



**HAL**  
open science

# Induction de la PAMP-Triggered Immunity par des éliciteurs d'origine différente chez *Solanum tuberosum*

Rafaela Lopes Martin

► **To cite this version:**

Rafaela Lopes Martin. Induction de la PAMP-Triggered Immunity par des éliciteurs d'origine différente chez *Solanum tuberosum*. Biodiversité et Ecologie. Agrocampus Ouest, 2020. Français. NNT : 2020NSARC147 . tel-03191646

**HAL Id: tel-03191646**

**<https://theses.hal.science/tel-03191646>**

Submitted on 7 Apr 2021

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

*L'institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture,  
l'alimentation et l'environnement*

Ecole interne AGROCAMPUS OUEST campus Rennes

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation  
Spécialité : « Sciences agronomiques »*

Par

**Rafaela LOPES MARTIN**

## **Induction de la PAMP-Triggered Immunity par des éliciteurs d'origine différente chez *Solanum tuberosum***

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13/07/2020

Unité de recherche : UMR 1349 INRA / AGROCAMPUS OUEST / Université de Rennes 1, Institut de  
Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP)

Thèse N° : C-147 \_ 2020-13

### **Rapporteurs avant soutenance :**

**Marie-France Corio-Costet** Directrice de de recherche, INRA Bordeaux, ISVV SAVE - UMR INRA-BSA

**Raphaël Lugan** Maître de conférence, Université d'Avignon, UMR QUALISUD - CIRAD

### **Composition du Jury :**

Président :

Examineurs : **Marie-France Corio-Costet** Directrice de de recherche, INRA Bordeaux, ISVV SAVE UMR INRA-BSA

**Raphaël Lugan** Maître de conférence, Université d'Avignon, UMR QUALISUD - CIRAD

**Anne Le Ralec** Professeur, AGROCAMPUS OUEST, Rennes

**Marie Noëlle Brisset** Directrice de de recherche, INRA Angers, UMR IRHS

**Azeddine Driouich** Professeur, Université de Rouen, Laboratoire Glyco-MEV

**Odair Fernandes** Professeur, UNESP/Jaboticabal, Brésil

Dir. de thèse : **Florence Val** Professeur, AGROCAMPUS OUEST, Rennes

Co-dir. de thèse : **Eric Nguema-Ona** Chef projet R&D, Groupe Roullier, Saint-Malo



# REMERCIEMENTS

---

*La réalisation de cette thèse a été possible grâce au financement du Groupe Roullier. Je voudrais remercier le Directeur de Recherche R&D, M. Jean-Claude Yvin d'avoir initié la construction de ce projet CIFRE. Merci également d'avoir permis le financement des expérimentations ce qui nous a permis d'avoir une liberté créative et des ressources pour réaliser ce projet correctement. Je voudrais spécialement remercier Eric Nguema-Ona, mon référent entreprise et co-encadrant de la thèse, qui ma suivie avec des bons conseils. Ce projet m'a permis de travailler et développer une nouvelle technique dans un laboratoire, ce qui a été un vrai défi. Je remercie, le Groupe Roullier d'avoir mis à notre disposition la plateforme métabolomique à Saint Malo et le support technique de l'ingénieur de recherche en métabolomique, Adrian Schwarzenberg.*

*Je voudrais remercier, Florence Val, mon encadrante principale de thèse pour cette formation en recherche qui a dépassé toutes mes attentes. Merci Florence de m'avoir aidée dans ma démarche scientifique, de m'avoir fait confiance pour « manager » ce projet et transmettre cette connaissance à d'autres personnes au long du projet. Merci pour toutes les heures passées à la rédaction de cette thèse et pour être forte pour deux quand je n'étais pas sûr d'être. Ces années dans ton laboratoire m'ont montré comment être dans une équipe.*

*Je voudrais remercier Eric pour les apports scientifiques qui ont fait le pont entre la recherche privée et publique, entre la recherche au laboratoire et au champs. Merci pour tes contributions dans les réunions d'organisation des expérimentations et de rédaction de l'article, des corrections de la thèse. Je voudrais également te remercier Eric pour ta gentillesse qui se traduit dans chacune de tes paroles, j'ai beaucoup appris avec toi comment être un manager.*

*Je remercie Marie-France Corio-Costet et Raphaël Lugan pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteur. Ces remerciements sont destinés également aux autres membres du jury, Anne Le Ralec, Azeddine Driouich, Marie Noëlle Brisset et Odair Fernandes.*

*Je remercie les membres de mon comité de thèse qui ont été très présents tout au long de mon projet, Adrian Schwarzenberg, Alain Bouchereau, Alexandre Degrave, Didier Andrivon, Philippe Reignault. Alexandre et Philippe, merci pour vos encouragements et pour porter la présidence de mon comité de thèse. Merci Alain pour les re-lectures de mon article et tes conseils. Merci Didier pour tes remarques pertinentes à chaque présentation. En plus des conseils en comité, je remercie spécialement Adrian pour sa formation en métabolomique, pour être là pour répondre aux les questions et pour aider mes stagiaires.*



*A Agrocampus, je voudrais remercier notre petite équipe « Potato team », Viviane, Pauline Clin et Cécile pour les échanges et leurs encouragements tout au long de la thèse. Merci également à toutes les personnes de l'UP ESP. Merci Ingrid pour ta bonne humeur et, ton efficacité pour les dossier l'administratifs. Merci Christophe et Dominique Barloy pour vos conseils et vos encouragements. Je remercie Nikki pour les corrections de l'anglais des articles et des résumés de congrès. A l'INRA, Le Rheu, je voudrais remercier l'équipe Mildiou, en particulier, Roseline, Romain, Claudine pour leurs aides techniques. Un remerciement spécial à Sophie Collet pour son efficacité impressionnante pour la résolution des soucis administratifs.*

*A Saint Malo, merci à toute l'équipe du laboratoire de Nutrition Végétale pour l'aide technique et les sorties hors-travail. Je remercie Adrian, Damien, Justine, Sybille, Sandrine, Allan, Bastien, Larissa, Marina, Nusrat, Laura, Noemi, Anne pour votre support. Merci également aux chefs projets qui m'ont encouragée à chaque opportunité.*

*Je tiens à remercier les différents partenaires de cette thèse. Tout d'abord le laboratoire Glyco-MEV, spécialement Maïté Vicré pour l'organisation du stages M2 en partenariat. Je remercie également l'équipe de l'Université de Rouen pour le soutien technique pour la réalisation du stage, principalement Bruno Gugi qui a été énormément présent pour l'analyse des données, merci pour ta rigueur scientifique et ta disponibilité. Merci également à l'équipe de la Plateforme GEH de Université de Rennes 1, pour son efficacité et son écoute pour la résolution de toutes les contraintes.*

*Ce projet de thèse a été fait à plusieurs mains donc je voudrais remercier les stagiaires, Steven Burlot qui m'a beaucoup aidé au démarrage de la thèse, pour les longues journées pour réaliser la base de données des métabolites. Merci Pauline Le Boulch pour ta motivation, curiosité et rigueur scientifique pendant ton stage de M2. Je remercie également Thibaud Legros pour sa motivation et pour son autonomie pour amener son projet à la phase finale de cette thèse. Je voudrais remercier Pauline Clin, l'ingénieur d'étude, que nous a apporté énormément avec sa vision extérieure sur l'immunité végétale et sa motivation dans la rédaction de l'article.*

*Merci beaucoup aux doctorants qui ont allégé la pression d'être en thèse et pour partager les bons et mauvaises moments. A notre bureau « Total Spices », merci Cécile pour me former, pour tes conseils, ton écoute. Merci pour la construction de cette amitié qui sera maintenue même à grandes distances., au Brésil, à Boston, en l'Alsace... Merci Agathe pour l'écoute, pour les sorties à la plage, pour faire partie d'équipe de choc. A toutes les deux et en plus à Estelle et Corentin ainsi que Gérôme (presque un doctorant avec tous les conversations de science dans les sorties), je vous remercie pour le bon humour, pour les soirées (et pause du midi) jeux, pour me permettre de me sentir que j'étais au bon endroit. Je voudrais remercier les autres doctorants Julien, Camille, Aude, Morgane, Romain et Benjamin pour les sorties et discussions.*



*A ma famille de cœur franco/brésilienne à Rennes et à Saint Malo, je voudrais vous remercier pour amener un peu de chaleur tropical à ma vie en France, pour m'accueillir comme la « caçula » et me faire sentir chez moi. Merci donc à Lari et Smail, Mari et Benoît, Fer et Nico, Geamylle et Matthieu. Merci aussi à Nina, Gabriel et Samuel, les vraies « caçulas » de cette famille. A Rennes, je voudrais remercier mon amie Ana Beatriz et son mari, François, presque mes voisins, pour le support et les sorties.*

*Je me permets d'écrire les prochains remerciements en portugais pour parler à des personnes spéciales au Brésil :*

*Gostaria de agradecer a minha família que ficou ao meu lado me apoiando e me dando força ao longo de todos esses anos fora de casa. Foram muitas ligações para comemorar as mini conquistas. Este agradecimento vai especialmente aos meus pais, Graça e David, por me ensinarem a ser independente e serem meus portos seguros. As minhas irmãs, Gabriela e Isabela, obrigada pela troca de experiências e de me fazerem me sentir em casa nas conversas online, mesmo com um oceano de separação. Gabi, agradeço muito pela ajuda na formatação do meu manuscrito final e por estar sempre disponível para mim. Um agradecimento especial para minha avó, Manira, aos meus padrinhos Suzeine e Julio e ao meu primo Guilherme, pela torcida e por velarem pelo meu bem-estar. Gostaria de agradecer também ao meu avô, que hoje olha por mim lá do céu, que apesar das poucas palavras, estava sempre ao nosso lado.*

*Gostaria de agradecer a minha melhor amiga, Nathália, que até hoje consegue compartilhar os perrengues da vida. Obrigada pelas conversas de todos os assuntos. Além disso, durante o período da tese pudemos compartilhar duas viagens especiais.*

*Não poderia deixar de agradecer ao Allan, meu namorado, que durante esses quatro anos me ensinou ver o lado positivo de tudo, de estar comigo TODOS os dias e de compartilhar as belas paisagens francesas nas férias.*





# SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>1</b>
I. Contexte général.....	1
II. Immunité des plantes : Focus sur la PAMP-Triggered Immunity - PTI .....	3
1. Perception et Reconnaissance.....	4
1.1 Les agents pathogènes : PAMPs et MAMPs .....	4
1.2 Les DAMPs .....	6
2. Signalisation .....	8
2.1 Réactions précoces : flux de Ca <sup>2+</sup> .....	8
2.2 Production de l'oxyde nitrique (NO) et des ROS .....	9
2.3 « Mitogen Activated Protein Kinases » (MAPKs) .....	11
2.4 Facteurs de transcription.....	12
2.5 Signalisation hormonale .....	12
III. Produits de défenses .....	17
1. Les protéines « Pathogenesis-Related » (PRs) .....	17
2. Les métabolites.....	18
2.1 Les phénylpropanoïdes .....	19
2.2 Les terpenoïdes .....	24
2.3 Les alcaloïdes.....	27
IV. Mobilisation de la PTI en protection des plantes .....	31
1. Eliciteurs des agents pathogènes .....	31
2. Eliciteurs synthétiques.....	32
3. Eliciteurs naturels : Plantes et Algues .....	34
4. Les éliciteurs homologués ou stimulateurs de défense des plantes .....	36
V. PTI et Pomme de Terre .....	38
1. Modèle d'étude : la pomme de terre.....	38
1.1 Physiologie et développement .....	38
1.2 Importance agronomique et limite de la culture .....	39
1.3 Méthodes de lutte.....	40
2. Etat des connaissances sur la PTI chez la pomme de terre.....	41
<b>Hypothèse et objectif du projet de thèse .....</b>	<b>45</b>
 <b>CHOIX STRATEGIQUES ET MATERIELS &amp; METHODES .....</b>	<b>46</b>
I. Choix des géotypes de pomme de terre.....	46
II. Choix des éliciteurs .....	46
III. Choix des méthodes d'analyses.....	48
1. Métabolomique non ciblée .....	48
2. Analyse des transcrits .....	49



IV.	Les plantes et les éliciteurs : Protocole expérimental.....	50
1.	Les plantes.....	50
2.	Les éliciteurs.....	50
3.	Protocole expérimental.....	51
V.	Analyses métabolomiques.....	52
1.	Analyses non-ciblées.....	52
1.1	Traitements des données métabolomiques non-ciblées.....	53
1.2	Base de données de métabolites des plantes.....	54
2.	Analyses ciblées.....	55
2.1	Prélèvement à 48h (Essai 2017).....	55
2.2	Cinétique (Essai 2019).....	56
3.	Analyses transcriptomiques.....	58
3.1	Extraction des ARNs et production des ADNc.....	58
3.2	Design d'amorces.....	59
3.3	Analyses haut-débit.....	60
3.4	Analyse des données transcriptomiques.....	60
4.	Analyses statistiques.....	61

