biologie végétale*, 3e éd., 228-31. Paris: Dunod.

Lahaye M et Robic A. 2007. « Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds ». *Biomacromolecules* 8 (6): 1765-74.

Lamotte O. 2004. « analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein ». *Plant physiology* 135 (1): 516-29.

- Lapshina LA., Reunov AV, Nagorskaya V.P, Zvyagintseva TN et Shevchenko NM. 2006. « Inhibitory effect of fucoidan from brown alga *fucus evanescens* on the spread of infection induced by *Tobacco mosaic virus* in tobacco leaves of two cultivars ». *Russian Journal of Plant Physiology* 53 (2): 246-51.
- Laurie-Berry N, Joardar V, Street IH et Kunkel BN. 2006. « The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (7): 789-800.
- Lawton KA., Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T et Ryals J. 1996. « Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 10 (1): 71-82.
- Le Costaouëc T, Unamunzaga C, Mantecon L et Helbert W. 2017. « New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* ». *Algal Research* 26: 172-79.
- Lecomte J. 2009. « Les cires végétales : sources et applications ». *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 16 (4-5-6): 262-66.
- Lee J, Cho DH, Ramanan R, Kim BH, Oh HM et Kim HS. 2013. « Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris* ». *Bioresource Technology* 131: 195-201.
- Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray A, Meredith S, Lakay F et al. 2010. « The spread of *Tomato yellow leaf curl virus* from the middle east to the world ». *PLoS Pathogens* 6 (10): e1001164.
- Leitner M, Kaiser R, Rasmussen MO, Driguez H, Boland W et Mithöfer A. 2008. « Microbial oligosaccharides differentially induce volatiles and signalling components in *Medicago truncatula* ». *Phytochemistry* 69 (10): 2029-40.
- Lepoivre . 2003. *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Gembloux Bruxelles: Presses agronomiques de Gembloux ; De Boeck.
- Leroux P, Albertini C, Gautier A, Gredt M et Walker AS. 2007. « Mutations in The CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola* ». *Pest Management Science* 63 (7): 688-98.
- Levin DA. 1973. « The Role of Trichomes in Plant Defense ». *The Quarterly Review of Biology* 48 (1, Part 1): 3-15.

Lewin JC., Lewin RA et Philpott DE. 1958. « Observations on *Phaeodactylum tricornutum* ». *Journal of general microbiology* 18 (2): 418–426.

Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G et al. 2014. « The FLS2-Associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RBOHD to control plant immunity ». *Cell Host & Microbe* 15 (3): 329-38.

Li Y, Nie Y, Zhang Z, Ye Z, Zou X, Zhang L et Wang Z. 2014. « Comparative proteomic analysis of methyl jasmonate-induced defense responses in different rice cultivars ». *Proteomics* 14 (9): 1088-1101.

Liljeroth E, Bengtsson T, Wiik L et Andreasson E. 2010. « Induced resistance in potato to *Phytophthora infestans* effects of baba in greenhouse and field tests with different potato varieties ». *European Journal of Plant Pathology* 127 (2): 171-83.

Lin W, Li B, Lu D, Chen S, Zhu N, He P et Shan L. 2014. « Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates *arabidopsis* innate immunity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (9): 3632-37.

Lindow SE et Brandl MT. 2003. « Microbiology of the phyllosphere ». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1875-83.

Liu S, Che Z et Chen G. 2016. « Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in henan province, china ». *Crop Protection* 84 : 56-61.

Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, et Schenk PM. 2017. « Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria ». *Frontiers in Microbiology* 8.

Liu J, Lewitus A, Brown P et Wilde SB. 2008. « Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton ». *Harmful Algae* 7 (1): 1-10.

Liu Y. 2004. « Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* ». *The plant cell online* 16 (12): 3386-99.

Loon van LC, Rep M et Pieterse CMJ. 2006. « Significance of inducible defense-related proteins in infected plants ». *Annual Review of Phytopathology* 44 (1): 135-62.

Lyons R, Stiller J, Powell J, Rusu A, Manners JM et Kazan K. 2015. « *Fusarium oxysporum* triggers tissue-specific transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana* ». *Plos One* 10 (4): e0121902.

M

Machado LP, Matsumoto ST, Jamal CM, Da Silva M B, Centeno Dda C, Colepicolo Neto P, De Carvalho LR et Yokoya NS. 2014. « Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi: seaweed extracts with inhibitory activity against anthracnose fungi ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (9): 1739-44.

Macho AP et Zipfel C. 2014. « Plant PRRs and the activation of innate immune signaling ». *Molecular Cell* 54 (2): 263-72.

Macedo MF., Miller AZ., Dionisio A et Saiz-Jimenez C. 2009. « Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the mediterranean basin: an overview ». *Microbiology* 155 (11): 3476-90.

Malerba M et Cerana R. 2016. « chitosan effects on plant systems ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (7): 996.

Mansilla AY., Albertengo L., Rodríguez MS, Debbaudt A, Zúñiga A, et Casalongué CA. 2013. « Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (15): 6957-66.

Marcel S, Sawers R, Oakeley E, Angliker H et Paszkowski U. 2010. « Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* ». *The Plant Cell* 22 (9): 3177-87.

Marolleau B, Staube J, Barrière Q, Indiana A, Gravouil C, Chartier R Heintz, C, et al. 2013. « La qPFD, un outil de criblage des SDP alias stimulateurs de défense des plantes » *Phytoma*, 5(664) : 42-45.