## **RESULTATS ..... 63**

### **CHAPITRE I : Analyse comparative du métabolome chez deux génotypes de pomme de terre après application des éliciteurs**

I.	Introduction.....	63
II.	Résultats.....	64
1.	Effet « éliciteurs ».....	64
1.1	Quel que soit le génotype, les éliciteurs induisent des profils métaboliques_différents.....	64
2.	Effet éliciteur chez Désirée : Elicitor-specific reprogramming of potato's metabolome during the PTI (Article: Metabolomics).....	66
2.1	Complément de résultats : L'effet éliciteur est confirmé sur le génotype Bintje.....	107
3.	Effet génotype.....	110
3.1	L'étude globale de l'interaction entre génotypes et éliciteurs met en évidence un effet fort du génotype.....	110
3.2	Les plantes non traitées présentent une différence dans l'abondance des métabolites.....	111
3.3	Quel que soit le génotype, le comportement des éliciteurs est le même.....	112
III.	Discussion.....	113
1.	Influence du génotype sur le métabolome de la pomme de terre.....	113
2.	Reprogrammation du métabolome de la pomme de terre par les éliciteurs de différente origine chez Désirée et Bintje.....	114



Annexe I : Extraits d' <i>Ulva</i> - Effets dose et formulant.....	116
Annexe I : Bintje et Désirée - Effet du génotype .....	117

**CHAPITRE II : Mécanismes d'activation de la défense par le CCF, le BABA et l'extrait d'*Ulva*. Réponses ciblées : hormones, gènes et métabolites**

I.	Introduction .....	119
1.	Question 1 : Est-ce qu'une régulation différentielle des phytohormones et des transcrits conditionne les profils métaboliques spécifiques obtenus après traitement par les éliciteurs ?.....	120
1.1	Stratégie - Matériel et Méthode .....	120
1.2	Résultats : Rôle du métabolisme secondaire dans les réponses de défense après élévation .....	121
1.3	Cas du génotype Bintje.....	143
2.	Question 2 : Est-ce que les éliciteurs induisent des ROS et des modifications de la paroi végétale ?.....	146
2.1	Stratégie et Matériel et Méthodes .....	146
2.2	Résultats préliminaires: Le traitement BABA et principalement le traitement CCF induisent la production de ROS.....	147

**CHAPITRE III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs**

I.	Introduction .....	149
II.	Stratégie et Matériel et Méthodes.....	149
III.	Résultats .....	151
1.	Article : The dynamics of defence induction depend on the elicitors .....	151
2.	Complément à l'article : L'effet « origine des éliciteurs » est plus fort que l'effet « cinétique » dans l'induction de transcrits .....	167

**DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ..... 168**

I.	Apports cognitifs de notre étude pour la PTI chez la pomme de terre .....	171
II.	Apports de l'étude à la protection des plantes.....	174

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

<b>4CL</b> : 4-coumarate: CoA ligase	<b>CERK1</b> : Chitin elicitor receptor kinase 1
<b>4-HPAA</b> : 4-hydroxyphénylacétaldéhyde	<b>cGMP</b> : Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate
<b>4'OMT</b> : 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase	<b>CHI</b> : Chalcone isomerase
<b>6OMT</b> : 6-O-methyltransferase	<b>CHS</b> : Chalcone synthase
<b>AACT</b> : Acetoacetyl-CoA thiolase	<b>CK</b> : Cytokinines
<b>ACC</b> : 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique	<b>CNGC</b> : Cyclic nucleotide gated channel
<b>ACCO</b> : ACC oxydase	<b>CNMT</b> : Coclaurine N-methyltransferase
<b>ACP ou PCA</b> : Analyse en Composante Principale	<b>COI1</b> : Coronatine-insensitive 1
<b>ANS</b> : Anthocyanidin synthase	<b>DAMP</b> : Damage-Associated Molecular Pattern
<b>AOC</b> : Allene oxide cyclase	<b>DFR</b> : Dihydroflavonol 4-reductase
<b>AOS</b> : Allene oxide synthase	<b>DHJA</b> : Acide dihydrojasmonique
<b>APX</b> : Ascorbate peroxydase	<b>DMAPP</b> : Allylic isomer dimethylallyl diphosphate
<b>ARR2</b> : Arabidopsis response regulator	<b>DXP</b> : 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate
<b>AspRS</b> : Aspartyl-tRNA synthétase	<b>DXS</b> : DXP synthase
<b>BABA</b> : Acide $\beta$ -aminobutyrique	<b>EFR</b> : LRR-RLK Ef-TU receptor
<b>BAK1</b> : Brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1	<b>EIN</b> : Ethylene insensitive
<b>BIA</b> : Benzylisoquinoléine alcaloïdes	<b>ELR</b> : Elicitin response
<b>BRs</b> : Brassinostéroïdes	<b>ERF</b> : Ethylene response factor
<b>BTH</b> : Benzothiadiazole	<b>ESI-</b> : Electrospray ion source négatif
<b>C3'H</b> : P-coumaroyl shikimate 3'hydroxylase	<b>ESI+</b> : Electrospray ion source positif
<b>C4H</b> : Cinnamic acid 4-hydroxylase	<b>Et</b> : Ethylène
<b>CAD</b> : Cinnamyl alcohol dehydrogenase	<b>ETI</b> : Effector-triggered immunity
<b>CalS</b> : Callose synthase	<b>ETS</b> : Effector-triggered susceptibility
<b>CaM</b> : Calmoduline	<b>F3'H</b> : Flavonone 3'-hydroxylase
<b>cAMP</b> : Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate	<b>FC</b> : Fold change
<b>CAT</b> : Catalase	<b>FGT</b> : Flavonoid glycosyltransferase
<b>CCF</b> : Concentred Culture Filtrate	<b>FHT</b> : Flavanone 3-hydroxylase
<b>CCR</b> : Cinnamoyl-CoA reductase	<b>GAP</b> : Glyceraldehyde-3-phosphate
<b>CDPKs</b> : Calcium-dependent protein kinases	<b>GPX</b> : Glutathione peroxidase
	<b>GSNO</b> : S-nitrosoglutathione





**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HCA** : Hierarchical cluster analysis

**HCAA** : Acides hydroxycinnamiques

**HMGR** : S-3-hydroxy-3-methylglutaryl réductase

**HO<sub>2</sub>** : Radical hydroperoxyde

**HR** : Réaction d'hypersensibilité

**IAA** : Acide indole-3-acétique

**ICS** : Isochorismate synthase

**IFS** : Isoflavone synthase

**INF** : Elicitins

**IPL** : Isochorismate pyruvate lyase

**IPP** : Isopentenyl diphosphate

**JA** : Acide jasmonate

**JA-Ile** : Jasmonoyl-isoleucine

**JAR1** : JA amido synthetase 1

**JAZ** : JA ZIM domain

**LM** : Matériel lyophilisé

**LOX** : Lipoxygénase

**LPS** : Lipopolysaccharides

**LRR-RK** : Leucine-rich repeat receptor kinase

**LRR-RLK** : Leucine-rich repeat receptor kinase-like

**ML** ou **LM** : Matériel lyophilisé ou Lyophilized material

**MAMP** : Microbe-Associated Molecular Patterns

**MAPKs** : Mitogen Activated Protein Kinases

**MeJA** : Méthyl jasmonate

**MEKKs** : MAPK kinase kinase

**MEP** : Méthyle-erythritol phosphate

**MIA** : Monoterpènes indole alcaloïdes

**MVA** : Mévalonique

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**NB-LRR** : Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat

**NCS** : Norcochlorine synthase

**NI** : Non-traitée

**NO** : Oxyde nitrique

**NOXs** : NADPH oxydase

**NPR1** : Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes 1

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Superoxyde

**OGs** : Oligogalacturonides

**OH** : Radical hydroxyle

**ONOO<sup>-</sup>** : Peroxynitrite

**OPDA** : Acide 12-oxophytodiénoïque

**OPR** : Acide 2-oxophytodiénoïque réductase

**PAL** : Phenylalanine ammonium lyase

**PAMPs** : Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PDF1.2** : Plant defensin 1.2

**PEPs** : Plant elicitor peptides

**PIPs** : PAMP-induced peptides

**PR** : Pathogenesis-Related proteins

**PRRs** : Pattern-recognition receptors

**PTI** : PAMP-triggered immunity

**ROS** : Reactive oxygen species

**SA** : Acide salicylique

**SAM** : S-adénosyl méthionine

**SDP** : Stimulateurs de défenses des plantes

**SGT** : Sterol alkaloid glycosyltransferase

**SS1** : Squalene synthase 1

**STS** : Stilbène synthases

**WAK1** : Wall-associated kinase 1



# AVANT-PROPOS

---

Ma thèse de doctorat intitulée « Induction de la PAMP-Triggered Immunity par des éliciteurs d'origine différente chez *Solanum tuberosum* » est financée par l'Association Nationale de Recherche et Technologie (ANRT) dans le cadre d'un projet CIFRE entre le Groupe Roullier et l'UMR IGEPP (Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes) - AGROCAMPUS OUEST – INRA-Université de Rennes I. Ce projet s'est déroulé sur trois sites : AGROCAMPUS-OUEST, Rennes ; INRA, Le Rheu dans l'équipe Résistance et Adaptation ; et le Centre Mondiale de l'Innovation Roullier à Saint Malo.

Le Groupe ROULLIER, expert de la nutrition végétale, animale et humaine a pour activités, la production industrielle et la commercialisation de fertilisants minéraux et organiques à haute valeur ajoutée. La Recherche et le Développement du groupe Roullier porte sur la nutrition des plantes, l'amélioration de la physiologie de la plante (biostimulation) et le développement de solutions alternatives de protection des plantes (biocontrôle). Les équipes de recherche du groupe ont, en particulier, identifié des extraits végétaux d'origine marine (*Ulva* spp.) présentant des propriétés intéressantes de protection des plantes.

En parallèle, l'INRA au sein de l'UMR IGEPP a des compétences reconnues dans le développement d'outils aidant à la mise en place d'une agriculture raisonnée, en particulier pour la gestion de variétés de pommes de terre résistantes à *Phytophthora infestans*, agent du mildiou et dans l'induction de ces résistances.

Dans ce contexte, l'objectif du projet de thèse est d'apporter des éléments pour mieux comprendre l'immunité induite chez la pomme de terre se traduisant par la production *in planta* de métabolites antimicrobiens actifs contre les agents pathogènes. Dans ce but, nous avons centré notre étude sur les réponses induites au cours des interactions entre deux génotypes de pomme de terre et trois éliciteurs. La compréhension des mécanismes mis en jeu devrait permettre à terme de mieux évaluer le potentiel de protection de la pomme de terre par ces éliciteurs.



Mon manuscrit est organisé en cinq parties :

- 1) **Introduction bibliographique** présentant le contexte général de ce projet, les concepts associés à la PAMP-Triggered Immunity, les mode d'action des éliciteurs et le modèle d'étude, la pomme de terre ;
- 2) **Choix stratégique** des géotypes de pomme de terre, des éliciteurs et des méthodes d'analyse choisies pour l'étude ;
- 3) **Matériels et Méthodes** utilisés pour les expérimentations ;
- 4) **Résultats** : ils sont présentés en trois chapitres dans lesquels les résultats majeurs sont écrits sous forme de publication
  - a. *Chapitre I : Analyse comparative du métabolome chez deux géotypes de la pomme de terre après application des éliciteurs ;*
  - b. *Chapitre II : Mécanismes d'activation de la défense par le CCF, le BABA et l'extrait d'Ulva. Réponses ciblées : hormones, gènes et métabolites ;*
  - c. *Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs*
- 5) **Discussion générale et perspectives**



**INTRODUCTION  
BIBLIOGRAPHIQUE**





### I. Contexte général

Les productions animale et végétale pour l'alimentation augmentent chaque année proportionnellement à l'augmentation de la population mondiale. Les chercheurs estiment que la production mondiale doit augmenter de 70 à 100% pour nourrir les 9,7 milliards de personnes en 2050 (McKenzie and Williams, 2015). Le challenge pour l'agriculture d'aujourd'hui est donc (i) de produire plus, mais les zones de production et la disponibilité en eau sont limitées et (ii) de produire mieux et plus durablement en réduisant l'utilisation des fertilisants et des pesticides (Beddington, 2010). En effet, depuis la Révolution Verte, un certain nombre de ces molécules dangereuses pour l'Homme et l'environnement a été massivement utilisé en culture pour lutter contre les différents bioagresseurs afin d'augmenter les rendements. Les conséquences de cette utilisation sont mesurées seulement maintenant. De plus, malgré les traitements, les bioagresseurs sont encore responsables de 20 à 40 % de perte de rendement (Savary *et al.*, 2012). C'est le cas, par exemple, pour les cultures de riz et de pomme de terre pour lesquelles ces pertes ont été estimées entre 30 et 40% (Oerke, 2006)