Matsushima R. 2002. « An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in arabidopsis ». *Plant physiology* 130 (4): 1807-14.

Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E et Flors V. 2017. « Defense priming: an adaptive part of induced resistance ». *Annual Review of Plant Biology* 68 (1): 485-512.

Mburu K., Oduor R., Mgtutu A et Tripathi L. 2016. « Silicon application enhances resistance to xanthomonas wilt disease in banana ». *Plant Pathology* 65 (5): 807-18.

McCann HC., Nahal H, Thakur S, et Guttman DS. 2012. « Identification of innate immunity elicitors using molecular signatures of natural selection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (11): 4215-20.

McGrann GRD, Yoxall T, Paterson LJ, Taylor JMG, Birmipilis IG, Walters DR et Havis ND. 2017. « Control of light leaf spot and clubroot in brassica crops using defence elicitors ». *European Journal of Plant Pathology* 148 (2): 447-61.

Meier IC., Finzi AC et Phillips RP. 2017. « Root exudates increase n availability by stimulating microbial turnover of fast-cycling n pools ». *Soil Biology and Biochemistry* 106 : 119-28.

Menard R. 2004. « β -1,3 glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and arabidopsis ». *The Plant Cell Online* 16 (11): 3020-32.

Menard R. 2005. « Defense and resistance-inducing activities in tobacco of the sulfated β -1,3 glucan PS3 and its synergistic activities with the unsulfated molecule ». *Plant and Cell Physiology* 46 (12): 1964-72.

Mendes R, Garbeva P et Raaijmakers JM. 2013. « The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms ». *FEMS Microbiology Reviews* 37 (5): 634-63.

Mercier L, Lafitte C, Borderies G, Briand X, Esquerre-Tugaye MT et Fournier J. 2001. « The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence ». *New Phytologist* 149 (1): 43-51.

Miedes E, Vanholme R, Boerjan W et Molina A. 2014. « The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens ». *Frontiers in Plant Science* 5.

Millet YA., Danna CH, Clay NK, Songnuan W, Simon MD, Werck-Reichhart D et Ausubel FM. 2010. « Innate immune responses activated in arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns ». *The Plant Cell* 22 (3): 973-90.

Mishra AK, Sharma K et Misra RS. 2012. « Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants ». *Journal of Plant Interactions* 7 (2): 95-120.

Miyasaka SC et Hawes MC. 2001. « Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity ». *Plant Physiology* 125 (4): 1978–1987.

Molinari S et Baser N. 2010. « induction of resistance to root-knot nematodes by SARelicitors in tomato ». *Crop Protection* 29 (11): 1354-62.

Monaghan J et Zipfel C. 2012. « Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane ». *Current Opinion in Plant Biology* 15 (4): 349-57.

Montsant A. 2005. « comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* ». *Plant physiology* 137 (2): 500-513.

Mouden N, Benkirade R, Touhami AO, Badoc A et Douira A. 2010. « Effet de six fongicides sur le développement de six souches de *Botrytis cinerea* isolées de fraises », Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 149: 85-102.

Mouget J. 1995. « Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved ? » *FEMS Microbiology Ecology* 18 (1): 35-43.

Müller C et Riederer M. 2005. « Plant surface properties in chemical ecology ». *Journal of Chemical Ecology* 31 (11): 2621-51.

Mur LAJ, Kumari A, Brotman Y, Zeier J, Mandon J, Cristescu S, Harren F, Kaiser W, Fernie AR et Gupta KJ. 2019. « Nitrite and nitric oxide are important in the adjustment of primary metabolism during the hypersensitive response in tobacco ». *Journal of Experimental Botany*.

N

Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, Glawischnig E, Olsen CE, Halkier BA et Glazebrook J. 2007. « *Arabidopsis* Cytochrome P450 Monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis ». *The Plant Cell* 19 (6): 2039-52.

Nakano RT., Piślewska-Bednarek M, Yamada P, Edger PP, Miyahara M, Kondo M, Böttcher C, et al. 2017. « PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* ». *The Plant Journal* 89 (2): 204-20.

Nakano RT., Yamada K, Bednarek P, Nishimura M et Hara-Nishimura I. 2014. « ER bodies in plants of the Brassicales order: biogenesis and association with innate immunity ». *Frontiers in Plant Science* 5.

Nakazaki A, Yamada K, Kunieda T, Sugiyama R, Hirai MY, Tamura K, Hara-Nishimura I et Shimada T. 2019. « Leaf endoplasmic reticulum bodies identified in arabidopsis rosette leaves are involved in defense against herbivory ». *Plant Physiology* 179 (4): 1515-24.

Nalam VJ., Shah J, et Nachappa P. 2013. « Emerging role of roots in plant responses to aboveground insect herbivory: root responses to aboveground herbivory ». *Insect Science* 20 (3): 286-96.

NandaAK., Andrio E, Marino D, Pauly N et Dunand C. 2010. « Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions ». *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (2): 195-204.

Narusaka Y, Narusaka M, Abe H, Hosaka N, Kobayashi M, Shiraishi T et Masaki I. 2009. « High-throughput screening for plant defense activators using a β -glucuronidase-reporter gene assay in *Arabidopsis thaliana* » 26: 345-49.

Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT et Erbs G. 2013. « MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern) triggered immunity in plants ». *Frontiers in Plant Science* 4.

Nguema-Ona E, Viché-Gibouin M, Cannesan MA et Driouich A. 2013. « Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions ». *Trends in Plant Science* 18 (8): 440-49.

Ni Z, Kim ED et Chen ZJ. 2009. « Chlorophyll and starch assays ». *Protocol Exchange*

Nicaise V, Roux M et Zipfel C. 2009. « Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm ». *Plant physiology* 150 (4): 1638-47.

Nobécourt P. 1946. « Les mécanismes de l'immunité naturelle chez les végétaux. » *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* 26 (287): 529-42.

O

Oancea F, Velea S, Fatu V, Mincea C et Ilie L. 2013. «Micro-algae based plant biostimulant and its effect on water stressed tomato plants». *Romanian Journal of Plant Protection*. Vol. VI (2013) », 14.

Oerke EC. 2006. « Crop Losses to Pests ». *The Journal of Agricultural Science* 144 (01): 31.

Okubara PA et Paulitz TC. 2005. « Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective ». In *Root Physiology: from Gene to Function*, 4:215-26.

Olanrewaju OS, Ayangbenro AS, Glick BR et Babalola OO. 2019. « Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (3): 1155-66.

Oliver RP et Ipcho SV. 2004. « Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens » 5 (4): 347-52.

O'Neill MA., Ishii T, Albersheim P, et Darvill AG. 2004. « Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide ». *Annual Review of Plant Biology* 55 (1): 109-39.

Onfroy C et Tivoli B. 2005. « Test de criblage du pois protéagineux au stade juvénile pour la résistance au pathogène fongique *Mycosphaerella pinodes* ». *Cahier des Techniques* 1 (1).

Ovide C, Kiefer-Meyer MC, Bérard C, Vergne N, Lecroq T, Plasson C, Burel C et al. 2018. « Comparative in depth RNA Sequencing of *P. tricornutum*'s Morphotypes Reveals specific features of the oval morphotype ». *Scientific Reports* 8 (1).

P

Papadopoulou GV, Maedicke A, Grosser K, Van Dam NM et Martínez-Medina A. 2018. « Defence signalling marker gene responses to hormonal elicitation differ between roots and shoots ». *AoB Plants* 10 (3).

Paris F, Krzyżaniak Y, Gauvrit C, Jamois F, Domergue F, Joubès J, Ferrières V et al. 2016. « An ethoxylated surfactant enhances the penetration of the sulfated laminarin through leaf cuticle and stomata, leading to increased induced resistance against grapevine downy mildew ». *Physiologia Plantarum* 156 (3): 338-50.

Park Y, Je KW, Lee K, Jung SE, et Choi TJ. 2008. « Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *brevundimonas sp.* isolated from the microalga ». *Hydrobiologia* 598 (1): 219-28.

Patier P, Potin P, Rochas C, Kloareg B, Yvin JC et Liénart Y. 1995. « Free or silica-bound oligokappa-carrageenans elicit laminarinase activity in rubus cells and protoplasts ». *Plant Science* 110 (1): 27-35.

Paulert RDE, Urlass C et Moerschbacher BM. 2010. « Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants: priming effect of ulvan in cereal cells and plants ». *Plant Pathology* 59 (4): 634-42.

Peaucelle A, Braybrook S et Höfte H. 2012. « Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited ». *Frontiers in Plant Science* 3.

Pečenková T, Pleskot R et Žárský V. 2017. « Subcellular localization of arabidopsis pathogenesis-related 1 (PR1) protein ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4): 825.

Perrine-Walker FM, Prayitno J, Rolfe BG, Weinman JJ et Hocart CH. 2007. « Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia ». *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3343-50.

Pillitteri LJ et Dong J. 2013. « Stomatal development in arabidopsis ». *The Arabidopsis Book* 11 : e0162.

Plancot B, Santaella C, Jaber R, Kiefer-Meyer MC, Follet-Gueye ML, Lepince J, Gattin I, Souc C, Driouich A et Vicro-Gibouin M. 2013. « Deciphering the responses of root border-

like cells of arabidopsis and flax to pathogen-derived elicitors ». *Plant Physiology* 163 (4): 1584-97.

Poncini L, Wyrsh I, Déneraud Tendon V, Vorley T, Boller T, Geldner N, Métraux JP et Lehmann S. 2017. « In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern atpep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer ». *Plos One* 12 (10): e0185808.

Postel S et Kemmerling B. 2009. « Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (9): 1025-31.

Prestegard S, Erga S, Steinrücken P, Mjøs S, Knutsen G et Rohloff J. 2015. « Specific metabolites in a *Phaeodactylum tricornutum* strain isolated from western norwegian fjord water ». *Marine Drugs* 14 (1): 9.

Prieto P, Navarro-Raya C, Valverde-Corredor A, Amyotte SG, Dobinson KF et Mercado-Blanco J. 2009. « Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its *in planta* interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 ». *Microbial Biotechnology* 2 (4): 499-511.

R

Rajamani S, Bauer WD, Robinson JB, Farrow JM, Pesci EC, Teplitski M, Gao M, Sayre RT et Phillips DA. 2008. « The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the lasR bacterial quorum-sensing receptor ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (9): 1184-92.

Ramanan R, Kim BH, Cho DH, Oh HE et Kim HS. 2016. « Algae–Bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications ». *Biotechnology Advances* 34 (1): 14-29.