En France, pour corriger les problèmes causés par ces pesticides, a été mis en place le Plan Eco Phyto II+ qui impose la réduction des produits phytopharmaceutiques de 50% d'ici 2025 (alim'agri, 2019a). La diminution des intrants et produits phytosanitaires passe donc par la recherche de méthodes alternatives comme l'utilisation de variétés résistantes, le changement dans les itinéraires techniques ou encore par le développement et l'utilisation de méthodes de biocontrôle. Celui-ci a été défini par le ministère français de l'agriculture et l'alimentation de la façon suivante (alim'agri, 2019b) :

*« Le biocontrôle est un ensemble de méthodes de protection des végétaux basées sur l'utilisation de mécanismes naturels. Seules ou associées à d'autres moyens de protection des plantes, ces techniques sont fondées sur les mécanismes et interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel. Ainsi, le principe du biocontrôle repose sur la gestion des équilibres des populations d'agresseurs plutôt que sur leur éradication. »*

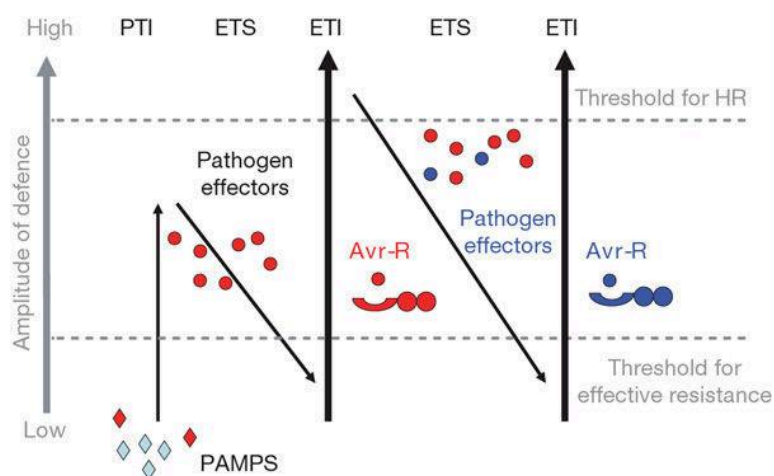
Les méthodes de biocontrôle incluent l'utilisation de (i) macro-organismes et micro-organismes auxiliaires pour protéger les cultures contre les ravageurs et les maladies ; (ii) médiateurs chimiques e.g. les phéromones d'insectes utilisées pour le piégeage et les méthodes



de confusion sexuelle ; et (iii) des substances naturelles qui stimulent les défenses des plantes (SDP) (alim'agri, 2019b).

Les SDP visent à augmenter la résistance naturelle de la plante en « boostant » ses défenses (Benhamou and Rey, 2012), contrairement aux autres méthodes de biocontrôle qui ciblent directement les bio-agresseurs. Quand l'induction de ces défenses conduit à une efficacité au champ, on parle alors de **résistance induite**. Cependant, à l'heure actuelle, peu de SDPs sont homologués car si la stimulation des défenses des plantes montre souvent une bonne efficacité en laboratoire, ce n'est pas toujours le cas en condition de plein champ où les résultats sont souvent limités. Plusieurs paramètres peuvent influencer cette absence d'effet au champ : les stress abiotiques (sécheresse, vent, chaleur...), la plante elle-même (génotypes, âge de la plante), l'origine des produits utilisés.

Le principe d'action des stimulateurs de défense ou encore des éliciteurs est donc d'induire le système immunitaire innée des plantes pour activer des réponses de défense qui conduiront à la diminution des symptômes dus aux agents pathogènes. Les concepts et mécanismes contribuant à l'induction du système immunitaire végétal font l'objet d'un approfondissement dans la synthèse bibliographique présentée ci-dessous.



**Figure 1. Modèle de coévolution en Zig-zag illustrant les stratégies mises en place par la plante et par l'agent pathogène au cours de l'évolution. (Jones and Dangl, 2006)**

Ce schéma représente les quatre phases de l'immunité végétale. 1- La plante perçoit les PAMPs par des récepteurs, comme les PRRs et les réactions de défense de la PTI sont déclenchées. 2-Le pathogène secrète les effecteurs pour réprimer la PTI. Cette phase est l'ETS. 3-Au cours de l'évolution, les plantes se sont adaptées et elles peuvent reconnaître ces effecteurs par un récepteur codé par un gène R, c'est la phase de l'ETI. 4-Les agents pathogènes peuvent contourner les défenses de la plante qui de résistante devient sensible à l'attaque du pathogène. La phase ETI est supprimée et une nouvelle phase ETS est déclenchée.

## II. Immunité des plantes : Focus sur la PAMP-Triggered Immunity - PTI

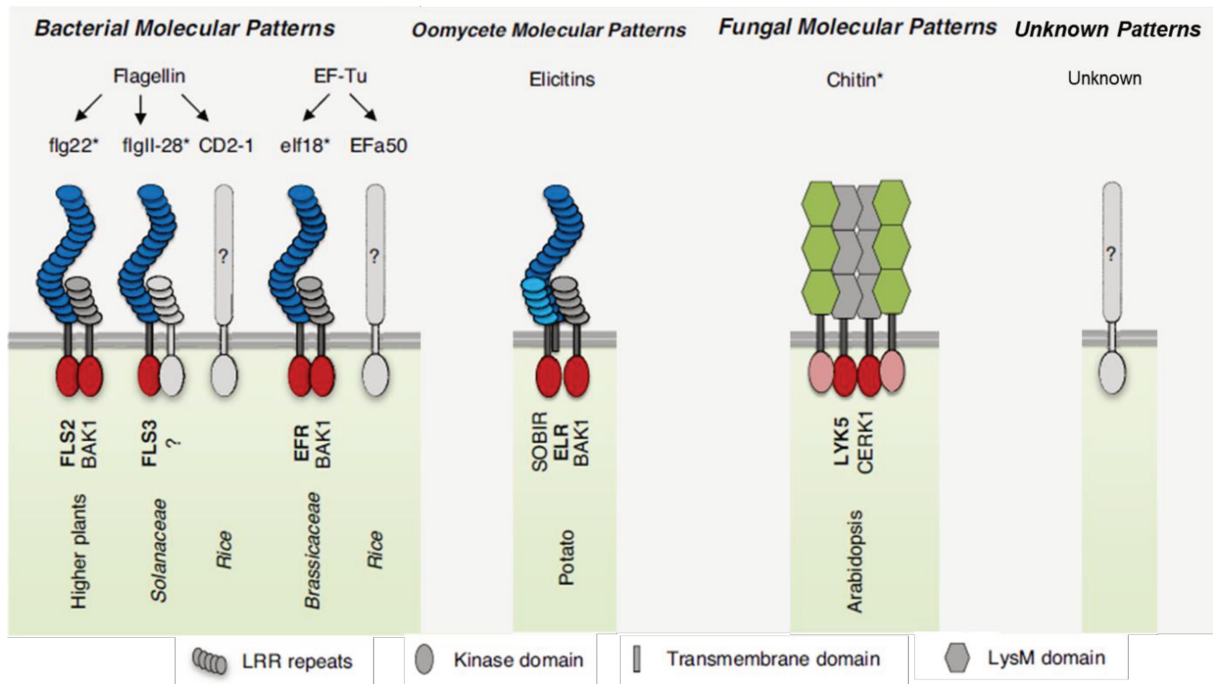
Les plantes sont constamment soumises à des contraintes abiotiques et biotiques. De ce fait, pour continuer à se développer, elles ont au cours de l'évolution déployé un certain nombre de stratégies indispensables à leur survie. Outre leurs capacité constitutive et génétique intrinsèque de résistance, les plantes ont développé un arsenal de défenses potentielles contre différents types de bioagresseurs, comme les champignons, les oomycètes, les bactéries, les insectes et les nématodes. Le développement de la résistance des plantes contre les agents pathogènes est donc en constante évolution. En effet, les agents pathogènes ont mis en œuvre des stratégies pour contourner ces défenses nécessitant de nouvelles adaptations de la plante. La mise en place, au cours du temps, de ces stratégies, élimination de l'agresseur ou contournement des défenses par les deux protagonistes, a été bien définie par le modèle de coévolution proposé par Jones and Dangl (2006) (Figure 1).

La première phase décrite dans ce modèle est la « Pathogen-Associated Molecular Patterns-Triggered Immunity » (PTI) au cours de laquelle la reconnaissance par la plante d'un (PAMPs), molécule conservée de l'agent pathogène induit une cascade de réactions conduisant aux réponses de défense.

L'échappement ou le contournement de ces défenses par l'agent pathogène amène à la phase d'« Effector-Triggered Susceptibility » (ETS) où la production des effecteurs par le pathogène interfère avec les défenses induites dans la PTI.

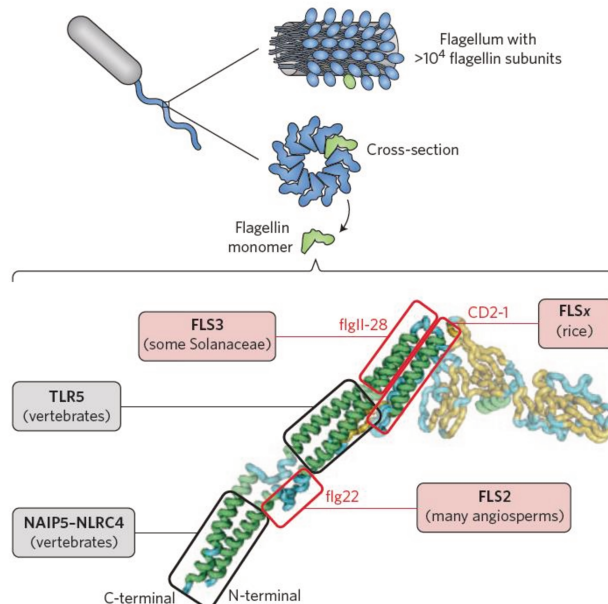
Au cours de l'évolution, la plante pourra reconnaître ces nouveaux effecteurs *via* le développement de récepteurs très spécifiques ou « Nucleotide Binding et Leucine Rich Repeat » (NB-LRR). Cette reconnaissance conduit à une réaction d'hypersensibilité (HR) chez la plante. Cette phase est appelée « Effector-Triggered Immunity » (ETI) et correspond à la relation gène pour gène décrit par Flor (1971). Parallèlement à la réaction HR, l'ETI se traduit par une induction plus rapide et plus forte des réponses de défenses que celles induites au cours de la PTI (Katagiri and Tsuda, 2010).

L'ETI a été associée à la résistance majeure des plantes portée par un ou plusieurs gènes de résistance « R » alors que la PTI est le plus souvent associée à la résistance quantitative des plantes (Boller and Felix, 2009). La PTI et l'ETI conduisent donc à déclencher, par une cascade de réactions, la production de molécules qui empêchent le bioagresseur d'employer ses propres molécules d'attaque.



**Figure 2. Récepteurs transmembranaires PRR de différentes origines de PAMPs. Schéma adapté de la publication de Ranf (2017)**

Ce schéma présente les récepteurs connus aux PAMPs des bactéries, des oomycètes et des champignons. Un certain nombre de récepteurs impliqués dans les interactions ne sont pas encore identifiés (Zipfel, 2008).



**Figure 3. Différents épitopes de la flagelline des bactéries potentiellement reconnus par les plantes et les vertébrés. Schéma présenté dans l'article Fliegmann et Felix (2016)**

Ces épitopes sont reconnus par des récepteurs PRRs. De nouveaux récepteurs sont trouvés pour les épitopes FLS3 (chez la tomate) et FLSx (chez le riz), en plus du récepteur classiquement étudié, le FLS2 (les carrés rouges). Les récepteurs des vertébrés PRRs ciblent d'autres épitopes de la flagelline (les carrés gris).

Dans cette course aux armements, l'ETI est considérée comme plus facilement contournable par les agents pathogènes et le déploiement au champs de résistance quantitative associée à la PTI est de plus en plus développé.

Dans ce contexte, il est fondamental de mieux comprendre les mécanismes d'activation du système immunitaire au sein de la **PTI**. Le potentiel de défense de la plante contre les agents pathogènes est donc décrit dans la revue bibliographique. L'activation de la PTI nécessite plusieurs étapes importantes pour aboutir à la production des molécules de défense. Elle commence par la **perception et la reconnaissance** de l'agent pathogène conduisant le déclenchement de **réactions précoces** pour empêcher ou limiter l'entrée de l'agent pathogène. Puis, ces étapes produisent un **signal** pour **l'activation des transcrits** au sein du nucleus de la plante, activation qui conduira finalement à la traduction des **protéines** et des **métabolites de défense**. Chaque étape sera détaillée ci-dessous.

## 1. Perception et Reconnaissance

### 1.1 Les agents pathogènes : PAMPs et MAMPs

La perception des **agents pathogènes** se passe à la surface de la cellule végétale par des récepteurs spécifiques à certaines molécules conservées de l'agent pathogène comme les PAMPs ou les « Microbe-Associated Molecular Patterns » (MAMPs).