Ramsey RJL., Stephenson GR et Hall JC. 2005. « A review of the effects of humidity, humectants, and surfactant composition on the absorption and efficacy of highly water-soluble herbicides ». *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82 (2): 162-75.

Rao D, Webb JS, Holmstrom C, Case R, Low A, Steinberg P et Kjelleberg S. 2007. « Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (24): 7844-52.

Raposo M, De Morais R et De Morais AB. 2013. « Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae ». *Marine Drugs* 11 (12): 233-52.

Rashid A. 2016. « Defense responses of plant cell wall non-catalytic proteins against pathogens ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 94 : 38-46.

Rasmann S et Agrawal AA. 2008. « In defense of roots: a research agenda for studying plant resistance to belowground herbivory ». *Plant physiology* 146 (3): 875-80.

Rasmann S et Turlings TCJ. 2016. « Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere ». *Current Opinion in Plant Biology* 32 : 62-68.

Reimann BEF et Volcani BE. 1967. « Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms ». *Journal of Ultrastructure Research* 21 (3-4): 182-93.

Rekhter D, Lüdke D, Ding Y, Feussner K, Zienkiewicz K, Lipka V, Wiermer M, Zhang Y et Feussner I. 2019. « PBS3 is the missing link in plant-specific isochorismate-derived salicylic acid biosynthesis ». Preprint. *Plant Biology*.

Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, Farcy F, Durand R et Reignault P. 2007. « Ioduric acid, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction ». *Phytochemistry* 68 (8): 1156-64.

Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, Singh P et Bux F. 2018. « Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges ». *Biotechnology Advances* 36 (4): 1255-73.

Reunov A, Nagorskaya V, Lapshina L, Yermak I et Barabanova A. 2004. « Effect of κ/β -carrageenan from red alga *Tichocarpus crinitus* (Tichocarpaceae) on infection of detached tobacco leaves with *Tobacco mosaic virus* ». *Journal of Plant Diseases and Protection* 111 (2): 165-72.

Ribalet F, Intertaglia L, Lebaron P et Casotti R. 2008. « Differential effect of three polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates ». *Aquatic Toxicology* 86 (2): 249-55.

Ribeiro J. 2006. « The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes ». *Journal of Experimental Botany* 57 (9): 2025-35.

Ridley BL, O'Neill MA et Mohnen D. 2001. « Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling ». *Phytochemistry* 57 (6): 929-67.

Rizhsky L, Davletova S, Liang H et Mittler R. 2004. « The zinc finger protein zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *arabidopsis* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 11736-43.

RMT Elicitra. 2013. « Guide méthodologique d'évaluation de l'efficacité des Stimulateurs des Défenses des Plantes (SDP) ». 2013.

RMT Elicitra 2018. *Les stimulateurs de défense des plantes: panorama et solutions d'avenir*. Acta Editions

Robert-Seilaniantz A, Grant M et Jones JDG. 2011. « Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism ». *Annual Review of Phytopathology* 49 (1): 317-43.

Roetschi A, Si-Ammour A, Belbahri L, Mauch F et Mauch-Mani B. 2001. « characterization of an arabidopsis-phytophthora pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling: arabidopsis-phytophthora pathosystem ». *The Plant Journal* 28 (3): 293-305.

Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED et Delledonne M. 2004. « Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions: no signalling during the plant hr ». *Cellular Microbiology* 6 (9): 795-803.

Ropitiaux M, Bernard S, Follet-Gueye ML, Vicré M, Boulogne I et Driouich A. 2019. « Xyloglucan and cellulose form molecular cross-bridges connecting root border cells in pea (*Pisum sativum*) ». *Plant Physiology and Biochemistry* 139 : 191-96.

Rothlisberger-Lewis KL., Foster JL et Hons F.M. 2016. « Soil carbon and nitrogen dynamics as affected by lipid-extracted algae application ». *Geoderma* 262: 140-46.

Roussel V, Koenig J, Beckert M et Balfourier F. 2004. « Molecular diversity in french bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes ». *Theoretical and Applied Genetics* 108 (5): 920-30.

S

Saijo Y, Loo EP et Yasuda S. 2018. « Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions ». *The Plant Journal* 93 (4): 592-613.

Saldaña Z, Sánchez E, - Xicohtencatl-Cortes J, Puente JL et Girón JA. 2011. « Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 ». *Frontiers in Microbiology* 2.

Sanchez-Vallet A, Ramos B, Bednarek P, López G, Piślewska-Bednarek M, Schulze-Lefert P et Molina A. 2010. « Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi: arabidopsis non-host resistance to necrotrophic fungi ». *The Plant Journal*. 1;63(1):115-27

Sangha J, Kandasamy S, Khan W, Bahia N, Singh R, Critchley A et Prithiviraj B. 2015. « λ Carrageenan suppresses *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) replication and symptom expression in tomatoes ». *Marine Drugs* 13 (5): 2875-89.

Sangha J, Ravichandran S, Prithiviraj K, Critchley AT et Prithiviraj B. 2010. « Sulfated macroalgal polysaccharides λ -carrageenan and ι -carrageenan differentially alter *Arabidopsis*

thaliana resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75 (1-2): 38-45.

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Del Carmen Orozco-Mosqueda MA et Glick BR. 2016. « Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes ». *Microbiological Research* 183 : 92-99.

Sasse J, Martinoia E et Northen T. 2018. « Feed your friends : do plant exudates shape the root microbiome ? » *Trends in Plant Science* 23 (1): 25-41.

Sasso S, Pohnert G, Lohr M, Mittag M et Hertweck C. 2012. « Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products ». *FEMS Microbiology Reviews* 36 (4): 761-85.

Savary S, Ficke A, Aubertot JN et Hollier C. 2012. « Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security ». *Food Security* 4 (4): 519-37.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N et Nelson A. 2019. « The global burden of pathogens and pests on major food crops ». *Nature Ecology & Evolution* 3 (3): 430-39.

Scheller HV et Ulvskov P. 2010. « Hemicelluloses ». *Annual Review of Plant Biology* 61 (1): 263-89.

Schlaeppli K, Abou-Mansour E, Buchala A et Mauch F. 2010. « Disease resistance of arabidopsis to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin: glucosinolates and camalexin in disease resistance ». *The Plant Journal* 62 (5): 840-51.

Schmittgen TD et Livak KJ. 2008. « Analyzing real-time PCR data by the comparative ct method ». *Nature Protocols* 3 (6): 1101-8.

Schuhegger R, Nafis M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatos A, Halkier BA et Glawischnig E. 2006. « CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis ». *Plant physiology* 141 (4): 1248-54.

Schultz J., Muller T, Achtziger M., Seibel PN, Dandekar T, et Wolf M. 2006. « The internal transcribed spacer 2 database a web server for (not only) low level phylogenetic analyses ». *Nucleic Acids Research* 34 (Web Server): W704-7.

Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, et Chinchilla D. 2010. « Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1 ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (13): 9444-51.

Schulze-Lefert P et Panstruga R. 2003. « Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance ». *Annual Review of Phytopathology* 41 (1): 641-67.

Schwessinger B et Zipfel C. 2008. « News from the Frontline: Recent Insights into PAMP-Triggered Immunity in Plants ». *Current Opinion in Plant Biology* 11 (4): 389-95.

Sciuchetti LA. 1967. « The effects of DMSO alone and when combined with various growth regulators on the growth and metabolic products of *Datura spp.* ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 141 (1 Biological Ac): 139-47.

Sels J, Mathys J., De Coninck B, Cammue B et De Bolle MFC. 2008. « Plant Pathogenesis-Related (PR) proteins: a focus on PR peptides ». *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (11): 941-50.

Sesma A et Osbourn AE. 2004. « The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi ». *Nature* 431 (7008): 582-86.

Seyfferth C et Tsuda K. 2014. « Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming ». *Frontiers in Plant Science* 5.

Sharma HSS, Fleming C, Selby C, Rao JR et Martin T. 2014. « Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses ». *Journal of Applied Phycology* 26 (1): 465-90.

Sharma K, Butz KF et Finckh MR. 2010. « Effects of host and pathogen genotypes on inducibility of resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) to *Phytophthora infestans*: induced late blight resistance in tomato ». *Plant Pathology* 59 (6): 1062-71.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS et Pessarakli M. 2012. « Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions ». *Journal of Botany* 2012 : 1-26.

Showalter AM et Basu D. 2016. « Extensin and arabinogalactan-protein biosynthesis: glycosyltransferases, research challenges, and biosensors ». *Frontiers in Plant Science* 7.

Singh A. 2017. « Glucosinolates and plant defense ». In *Glucosinolates*, 237-46.

Song YY, Zeng RS, Xu JF, Li J, Shen X et Yihdego WG. 2010. « Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal networks ». *PLoS ONE* 5 (10): e13324.

Spoel SH., Johnson JS et Dong X. 2007. « Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (47): 18842–18847.

Stadnik MJ et De Freitas MB. 2014. « Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers ». *Tropical Plant Pathology* 39 (2): 111-18.

Stanley MS et Callow JA. 2007. « Whole cell adhesion strength of morphotypes and isolates of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) ». *European Journal of Phycology* 42 (2): 191-97.

Steimetz E, Trouvelot S, Gindro K, Bordier A, Poinssot B, Adrian M et Daire X. 2012. « Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 89-96.

Stirk WA., Ördög V, Novák O, Rolčík J, Strnad M, Bálint P et Van Staden J. 2013. « Auxin and Cytokinin Relationships in 24 Microalgal Strains ¹ ». *Journal of Phycology* 49 (3): 459-67.

Strange RN et Scott PR. 2005. « Plant disease: a threat to global food security ». *Annual Review of Phytopathology* 43 (1): 83-116.

Stringlis IA., Proietti S, Hickman R, Van Verk MC, Zamioudis C et Pieterse CMJ. 2018. « Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists ». *The Plant Journal* 93 (1): 166-80.

Stukenbrock EH et McDonald BA. 2008. « The origins of plant pathogens in agroecosystems ». *Annual Review of Phytopathology* 46 (1): 75-100.

Stulemeijer IJE et Joosten MHAI. 2008. « Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants ». *Molecular Plant Pathology* 9 (4): 545-60.

Sukno SA., Garcia VM, Shaw BD et Thon MR. 2008. « Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola* ». *Applied and Environmental Microbiology* 74 (3): 823-32.

Sun Y., Li L, Macho AP, Han Z, Hu Z, Zipfel C, Zhou JM et Chai J. 2013. « Structural basis for flg22-induced activation of the arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex ». *Science* 342 (6158): 624-28.