La reconnaissance de ces molécules peut se faire par des récepteurs transmembranaires, les « Pattern Recognition Receptors » (PRR) (Figure 2). Les PRRs sont souvent constitués d'un domaine extracellulaire ou « Leucine-Rich Repeat » (LRR) et d'un domaine kinase intracellulaire (RK). Il y a deux classes de récepteurs dans les PRR, les récepteurs kinases transmembranaires (LRR-RK) et les récepteurs protéiques transmembranaires-like (LRR-RLK) (Dodds and Rathjen, 2010). Cette reconnaissance spécifique conduit à la mise en place des défenses générales de la plante pour empêcher l'évolution de la maladie.

Les patterns reconnus par ces récepteurs sont des composants essentiels à la survie de l'organisme. Ils sont d'origine protéique ou lipidique; ce sont aussi potentiellement des carbohydrates ou des petites molécules comme l'ATP (Dodds and Rathjen, 2010). Au sein des bactéries, le PAMP le plus étudié est la **flagelline** dont l'épitope du peptide synthétique de 22-acides-aminés (flg 22) (Figure 3) est reconnu par le récepteur LRR-RLK FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) (Zipfel, 2008) avec le corécepteur BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1).



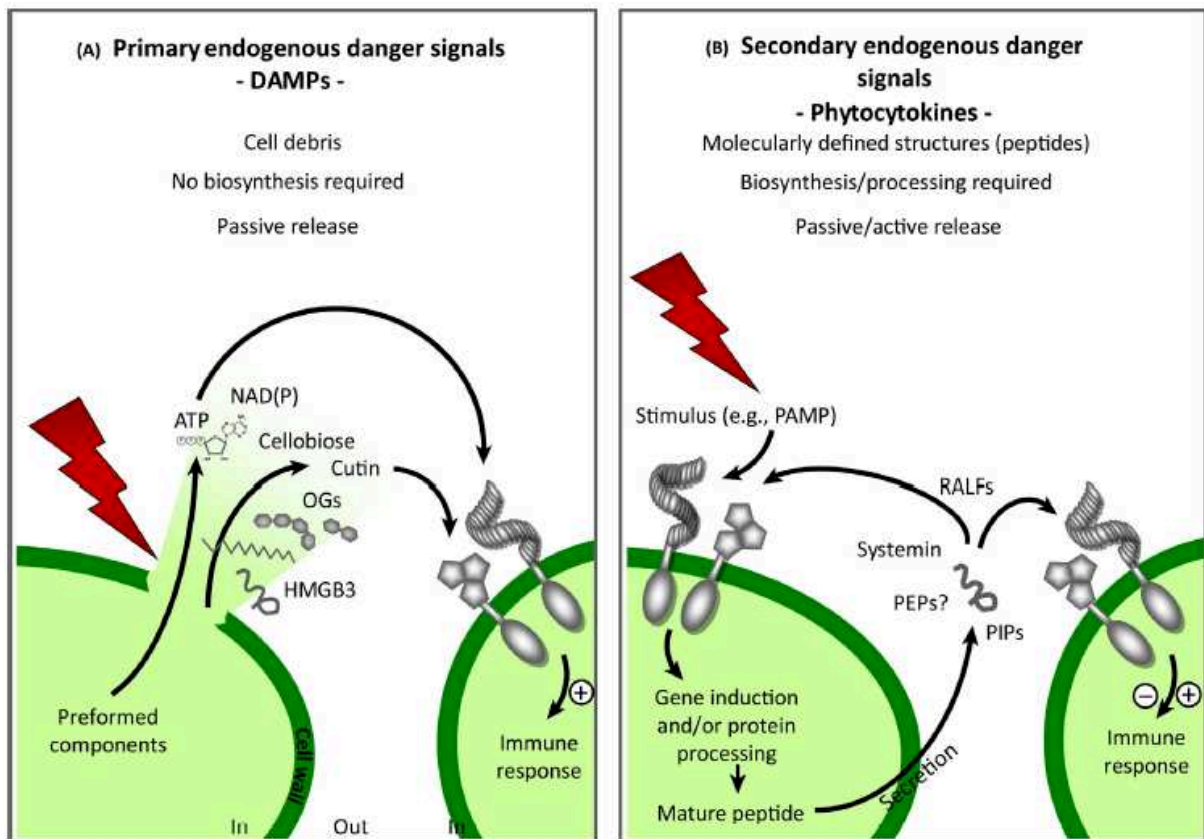


La protéine BAK1 est de la famille des « Somatic Embryogenesis Receptor Kinase » et la seule de cette famille à avoir un rôle dans la signalisation de la défense (Dodds and Rathjen, 2010). Ces récepteurs ont été identifiés par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* (Chinchilla *et al.*, 2006) et chez la tomate (Robatzek *et al.*, 2007). Les plantes d'*Arabidopsis* avec une mutation du gène *fls2* deviennent plus sensibles à l'agent pathogène *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Zipfel *et al.*, 2004). Ceci montre l'importance de la spécificité de la reconnaissance des PAMPs.

Le déclenchement de la défense peut être plus complexe. En effet, la flagelline des bactéries, par exemple, peut avoir différents épitopes reconnus par les plantes simultanément. Sur la tomate, un autre épitope de la flagelline, le flgII-28, est reconnu par un nouveau récepteur, le FLS3 (Hind *et al.*, 2016) (Figure 3). Comme décrit précédemment, la tomate possède le récepteur FLS2. De plus, d'autres espèces comme le riz sont capables de reconnaître d'autres épitopes de la flagelline comme le CD2-1, dont, le récepteur est encore inconnu (Katsuragi *et al.*, 2015). Cette découverte pose la question de savoir si la double reconnaissance augmente la réactivité des plantes et/ou si la plante a trouvé, au cours de l'évolution, des moyens pour reconnaître le pathogène par un autre PAMP (Fliegmann and Felix, 2016).

Le **facteur d'élongation-Tu** (Peptide N-acétylé de 18-acides-aminés - elf18) des bactéries est également un PAMP dont le récepteur a aussi été identifié chez les *Brassicaceae*. Il s'agit du récepteur LRR-RLK EF-TU RECEPTOR (EFR) avec le corécepteur BAK1 (Zipfel *et al.*, 2006) (Figure 2). Chez le riz, c'est l'épitope EFa50 qui est reconnu, par contre le récepteur n'est pas encore connu. Le EFa50 induit des réactions précoces comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de dépôt de callose sur la paroi végétale (Furukawa *et al.*, 2014).

Peu de récepteurs de PAMPs des oomycètes ont été identifiés, cependant récemment, le récepteur à des **élicitines**, peptides produits par l'oomycète *P. infestans*, a été identifié chez la pomme de terre (Du *et al.*, 2015). Le gène du récepteur LRR-RLK ELR (elicitin response) a été trouvé chez *Solanum microdontum*, et a été introduit chez des mutants du génotype Désirée. Les auteurs ont testé la capacité de ce récepteur à reconnaître des élicitines de *Phytophthora* spp. et de *Pythium ultimum* conduisant à une réponse hypersensible (HR). *P. infestans* a 6 gènes d'élicitines conservés dans différentes souches et le récepteur ELR reconnaît quatre de ces élicitines : INF1, INF2A, INF5 et INF6. Il reconnaît également onze élicitines décrites pour d'autres espèces de *Phytophthora* spp. Les auteurs ont également testé l'association du récepteur ELR avec le corécepteur BAK1 et cette relation est démontrée principalement pour



Trends in Plant Science

**Figure 4. Les interactions primaires et secondaires des DAMPs au sein de la plante. Schéma publié chez Gust et al. (2017)**

Les DAMPs primaires sont passivement libérés après la dégradation de la cellule par des agents pathogènes. Ces molécules sont libérées dans l'espace extracellulaire et perçues par des récepteurs d'autres cellules. Le signal secondaire est produit par la sécrétion des PEPs, PIPs et RALFs. Ces peptides sont aussi appelés phytocytokines.

INF1. Cependant, l'association entre FLS2 et BAK1 est plus forte par rapport à la relation trouvé pour ELR.

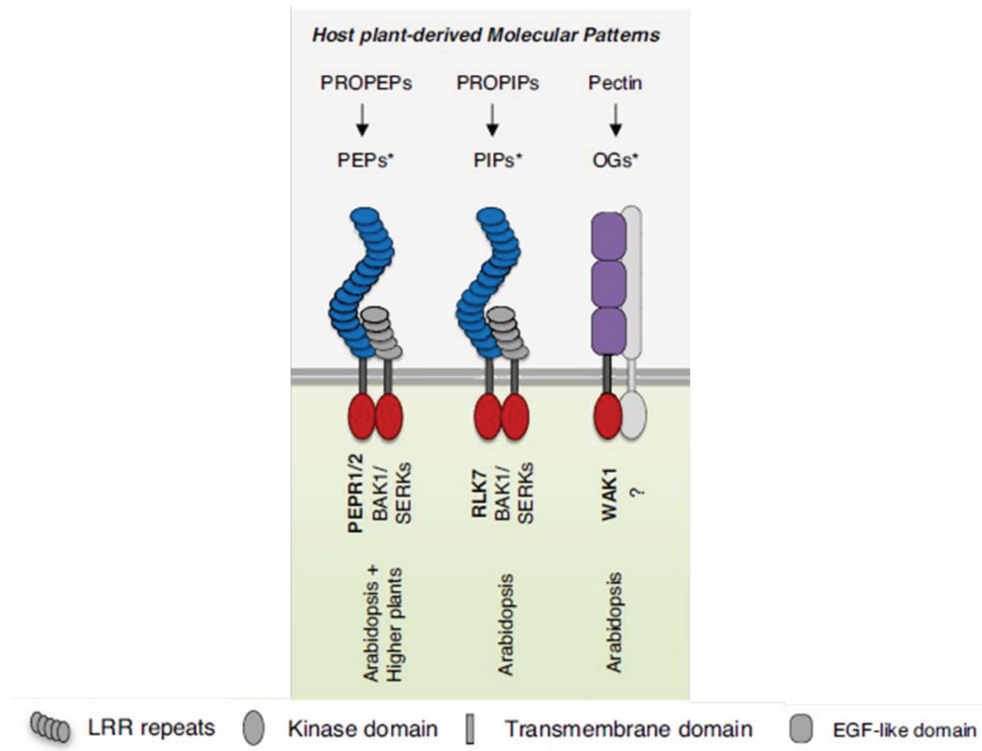
Chez les champignons, le PAMP le plus connu est la **chitine** qui est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine présent dans les cellules fongiques, mais pas dans les plantes. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé des enzymes pour dégrader la chitine des champignons et libérer ainsi de courts fragments d'oligosaccharides reconnus par la plante (Wan *et al.*, 2008). La chitine est reconnue par un domaine « lysin » (LysM). Chez les plantes d'*Arabidopsis* les récepteurs identifiés sont le LysM-RLK *AtLYK5* (LYSM-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE 5), et partialement le *AtLYK4* (Ranf, 2017). Toujours chez *Arabidopsis*, la reconnaissance de la chitine passe par un autre récepteur, le « Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 » (CERK1). Celui-ci possède des domaines transmembranaire et intracellulaire (Yin *et al.*, 2016).

### 1.2 Les DAMPs

Les plantes sont capables de reconnaître diverses molécules et pas seulement des agents pathogènes. Les molécules de la plante, comme les composants de sa paroi végétale, peuvent être perçus comme un signal d'alerte de dégradation. Ils sont alors classés comme : « Damage-Associated Molecular Patterns » (DAMPs). Les DAMPs peuvent aussi inclure des fragments de protéines extracellulaires, des peptides, des nucléotides et des acides aminés (Hou *et al.*, 2019). Deux types de DAMPs sont trouvés dans les plantes, (i) les **DAMPs primaires** ou classiques qui sont des molécules constitutives intracellulaires de la plante et qui sont libérées dans l'espace extracellulaire. (ii) Les **DAMPs secondaires** qui sont produits à l'issue d'une stimulation par des PAMPs, par exemple (Figure 4) (Gust *et al.*, 2017).

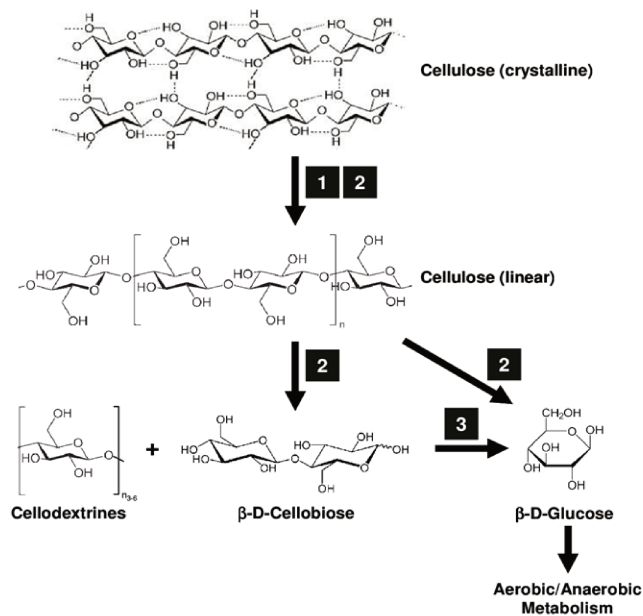
Les **DAMPs primaires** sont libérés dans l'espace intracellulaire après l'action des agents pathogènes qui cherchent à pénétrer les barrières de la plante et à assimiler des nutriments des cellules végétales. Cette action est réalisée grâce à des enzymes ou des toxines qui vont dégrader la paroi végétale (Hou *et al.*, 2019).

La première barrière de la plante est la **cuticule**, formée par des polymères insolubles constitués principalement d'acides gras hydroxy et époxy estérifiés en C16 et C18, imprégnés de cire. La dégradation de cette barrière peut produire une réaction de défense et dans certains cas comme dans le pathosystème *Arabidopsis/Botrytis cinerea*, déclencher une forte résistance contre l'agent pathogène (Serrano *et al.*, 2014). Donc, il est probable que les monomères de



**Figure 5. Récepteurs transmembranaires de différentes origines de DAMPs. Schéma adapté de la publication de Ranf (2017)**

Les récepteurs représentés reconnaissent des DAMPs primaires et secondaires. Les DAMPs primaires libérés lors d'une attaque sont nombreux et ces récepteurs sont, pour la plupart, inconnus.



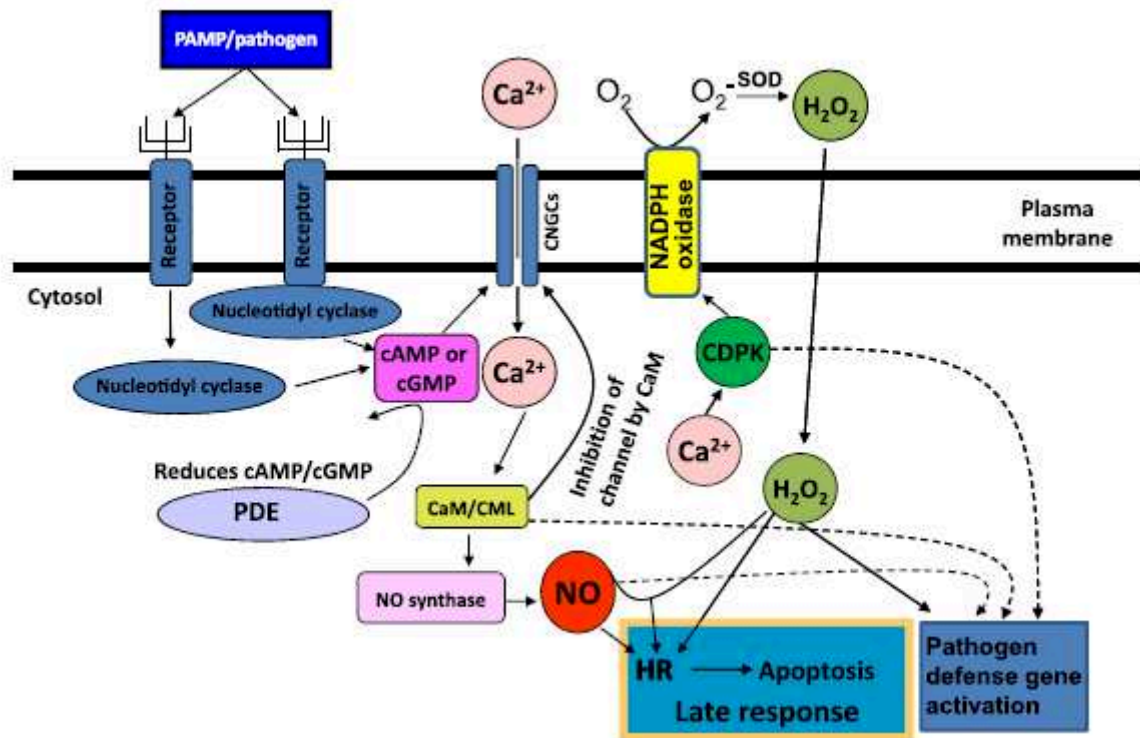
**Figure 6. Dégradation de la cellulose en cellodextrines et cellobiose. Schéma extrait de la thèse de Schellenberger (2012)**

Les groupes enzymatiques et l'étape d'hydrolyse sont indiqués par des nombres : 1, Endoglucanases (EC 3.2.1.4) ; 2, Exoglucanases, y compris les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) et la cellodextrinase (EC 3.2.1.74) ; 3, b-glucosidases (EC 3.2.1.21).

cutine, un composant de la cuticule, ou d'autres produits apparentés soient perçus par la plante, cependant, les récepteurs sont encore inconnus (Serrano *et al.*, 2014).

Au niveau de la paroi végétale, la pectine est le composant majeur. L'action des agents pathogènes conduit à l'hydrolyse de la pectine et à la formation de plusieurs polysaccharides plus petits comme les **oligogalacturonides (OGs)** (Hou *et al.*, 2019). Plus d'un récepteur est impliqué dans la perception de la pectine et des OGs, mais les OGs sont probablement perçus par le récepteur transmembranaire « WALL-ASSOCIATED KINASE 1 » (WAK1) qui possède un domaine extracellulaire « Epidermal Growth Factor » et un domaine intracellulaire RK (Ferrari *et al.*, 2013; Ranf, 2017). Ainsi, les graines d'*Arabidopsis* traitées avec OGs ont montré une activation du gène *WAK1* et sa surexpression induit une résistance contre *B. cinerea* (Ferrari *et al.*, 2013) (Figure 5). Cette réaction a été aussi observée chez les plantes de riz (Ferrari *et al.*, 2013). Cependant, il manque une validation génétique pour démontrer que WAK1 est bien le récepteur (Hou *et al.*, 2019). D'autre part, il a été montré que le « **COS-OG** », molécule issue de la combinaison entre des oligomères de chitosane (COS-PAMP) avec des OGs (DAMP) mime l'interaction entre les plantes et les agents pathogènes (van Aubel *et al.*, 2014; Clinckemaillie *et al.*, 2017; van Aubel *et al.*, 2018) et induit une protection contre les champignons *Sphaerotheca fuliginea*, chez le concombre et *Uncinula necator*, chez la vigne (van Aubel *et al.*, 2014). Il peut également induire une résistance contre *P. infestans* chez la pomme de terre via l'activation de la voie de l'acide salicylique (van Aubel *et al.*, 2018) et des gènes *PR1* et *PR2* (Clinckemaillie *et al.*, 2017).

D'autres DAMPs primaires sont connus, c'est le cas de la **cellobiose**, un polymère de la cellulose formée de chaînes de  $\beta$ -1,4-glucane, (Figure 6). Elle induit une résistance contre *P. syringae* pv *tomato* DC3000 chez les plantes d'*Arabidopsis* (de Azevedo Souza *et al.*, 2017). Cependant, les réactions produites par la cellobiose ne sont pas les mêmes que celles induites par la flg22. La cellobiose n'entraîne pas la production de burst oxydatif ni le dépôt de callose. En plus, les récepteurs PRR, LRR-BAK1 de la flg22, ne contribuent pas à sa perception. Pour l'instant, la cellobiose est démontrée comme un DAMP primaire, mais son récepteur reste inconnu. C'est le cas aussi de la **cellodextrine** chez la vigne, qui induit une réduction des symptômes de *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2007). Egalement, chez la vigne et chez *Arabidopsis*, des dérivés de l'hemicellulose, les **xyloglucanes**, induisent une résistance contre les agents pathogènes nécrotrophe *B. cinerea* et le biotrophe *Hyaloperonospora arabidopsidis* (seulement chez *Arabidopsis*) (Claverie *et al.*, 2018).



**Figure 7.** Schéma hypothétique, proposé par Ma et Berkowitz (2011), du mécanisme de réponse de défense des plantes dans la voie de transduction du signal.

La reconnaissance de l'agent pathogène déclenche les nucléotides cycliques qui vont activer les transporteurs de  $Ca^{2+}$  à l'intérieur de la cellule. Le  $Ca^{2+}$  avec le CaM peuvent interagir avec les ROS et le NO pour la production de la HR.

Les **DAMPs secondaires** sont aussi appelé phyto cytokines et leur production, sécrétion et action, sont régulées en fonction d'un signal de danger ou de détérioration cellulaire (Gust *et al.*, 2017). Ils comportent :

Les « **Plant Elicitor Peptides** » (**PEPs**) qui dérivent de l'extrémité carboxyle d'une protéine PROPEP localisée dans le cytosol, et sont libérés dans l'apoplaste pendant la dégradation cellulaire. Ils sont reconnus par deux récepteurs du type LRR-RK, PEPR1 et PEPR2. Ces récepteurs ont été identifiés chez *Arabidopsis* et un orthologue a été trouvé chez le maïs, ZmPEPR1 (Figure 5) (Hou *et al.*, 2019).

Les « **PAMP-induced peptides** » (**PIPs**) qui sont produits à partir d'une infection, d'une blessure ou d'un traitement par les PAMPs/MAMPs d'un agent pathogène. Ils sont reconnus par le récepteur RLK7, chez *Arabidopsis* (Figure 5) (Ranf, 2017). Les PEPs et les PIPs possèdent le corécepteur BAK1 localisé dans l'espace intracellulaire (Ranf, 2017).

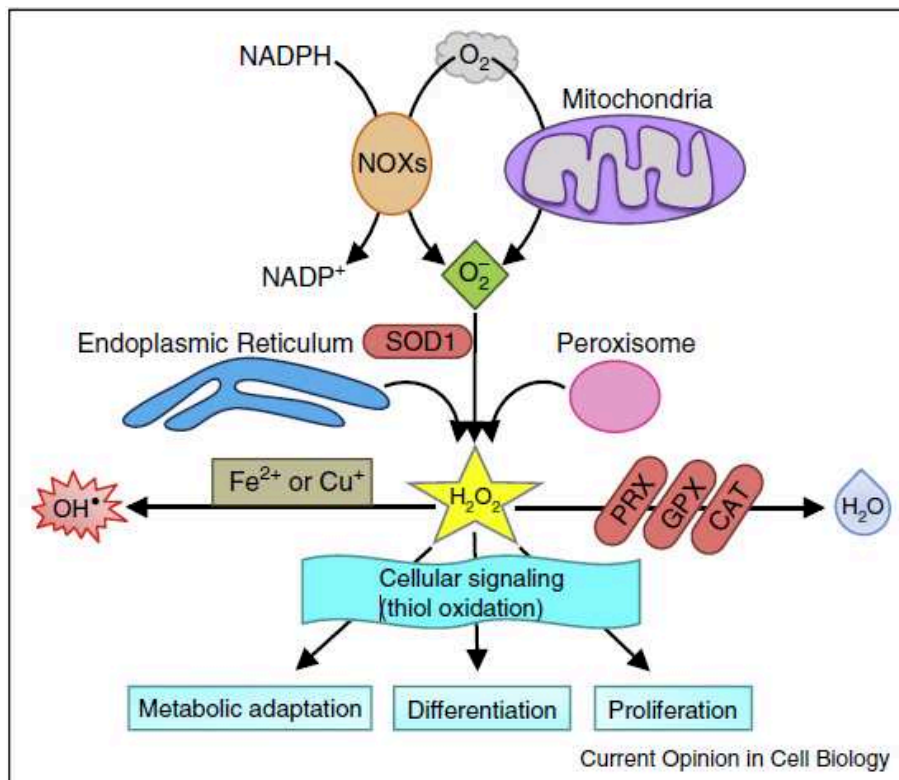
## 2. Signalisation

Après la perception des signaux de danger (e.g. PAMPs et DAMPs), une cascade de signalisation est mise en place. Elle consiste en un rapide flux d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), la synthèse d'oxyde nitrique (NO), la production de burst oxydatif ou de « Reactive Oxygen Species » (ROS), l'activation de « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAP kinases) et l'activation des phytohormones (Dodds and Rathjen, 2010). La reprogrammation de l'expression des gènes, le dépôt de callose sur des sites spécifiques pour empêcher l'entrée de l'agent pathogènes et l'éventuelle HR sont aussi des éléments de la signalisation (Dodds and Rathjen, 2010).

### 2.1 Réactions précoces : flux de $\text{Ca}^{2+}$

L'augmentation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol est une réaction précoce qui se met en place juste après l'infection de l'agent pathogène et est connue pour signaler le déclenchement des réponses de défense, comme la synthèse de NO et de ROS (Ma, 2011). La reconnaissance des molécules par les récepteurs et l'augmentation du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  sont probablement dépendants. L'amplitude des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  est déterminante pour la cascade d'activation des différents événements impliqués dans la signalisation. Ce rôle important des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  a été observé pour différents couples de PAMPs/DAMPs (e.g. flg22, Pep1) et leurs récepteurs (Figure 7) (Seybold *et al.*, 2014).