T

Talle SM., Coley PD et Kursar TA 2002. « Antifungal leaf-surface metabolites correlate with fungal abundance in sagebrush populations ». *Journal of Chemical Ecology* 28 (11): 2141–2168.

Teplitski M, Chen H, Rajamani S, Gao M, Merighi M, Sayre RT, Robinson JB, Rolfe, BG et Bauer WD. 2004. « *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria ». *Plant Physiology* 134 (1): 137-46.

Tesson B, Gaillard C et Martin-Jézéquel V. 2009. « Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin ». *Botanica Marina* 52 (2).

Thatcher LF., Anderson JP, et Singh KB. 2005. « Plant defence responses: what have we learnt from arabidopsis ? » *Functional Plant Biology* 32 (1): 1.

Tivoli B., Beasse C, Lemarchand E et Masson E. 1996. « Effect of ascochyta blight (*mycosphaerella pinodes*) on yield components of single pea (*Pisum sativum*) plants under field conditions ». *Annals of Applied Biology* 129 (2): 207-16.

Tor M., Lotze MT et Holton N. 2009. « Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes ». *Journal of Experimental Botany* 60 (13): 3645-54.

Toyota M, Spencer D, Sawai-Toyota S, Jiaqi W, Zhang T, Koo AJ, Howe GA et Gilroy S. 2018. « Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling ». *Science* 361 (6407): 1112-15.

Trevors JT. 2010. « One gram of soil: a microbial biochemical gene library ». *Antonie van Leeuwenhoek* 97 (2): 99-106.

Trick CG., Andersen RJ et Harrison PJ. 1984. « Environmental factors influencing the production of an antibacterial metabolite from a marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum* ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41 (3): 423-32.

Trouvelot S, Héloir MC, Poinssot B, Gauthier A, Paris F, Guillier C, Combier M, Trdá, L, Daire X et Adrian M. 2014. « Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays ». *Frontiers in Plant Science* 5.

Trouvelot S, Varnier AL, Allègre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V et al. 2008. « A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including hr-like cell death ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (2): 232-43.

Tsuba M., Katagiri C, Takeuchi Y, Takada Y et Yamaoka N. 2002. « Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis* ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60 (2): 51-57.

Tunc-Ozdemir M et. Jones AM. 2017. « Ligand-induced dynamics of heterotrimeric G protein-coupled receptor-like kinase complexes ». *PLOS ONE* 12 (2): e0171854.

Tunc-Ozdemir M, Urano D, Jaiswal DK, Clouse SD et Jones AM. 2016. « Direct modulation of heterotrimeric G protein-coupled signaling by a receptor kinase complex ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (27): 13918-25.

Turner GW. 2004. « organization of monoterpene biosynthesis in mentha. immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase ». *Plant physiology* 136 (4): 4215-27.

Tytga TOG., Verhoeven KJF., Jansen JJ, Raaijmakers CE, Bakx-Schotman T, McIntyre LM, Van der Putten WH, Biere A et Van Dam NM. 2013. « Plants know where it hurts: root and shoot jasmonic acid induction elicit differential responses in *Brassica oleracea* ». *PLoS ONE* 8 (6): e65502.

U

Urano D, Phan N, Jones JC, Yang J, Huang J, Grigston J, Taylor JP et Jones AM. 2012. « Endocytosis of the seven-transmembrane RGS1 protein activates G-protein-coupled signalling in arabidopsis ». *Nature Cell Biology* 14 (10): 1079-88.

Van Bockhaven J, De Vleeschauwer D et Höfte M. 2013. « Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way ». *Journal of Experimental Botany* 64 (5): 1281-93.

V

Van Loon LC et Van Strien EA. 1999. « The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55 (2): 85-97.

Van Loon LC, Rep M et Pieterse CMJ. 2006. « significance of inducible defense-related proteins in infected plants ». *Annual Review of Phytopathology* 44(1):135-62.

Vandavasi VG, Putnam DK, Zhang Q, Petridis L, Heller WT, Nixon BT, Haigler CH et al. 2016. « A structural study of CESA1 catalytic domain of arabidopsis cellulose synthesis complex: evidence for cesa trimers ». *Plant Physiology* 170 (1): 123-35.

Vandesompele J, De Preter K, Van Roy N et De Paepe A. 2002. « Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes », *Genome Biol*, 18;3(7):RESEARCH0034. Epub

Veluchamy S, Hind SR, Dunham DM, Martin GB et Panthee DR. 2014. « Natural variation for responsiveness to flg22, FlgII-28, and Csp22 and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in heirloom tomatoes ». *PLoS ONE* 9 (9): e106119.

Vera J, Castro J, Contreras RA, González A et Moenne A. 2012. « Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. xanthi) ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79 : 31-39.

Vera J, Castro J, Contreras RA, González A et Moenne A. 2011. « Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants ». *Marine Drugs* 9 (12): 2514-25.

Vicre M, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. 2005. « Root Border-like Cells of Arabidopsis. Microscopical Characterization and Role in the Interaction with Rhizobacteria ». *Plant Physiology* 138 (2): 998-1008.

Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG et Thomashow MF. 2005. « Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of arabidopsis ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 41 (2): 195-211.

Voigt CA. 2014. « Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae ». *Frontiers in Plant Science*. 5:168.

Volcani BE. 1981. « Cell wall formation in diatoms: morphogenesis and biochemistry ». In *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* 157-200.