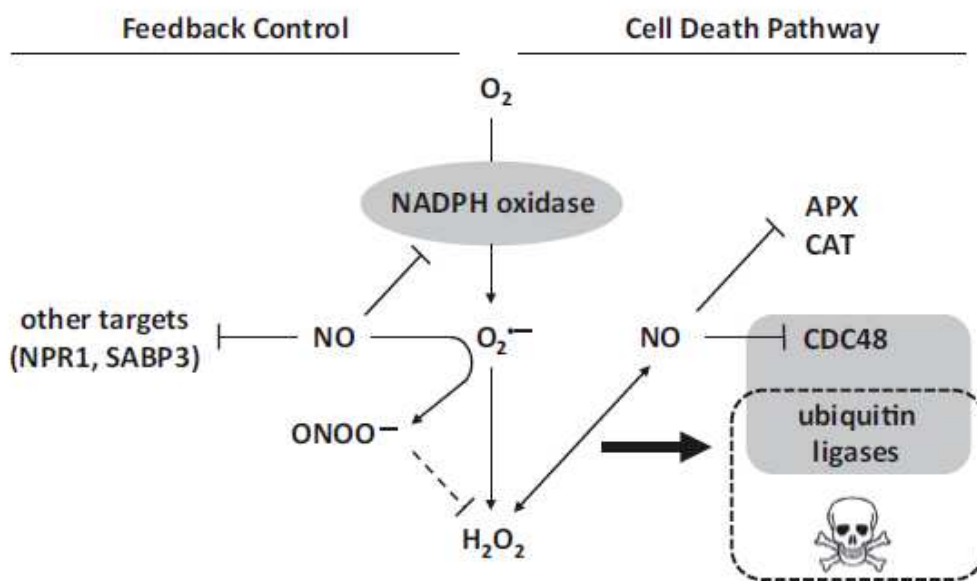
**Figure 8. Production de différentes formes de ROS dans une cellule. Schéma proposé par Reczek and Chandel (2015)**

Les organites capables de produire du ROS dans une cellule végétale sont la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, le peroxysome. Les ROS peut être produits par la NADPH oxydase (NOXs). Ces productions vont aboutir à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette molécule peut déclencher la défense ou interagir avec des ions métalliques ou être neutralisée.

La perception par les récepteurs des différents PAMPs/DAMPs induit les nucléotides cycliques : l'adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) et la guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) qui appartiennent à la famille des purines nucléotides cyclases, et par conséquent, induisent des transporteurs de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la paroi végétale. Ces réactions ont été mises en évidence par Qi *et al.* (2010) chez *Arabidopsis* induit par un DAMP, le AtPeps, perçu par le récepteurs AtPEPR1. Une partie importante dans la mécanistique d'activation de la défense par ces ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont les transporteurs protéiques nucléotidiques cycliques (« Cyclic Nucleotide Gated Channel » - CNGC) qui forment un canal pour l'entrée des  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. La traduction du signal par le  $\text{Ca}^{2+}$  est faite par des senseurs, protéiques, comme la calmoduline (CaM). Cette association entre  $\text{Ca}^{2+}$  et CaM est directement liée à la production de NO. Dans les plantes d'*Arabidopsis*, l'utilisation d'un antagoniste de la CaM empêche la production de NO et la HR (Figure 7) (Ma *et al.*, 2008). La synthèse de ROS est liée à la signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  comme dit précédemment. Les protéines kinases dépendant de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases – CDPK) sont responsables d'un contrôle rapide des NADPH-oxydases qui vont activer la production de ROS ou de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Seybold *et al.*, 2014).

### 2.2 Production de l'oxyde nitrique (NO) et des ROS

Dans l'interaction entre la plante et l'agent pathogène, le NO est fortement impliqué dans la signalisation pour les réactions HR et l'expression des gènes de défense. Le NO va interagir avec différentes molécules de signalisation comme le  $\text{Ca}^{2+}$ , les ROS, la voie des « Mitogen Activated Protein Kinases » (MAPKs) ainsi que les voies de signalisation hormonales (Agurla *et al.*, 2014). Le NO peut également réagir avec le superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) pour former du peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), une autre molécule très réactive. Cette activité altère la fonction de différentes protéines, comme la S-nitrosylation et par conséquent génère de grandes quantités de S-nitrosoglutathione (GSNO) qui peut agir comme une source de NO (Mur *et al.*, 2013; Agurla *et al.*, 2014). Le rôle le plus important du GSNO, est la régulation de la fonction des deux protéines : la « SA-Binding Protein 3 » (SABP3) et la « Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes 1 » (NPR1). Ces protéines sont liées à la voie de signalisation de l'acide salicylique (SA). Les **ROS** peuvent se présenter sous différentes formes : anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) ou radical hydroperoxyde ( $\text{HO}_2$ ). Les différentes formes de ROS sont produites par l'enzyme NADPH, dans la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le peroxysome. Le  $\text{O}_2$  est réduit par une NADPH oxydase (NOXs) et par une chaîne mitochondriale de transport d'électrons sur différents complexes, il se transforme en  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Dans le cytosol de la cellule, le  $\text{O}_2^{\cdot-}$  est rapidement



**Figure 9. Interactions entre le NO et le ROS. Schéma proposé par Trapet et al. (2015).**

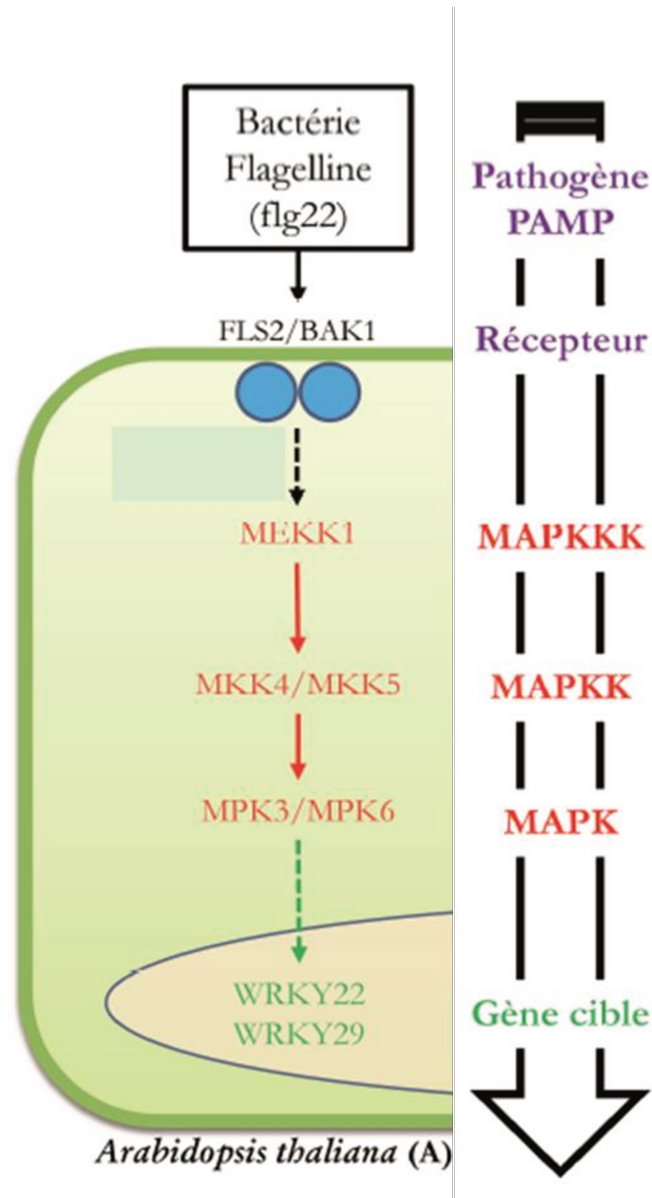
Le NO et les ROS influencent positivement leur production respective. NO et  $H_2O_2$  agissent comme intermédiaires essentiels dans les voies menant à l'expression de l'ubiquitine jusqu'à la mort cellulaire. Cette réaction est possible grâce au blocage des gènes APX et CAT qui peuvent dégrader le  $H_2O_2$ . Dans la partie feedback, NO régule les effets induits par les ROS en contrôlant négativement l' $O_2^{\cdot-}$  et de  $H_2O_2$  par la production d'ONOO $^-$  et par l'inhibition du NADPH oxydase.

converti en  $H_2O_2$  par l'activité enzymatique de la superoxide dismutase (SOD1 ou SOD2). Le  $H_2O_2$  peut aussi être produit rapidement par le réticulum endoplasmique et le peroxysome par l'oxydation de longues chaînes d'acides gras. L'organite de production du  $H_2O_2$  est probablement choisi en fonction de la localisation du signal (Figure 8) (Reczek and Chandel, 2015). Le  $H_2O_2$  peut réagir avec des ions métalliques ( $Fe^{2+}$  et  $Cu^+$ ) et produire la forme plus toxique de ROS, le OH $\cdot$ . La régulation des molécules toxiques de ROS est faite par des enzymes comme, la peroxiredoxin (PRX), la glutathione peroxidase (GPX), et la catalase (CAT) qui vont détoxifier la cellule et convertir le  $H_2O_2$  en  $H_2O$  (Reczek and Chandel, 2015).

La production de NO et de ROS est souvent liée et peut induire une résistance contre des agents pathogènes. Ce lien vient probablement du flux de  $Ca^{2+}$  qui conditionne l'activation des deux productions. Au niveau de la signalisation, le NO et les ROS peuvent avoir des effets positifs dans la voie de l'acide salicylique, *via* la régulation de deux facteurs de transcription liés au SA : NPR1 et TGA. Chez *Arabidopsis*, par exemple, le NPR1 à l'état oligomérique dépend de la GSNO et sa translocation dans le noyau dépend de la concentration de ROS dans le cytoplasme. Une fois que le SA s'accumule lors d'une attaque par des agents pathogènes et modifie l'état redox cellulaire, cela provoque une réduction des liaisons disulfure dans la protéine NPR1 (Mur *et al.*, 2013; Lehmann *et al.*, 2015). Si le NO est associé directement à la voie de signalisation du SA (Mur *et al.*, 2013), ce n'est pas le cas pour la production de ROS qui n'est pas systématiquement associée à cette voie (Lehmann *et al.*, 2015).

Perchepped *et al.* (2010) ont attribué la résistance d'*Arabidopsis* contre le champignon *Sclerotinia sclerotiorum* au NO à différents niveaux de la défense. Dans leurs travaux, le NO a régulé l'expression des gènes de défense ; a agi sur la voie de signalisation des ROS ; a modulé la mort cellulaire. Sur un autre modèle biologique, le NO, en collaboration avec les ROS, déclenche la résistance de *Nicotiana benthamiana* à *B. cinerea* (Asai and Yoshioka, 2009). Sur plantes de pomme de terre, la génération précoce de NO et du superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) a conduit à la formation de peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) et à la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ce qui induit une défense efficace contre *P. infestans* (Abramowski *et al.*, 2015).

Le NO peut jouer un double rôle dans l'interaction avec les ROS, il peut déclencher une augmentation des ROS en réprimant les enzymes détoxifiantes des ROS : la CAT et de l'ascorbate peroxydase (APX). Il peut également, contrôler la production excessive de ROS et limiter une accumulation de  $H_2O_2$  toxique pour la plante et des réactions nécrotiques excessives de type HR (Figure 9) (Trapet *et al.*, 2015). Les travaux de Yun *et al.* (2011) ont montré que



**Figure 10.** Schéma extrait de la thèse de Saubeau (2014) adapté de Dodds and Rathjen (2010); Meng and Zhang (2013) ; et Li et al. (2016)

Chez *Arabidopsis*, la reconnaissance de la flg22 va phosphoryler le MEKK1 et à la suite phosphoryler les MKK4/MKK5 puis le MPK3/MPK6. Cette cascade de MAPKs va activer des gènes ciblés, le WRKY22 et le WRKY29

chez *Arabidopsis*, lorsque les concentrations de S-nitrosothiols étaient élevées, le NO limitait la HR médiée par la S-nitrosylation de la NOX, abolissant la capacité de synthèse des ROS.