Vorholt JA. 2012. « Microbial life in the phyllosphere ». *Nature Reviews Microbiology* 10 (12): 828-40.

Vorwerk S, Somerville S et Somerville C. 2004. « The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance ». *Trends in Plant Science* 9 (4): 203-9.

W

Wagner GJ. 1991. « Secreting glandular trichomes: more than just hairs ». *Plant Physiology* 96 (3): 675-79.

Walters DR., Havis, ND, Paterson L, Taylor J et Walsh DJ. 2011. « Cultivar effects on the expression of induced resistance in spring barley ». *Plant Disease* 95 (5): 595-600.

Walters DR., Ratsep J, et Havis ND. 2013. « Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future ». *Journal of Experimental Botany* 64 (5): 1263-80.

Wang C, Chin CK et Gianfagna T. 2000. « Relationship between cutin monomers and tomato resistance to powdery mildew infection ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57 (2): 55-61.

Wang F, Zhang P, Qiang S et Xu LL. 2006. « Interaction of plant epicuticular waxes and extracellular esterases of *Curvularia eragrostidis* during infection of *Digitaria sanguinalis* and *Festuca arundinacea* by the fungus ». *International Journal of Molecular Sciences* 7 (9): 346-57.

Wang M, Gao L, Dong S, Sun Y, Shen Q et Guo S. 2017. « Role of silicon on plant-pathogen interactions ». *Frontiers in Plant Science* 8: 701.

Wang R, Wang J, Xue Q, Tan L, Cai J et Wang H. 2016. « Preliminary analysis of allelochemicals produced by the diatom *Phaeodactylum tricornutum* ». *Chemosphere* 165: 298-303.

Watt M, Silk WK et Passioura JB. 2006. « Rates of root and organism growth, soil conditions, and temporal and spatial development of the rhizosphere ». *Annals of Botany* 97 (5): 839-55.

Wen F, Celoy RM, Nguyen T, Zeng W, Keegstra K, Immerzeel P, Pauly M et Hawes MC. 2008. « Inducible expression of *Pisum sativum* xyloglucan fucosyltransferase in the pea root cap meristem, and effects of antisense mRNA expression on root cap cell wall structural integrity ». *Plant Cell Reports* 27 (7): 1125-35.

Wen F., VanEtten HD, Tsaprailis G et Hawes MC. 2006. « Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates ». *Plant Physiology* 143 (2): 773-83.

Wen F., White GJ, VanEtten HD, Xiong Z et Hawes MC. 2009. « Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection ». *Plant Physiology* 151 (2): 820-29.

Wen F, VanEtten HD, Tsaprailis G et Hawes MC. 2007. « Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates ». *Plant Physiology* 143 (2): 773-83.

Wendehenne D, Durner J et Klessig DF. 2004. « Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses ». *Current Opinion in Plant Biology* 7 (4): 449-55.

Wilhelm C, Büche C, Fisahn J, Goss R, Jakob T, LaRoche J, Lavaud J et al. 2006. « The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae ». *Protist* 157 (2): 91-124.

Willis A, Chiovitti A, Dugdale TM et Wetherbee R. 2013. « Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): structure, composition, and adhesive characteristics ». *Journal of Phycology*,

Wu Y, Fan W, Li X, Chen H, Takáč T, Šamajová O, Fabrice MR et al. 2017. « Expression and distribution of extensins and AGPs in susceptible and resistant banana cultivars in response to wounding and *Fusarium oxysporum* ». *Scientific Reports* 7 : 42400.

Wuyts N, Maung ZTZ, Swennen R et De Waele D. 2006. « Banana rhizodeposition: characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis* ». *Plant and Soil* 283 (1-2): 217-28.

Wyrsh I, Domínguez-Ferreras A, Geldner N et Boller T. 2015. « Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in arabidopsis *Fls2* mutants ». *New Phytologist* 206 (2): 774-84.

X

Xiao F, Goodwin SM, Xiao Y, Sun Z, Baker D, Tang X, Jenks MA et Zhou JM. 2004. « Arabidopsis CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development ». *The EMBO Journal* 23 (14): 2903-13.

Xie D, Ma L, Šamaj L et Xu C. 2011. « Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *benincasae* infection and fusaric acid treatment ». *Plant Cell Reports* 30 (8): 1555-69.

Xie F, Williams A, Edwards A et Downie JA. 2012 « A plant arabinogalactan-like glycoprotein promotes a novel type of polar surface attachment by *Rhizobium leguminosarum* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25 (2): 250–258.

Xin XF et He SY. 2013. « *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants ». *Annual Review of Phytopathology* 51 (1): 473-98.

Y

Yang M, Lin X, Liu X, Zhang J et Ge F. 2018. « Genome annotation of a model diatom *Phaeodactylum tricornutum* using an integrated proteogenomic pipeline ». *Molecular Plant* 11 (10): 1292-1307.

Yeats TH et Rose JKC. 2013. « The formation and function of plant cuticles ». *Plant physiology* 163 (1): 5-20.

Z

Zabka V, Stangl M, Bringmann G, Vogg G, Riederer M et Hildebrandt U. 2007. « Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus ». *New Phytologist* 177, 251-263

Zeidler D., Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P et Durner J 2004. « From the cover: innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (44): 15811-16.