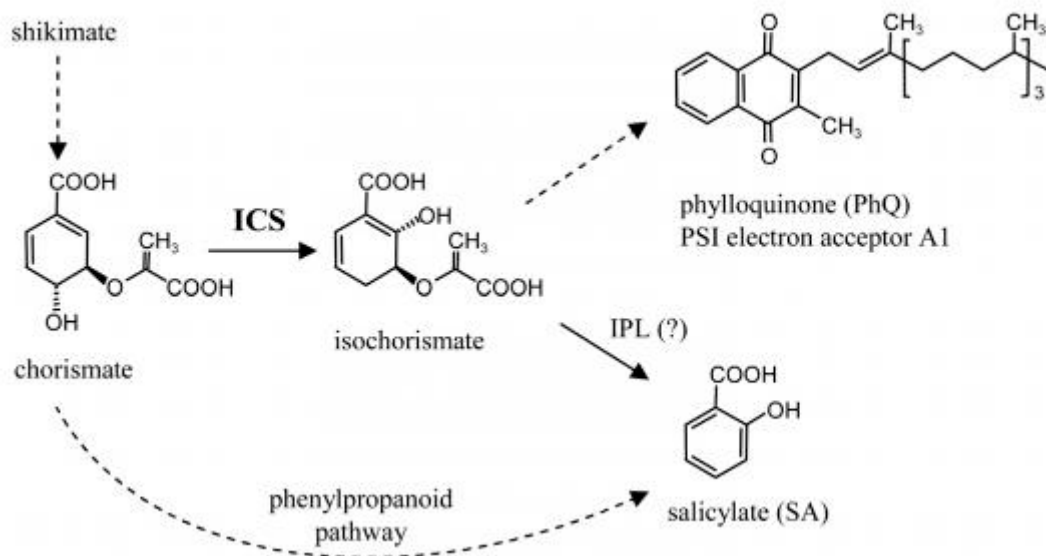
### 2.3 « Mitogen Activated Protein Kinases » (MAPKs)

La signalisation après l'attaque du pathogène est aussi faite par l'activation de cascades de phosphorylation de protéines : les « Mitogen Activated Protein Kinases » (MAPKs). Ces réactions en cascades sont très conservées au cours de l'évolution chez tous les eucaryotes (Meng and Zhang, 2013). Cette cascade consiste en un complexe modulaire qui commence avec une MAPK kinase kinase (MEKKs) phosphorylée après la reconnaissance d'un PAMP ou DAMP. Les cascades régulent l'activité de divers substrats, comme les facteurs de transcription et les protéines kinases (Dodds and Rathjen, 2010).

Chez *Arabidopsis*, 20 MPKs et 10 MAPKKs ont été trouvées. En plus, une soixantaine d'autres MAPKKKs ont été identifiées putativement. La reconnaissance de la flg22 et de elf18 activent les MAPKs après reconnaissance par les récepteurs FLS2 et EFR. Dans le cas de la flg22, deux cascades de MAPKs sont induites ; la première entraîne l'activation de MKK4 et MKK5 puis MPK3 et MPK6 (Figure 10).

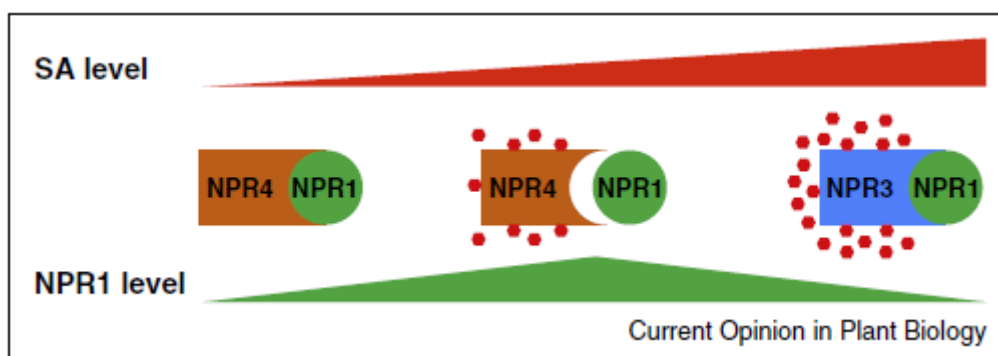
Le début de la cascade est encore inconnu, après la reconnaissance, le MEKK1 semble être activé, mais des études génétiques ont montré que le MEKK1 n'est pas lié à l'activation de MPK4/MPK5 donc il est probable que ce soit un orthologue de cette molécule qui soit responsable de l'activation (Meng and Zhang, 2013). Comme vu précédemment, la cascade des MAPKs chez *Arabidopsis/flg22* n'est pas complètement élucidée. Des études récentes, comme celles de Nitta *et al.* (2014), ont mis en évidence de nouvelles protéines qui participent à la cascade de phosphorylation après perception du PAMP : la MPK1, la MPK11 et la MPK13. Ces protéines n'affectent pas l'efficacité des réactions dans la PTI quand elles sont enlevées de la cascade. Cependant, les auteurs suggèrent qu'il y a une redondance fonctionnelle des MAPKs et que d'autres cascades potentielles ne sont pas encore élucidées. L'ensemble des cascades de phosphorylation conduit à l'induction des facteurs de transcription du type WRKY et par conséquent à l'expression des gènes de défense (Li *et al.*, 2016).

Ce type de signalisation peut être aussi porté par des protéines kinase dépendantes du flux de Ca<sup>2+</sup>, les « Calcium-dependent protein kinases » (CDPKs) chez différentes espèces comme *Arabidopsis* et mais aussi chez la pomme de terre (Dodds and Rathjen, 2010; Fantino *et al.*, 2017).



**Figure 11. Synthèse du SA par deux voies originaires du shikimate : la PAL de la voie des phénylpropanoïdes et la voie de l'isochorismate. Schéma proposé par Yuan et al. (2009)**

Le point d'interrogation est l'étape catalysée par l'« isochorismate pyruvate lyase » (IPL), une enzyme nécessaire à la biosynthèse de la SA par ICS dans les bactéries, mais non encore identifiée dans les plantes.



**Figure 12. Contrôle de l'action de la protéine NPR1 pour l'activation des gènes de défense. Schéma proposé par Yan et Dong (2014)**

Le NPR4 et NPR3 sont des régulateurs de l'action de NPR1. L'affinité des récepteurs de SA permettra de libérer le NPR1 puis, le déclenchement de la défense par la voie de signalisation SA pourra s'effectuer. Le NPR4 est très sensible à la présence de SA avec une haute affinité avec SA. Cependant, le NPR3 a une faible affinité avec le SA. Les deux vont contrôler la présence de NPR1 libre dans la cellule pour la conduction du signal.

### 2.4 Facteurs de transcription

L'activation de la défense est un travail collaboratif au sein de la cellule. Après le déclenchement des protéines comme les MAPKs, des facteurs de transcription spécifiques vont agir pour induire une réponse rapide et ciblée pour réguler la défense.

Le facteur de transcription WRKY est activé chez différentes espèces de plantes. Dans le modèle classique *Arabidopsis/flg22*, les MAPKs induisent les gènes de WRKY22 et WRKY29. Cependant, le mécanisme d'activation de ces gènes n'est pas encore connu (Figure 10). Les MPK3/MPK6 sont directement liées à la phosphorylation de WRKY33 qui induit l'expression du gène de la camalexine, une phytoalexine, qui impacte le champignon *B. cinerea*, (Li *et al.*, 2016). Chez le blé, l'expression de quelques WRKYs a été associée de façon significative à l'expression de *NPR1*. L'expression de trois gènes WRKY, dont *HvWRKY6*, *HvWRKY40* et *HvWRKY70* est associée à l'induction de *NPR1* et améliore la résistance contre le champignon *Puccinia triticina* (Gao *et al.*, 2018).

La voie de signalisation du  $Ca^{2+}$  lié à la protéine CaM induit le facteur de transcription « CaM-binding protein 60g » (CBP60g). C'est ce facteur qui est activé après la perception des MAMPs et qui conduit à l'expression du gène *ICS1* de la voie du SA (Li *et al.*, 2016).

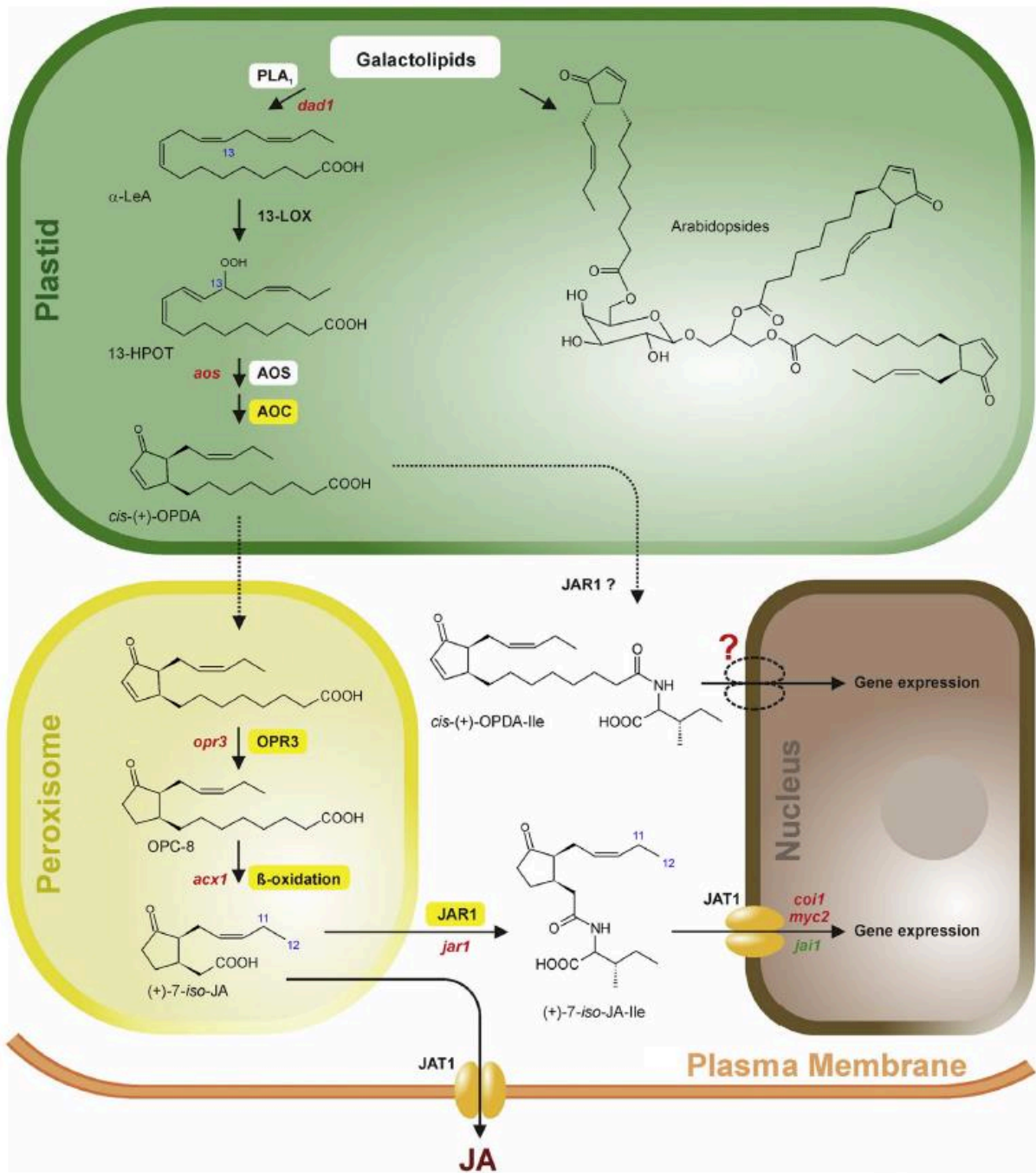
### 2.5 Signalisation hormonale

Dans la suite du déclenchement de la défense, les phytohormones, petits molécules, sont responsables de la modulation de ce système par la signalisation locale et systémique (Couto and Zipfel, 2016). L'importance de la signalisation des phytohormones est soulignée par le fait que les agents pathogènes interférant dans la signalisation ou la production des hormones peuvent augmenter la sensibilité de la plante (Berens *et al.*, 2017). Parmi les phytohormones, l'acide salicylique (SA) et le jasmonate (JA) sont les hormones majeures liées à la défense. Cependant, d'autres phytohormones peuvent aussi jouer un rôle important dans la signalisation : c'est le cas de l'éthylène (Et), lié à l'induction par le JA, et d'autres phytohormones liées principalement au développement et à la croissance de la plante comme, l'acide abscisique (ABA), l'auxine (AUX), les gibbérellines (GAs), les cytokinines (CKs) et les brassinostéroïdes (BRs) (Berens *et al.*, 2017).