Zhang N, Lariviere A, Tonsor SJ et Traw MB. 2014. « Constitutive camalexin production and environmental stress response variation in arabidopsis populations from the iberian peninsula ». *Plant Science* 225 : 77-85.

Zhang Y, Lubberstedt T et Xu M. 2013. « The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens ». *Journal of Genetics and Genomics* 40 (1): 23-35.

Zhang XH., Yu XZ et Yue DM. 2016. « Phytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to rice seedlings ». *International Journal of Environmental Science and Technology* 13 (2): 607-14.

Zhao X, Misaghi IJ et Hawes MC. 2000. « Stimulation of border cell production in response to increased carbon dioxide levels ». *Plant Physiology* 122 (1): 181–188.

Zhao X, Schmitt M et Hawes MC. 2000. « Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior ». *Phytopathology* 90 (11): 1239–1245.

Zhou N. 1999. « Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase ». *The plant cell online* 11 (12): 2419-28.

Zimmerli L., Jakab G, Mettraux JP etMauch-Mani B. 2000. « Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in arabidopsis by beta-aminobutyric acid ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (23): 12920-25.

Zipfel C. 2014. « Plant pattern-recognition receptors ». *Trends in Immunology* 35 (7): 345-51.

Zipfel C et Felix G. 2005. « Plants and animals: a different taste for microbes? » *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4): 353-60.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T et Felix G. 2006. « Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts agrobacterium-mediated transformation ». *Cell* 125 (4): 749-60.

Sites internet

Société ImmunRise : <https://www.immunrisebiocontrol.fr> Consulté le 15 Juillet 2018

Références bibliographiques

Le champs des possibles. 2018. CNRS Images.
<https://www.youtube.com/watch?v=HzUQQ94kO2U> Consulté le 15 Juillet 2018

Brevet :

Emiliani G. 2018. Microalgae extract for agricultural use. Brevet N°WO/2016/174646.

Résumé

La protection intégrée, qui vise à réduire l'usage des pesticides, est un défi majeur pour l'agriculture du XXI^{ème} siècle. Le développement de nouvelles approches agronomiques qui concilient environnement et agriculture est une condition indispensable pour l'agriculture de demain. Dans ce contexte, l'utilisation d'éliciteurs capables de mimer une attaque pathogène et de promouvoir un état de résistance chez les plantes face à des maladies représente une alternative naturelle à la lutte chimique. Ces éliciteurs sont nommés les stimulateurs de défense des plantes (SDP). Ils peuvent provenir de différentes sources et être extraits à partir de macroalgues comme c'est le cas des SDP à base de polysaccharides d'algues tels que la laminarine utilisée pour stimuler l'immunité de plantes agronomiques. Toutefois, l'exploitation de ces ressources dans leur milieu naturel et les difficultés de production liées à leur cycle de développement constituent des freins à leur utilisation. La valorisation des microalgues comme source de SDP pourrait permettre de s'affranchir de ces contraintes. Cependant la recherche et de molécules SDP chez les microalgues est encore peu abordée. Au cours de ce travail, le potentiel d'une culture de microalgue, *Phaeodactylum tricornutum*, à induire des réactions de défense chez les plantes a été évalué. Un broyat cellulaire a été appliqué sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Le caractère éliciteur de ce broyat a été testé et caractérisé par des approches microscopiques, physiologiques et moléculaires. Les résultats ont montré que les plantes traitées présentaient des niveaux d'expression des gènes *PR-1*, *PAD3*, *ACS6* et *WRKY40* et un niveau de protection contre la bactérie *Pseudomonas syringae DC3000 (Pst)* plus élevés que les plantes non traitées. De plus, un effet bactéricide *in vitro* sur la bactérie *Pst* a été observé. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives pour le développement de produits SDP d'origine naturelle capables de protéger les cultures.

Mots clés : Microalgue, immunité végétale, *Phaeodactylum tricornutum*, protection des cultures, stimulateur de défense des plantes (SDP)

Abstract

Integrated plant protection, which aims to reduce the use of pesticide, is a major challenge for the agriculture of the 21st century. The development and application of new agronomic approaches is a prerequisite for crop protection in a sustainable agriculture system. In this context, the use of elicitors capable of mimicking a pathogenic attack and promoting a plant resistance state against diseases is a natural alternative to the use of agro-chemicals. These elicitors are also called plant defense stimulators (PDS). These can be obtained from different sources including macroalgae as it the case for the polysaccharide-based PDS laminarin that is currently used for the protection of a number of crops. However, the exploitation of these natural resources and the difficulties of their production due to their development cycle do hamper their use at a large scale. One of the possibilities to overcome these difficulties is the use of microalgae as a source of PDS. But this possibility and the potential of microalgae-derived PDS for crop protection are currently under investigated. In the present work, we have used a cell extract from the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and assessed its defense response-eliciting activities on *Arabidopsis thaliana* seedlings by using microscopic, physiological and molecular approaches. The results show that treated plants exhibit higher levels of expression of the *PR-1*, *PAD3*, *ACS6* and *WRKY40* genes and a higher level of protection against the pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae DC3000 (Pst)* than non-treated plants. An *In vitro* antibacterial activity on the *Pst* bacteria was also observed. Our findings suggest that *P. tricornutum* cell extracts are able to activate plant immune responses and offer new perspectives for the development of novel plant defense stimulators.

Keywords : Microalgae, plant immunity, *Phaeodactylum tricornutum*, crop protection, plant defense stimulator (PDS)