#### 2.5.1 L'acide salicylique (SA)

Le SA est synthétisé à partir du chorismate par deux voies enzymatiques : celle de la « phenylalanine ammonium lyase » (PAL) dans le cytosol et celle de l'« isochorismate synthase » (ICS) dans le chloroplaste (Figure 11). La répression de la PAL diminue l'induction





**Figure 13. Synthèse du JA à partir de l'acide linoléique et son transport intra- cellulaire. Schéma proposé par Wasternack et Strnad (2019)**

$\alpha$ -LeA –  $\alpha$ -acide linoléique ; acide 13-HPOT - (13S)-hydroperoxyoctadécatriénoïque ; acide cis-(+)-OPDA - acide cis-(+)-12-oxophytodiène ; OPDA-Ile - Conjugué de l'acide cis-(+)-12-oxophytodiénoïque et de l'isoleucine ; JA - acide jasmonique ; JA-Ile - Conjugué de l'acide jasmonique et de l'isoleucine ; OPC-8 - acide 3-oxo-2-(2-pentényl)-cyclopentane-1-octanoïque. Les abréviations pour enzymes/protéines : acx1, acyl CoA-oxydase1 ; AOC - allene oxide cyclase ; AOS - allene oxide synthase ; coi1, coronatine insensible1 ; dad1, déhiscence retardée des anthères1, jai1-jasmonic acid insensible1 ; JAR1 - JA-aminoacide synthétase ; JAT1-transporteur d'acide jasmonique1, jai1-jasmonic acid insensible1 ; myc2, bHLHzip facteur de transcription MYC2 ; OPR3 - OPDA réductase3 ; PLA1-phospholipase A1

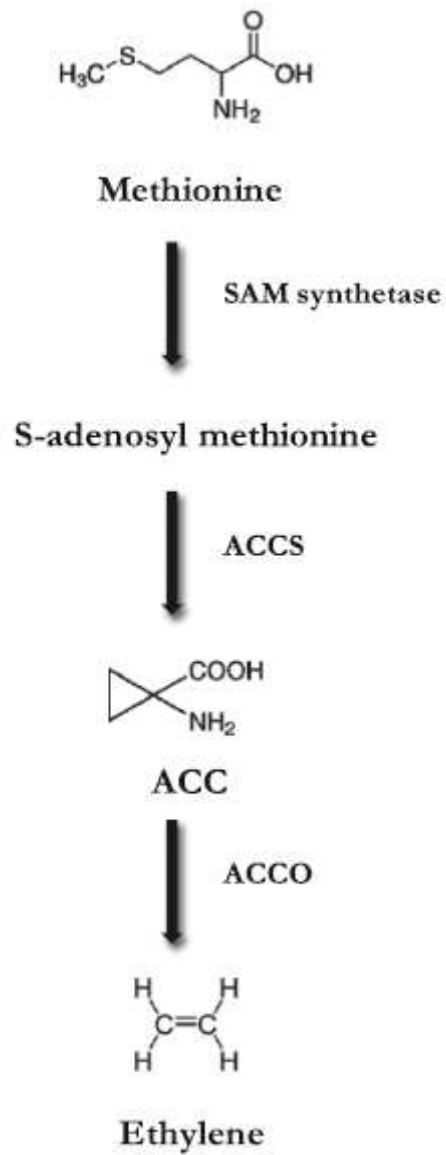
du SA dans plusieurs espèces, comme *Arabidopsis* et le tabac (Berens *et al.*, 2017). Concernant l'IC, Yuan *et al.* (2009) suggèrent qu'il est essentiel à la biosynthèse du SA chez les monocotylédones et qu'il pourrait être limité aux eudicotylédones. L'enzyme qui converti l'IC en SA a été trouvée chez les bactéries (Yuan *et al.*, 2009) et chez certaines plantes comme l'arabette, la tomate et le soja (Shine *et al.*, 2016)

La protéine « Non-expressor of PR genes 1 » (NPR1) est un médiateur de l'activation de la voie de SA. Après l'infection par l'agent pathogène, le SA s'accumule dans le cytosol et modifie l'état redox de la cellule. Ce changement induit la dissociation des oligomères de la NPR1 en monomères qui sont dirigés vers le noyau. NPR1 se lie au facteur de transcription : la « TGA-basic region/leucine zipper » (TGA-bZIP) (Palmer *et al.*, 2017). Cette liaison conduit à l'induction des gènes *PR1*, *PR2* et *PR5* (van Loon, 2016). Par exemple, l'induction du gène *NPR1* d'*Arabidopsis* chez un mutant de tomate induit une résistance contre le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et la bactérie *Ralstonia solanacearum* (Lin *et al.*, 2004). Sur des génotypes mutants de citrus, NPR1 augmente la résistance au chancre causé par la bactérie *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Zhang *et al.*, 2010). Il était suggéré que NPR1 pouvait être un récepteur du SA. Cependant, les travaux de Yan and Dong (2014) suggèrent que les récepteurs de SA seraient NPR3 et NPR4, deux homologues de NPR1 qui y sont liés (Figure 12).

Le NPR4 est un récepteur du SA à affinité élevée et le NPR3 est un récepteur du SA à faible affinité. Lorsque le niveau de SA est très bas, le niveau de NPR1 est bas, grâce à la dégradation par le NPR4. Lorsque le niveau de SA est très élevé, le niveau de NPR1 est également bas parce que NPR3 le dégrade également (Yan and Dong, 2014).

La concentration de SA dans la cellule peut aussi induire des facteurs de transcription comme WRKY70 et WRKY33. Les WRKY70 et WRKY33 vont réguler négativement la voie de signalisation du JA. Chez *Arabidopsis*, par exemple, l'induction du WRKY70 augmente la résistance contre le champignon, *Erysiphe cichoracearum* et diminue la résistance contre le champignon *Alternaria brassicicola*. *E. cichoracearum* est connu pour être contrôlé par la voie du SA et *A. brassicicola* par la voie du JA. La suppression du gène WRKY70 inverse les réactions : la résistance augmente contre *A. brassicicola* au détriment de l'autre pathogène (Li *et al.*, 2006).

Des études sur différentes espèces ont montré que les voies du SA et du JA sont antagonistes, c'est le phénomène du « cross-talk » (Thaler *et al.*, 2012). L'antagonisme entre



**Figure 14. Biosynthèse de l'éthylène. Schéma proposé par Saubeau et al. (2016)**

*SAM : S-adénosylméthionine ; ACC : 1-1-aminocyclopropane acide carboxylique ; ACCS : ACC synthase ; ACCO : ACC oxydase*

les voies de signalisation est important pour diriger l'expression des gènes de défenses. La voie du SA est souvent liée à l'efficacité contre les agents pathogènes hémi- et biotrophes, tandis que la voie du JA est souvent liée au contrôle des agents pathogènes nécrotrophes et des herbivores (Palmer *et al.*, 2017).

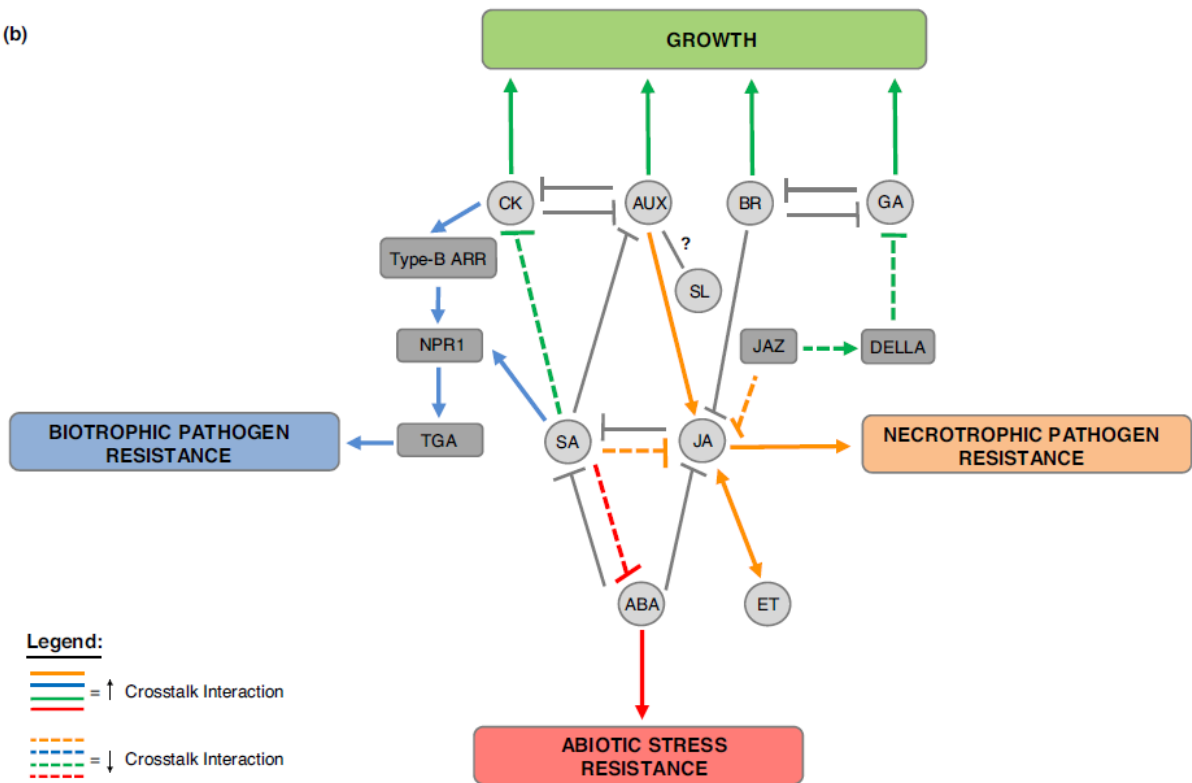
### 2.2.1 L'acide jasmonique ou jasmonate (JA) et dérivés

La biosynthèse du JA commence par la libération de l'acide  $\alpha$ -linoléique des lipides membranaires. Chez *Arabidopsis*, des réactions enzymatiques séquentielles des lipoxygénases (LOXs), de l'« allene oxide synthase » (AOS) et de l'« allene oxide cyclase » (AOC) vont convertir les lipides membranaires du plaste en acide 12-oxophytodiénoïque (OPDA). L'OPDA est ensuite converti en JA par, l'acide 2-oxophytodiénoïque réductase (OPR). Le JA peut être déjà utilisé pour la signalisation entre les cellules ou transformé en jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) par l'enzyme « JA amido synthetase 1 » (JAR1) et en méthyl jasmonate (MeJA). Le JAR1 est transporté au nucleus par le « JA transporteur1 » (JAT1) (Figure 13) (Berens *et al.*, 2017; Wasternack and Strnad, 2019). La régulation de la signalisation du JA est fait par le JA-Ile qui est perçu par le « coronatine-insensitive 1 » (COI1). Le COI1 intervient dans la dégradation des protéines de la famille avec des domaines JA ZIM (JAZ) dépendant des protéasomes 26S (Wasternack and Strnad, 2019).

Chez *Arabidopsis*, la signalisation du JA entraîne des facteurs de transcription : des « basic helix-loop-helix » (MYC) comme MYC2, et l'« ETHYLENE RESPONSE FACTOR » (ERF) comme ERF1. Ce dernier facteur de transcription induit le gène marqueur de la voie du JA, le « *PLANT DEFENSIN1.2* » (*PDF1.2*) (Pieterse *et al.*, 2012). Les deux voies d'activation du JA sont antagonistes. La voie du ERF est associée à la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes et la voie du MYC aux insectes herbivores (Pieterse *et al.*, 2012).

La résistance d'*Arabidopsis* contre l'infection de *B. cinerea* dépend de la voie de signalisation du JA. Une meilleure compréhension sur la régulation de cette résistance, a été apportée par Jiang et Yu (2016) qui ont montré que le WRKY57 se lie directement aux promoteurs de JAZ1 et JAZ5, codant deux répresseurs importants de la voie de signalisation de JA, et activant leur transcription. La résistance des plantes de blé contre les champignons nécrotrophes *Sclerotinia sclerotiorum* et *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* est aussi dépendante de la voie du JA (Stotz *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2014). L'interaction des plantes de blé avec *S. sclerotiorum* a été démontrée par Stotz *et al.* (2011) avec des mutants déficients dans la voie de biosynthèse du jasmonate. En effet, après infection, ces mutants sont devenus sensibles à l'agent

(b)



Current Opinion in Plant Biology

**Figure 15.** Les interactions positives et négatives entre les phytohormones et leurs fonctions potentielles dans la résistance contre les agents pathogènes, stress abiotiques et croissance de la plante (Shigenaga et al., 2017).

Les lignes colorées correspondent aux fonctions de chaque interaction. Les lignes complètes sont les interactions positives et les pointillées sont les négatives.

pathogène. Dans le cas de *B. graminis* f.sp. *tritici*, cette résistance a été vérifiée suite à l'application de MeJA.

Une caractéristique de l'induction de la voie du JA est son association avec une autre phytohormone, l'éthylène (Et). Quand le JA et l'Et sont activés le facteur de transcription activé est l'ERF qui favorise la résistance de la plante aux agents pathogènes nécrotrophes (Pieterse *et al.*, 2012).

### 2.2.1 L'éthylène (Et)

La biosynthèse de l'Et, une phytohormone gazeuse, commence par la méthionine qui est convertie par l'enzyme S-adenosyl méthionine (SAM) synthase. Le SAM est transformé en acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique (ACC) par l'enzyme ACC synthase. L'ACC conduit à la production de l'Et par l'ACC oxydase (ACCO) (Figure 14). La concentration de l'Et est perçue par des récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique comme le « ETHYLENE RESPONSE 1 » qui conduit à l'activation de la protéine « ETHYLENE INSENSITIVE 2 » (EIN2). EIN2 régule alors positivement le facteur de transcription clé de la voie de l'Et, l'EIN3 (Saubeau *et al.*, 2016; Berens *et al.*, 2017). Chez Arabidopsis, l'EIN3 est un des responsables de la répression du gène *ICS* ce qui conduit à la diminution du SA dans le cytoplasme et rend la plante sensible à *P. syringae* (Chen *et al.*, 2009).

La synergie entre les voies du JA et de l'Et est déterminante pour l'induction de défense. L'expression de certains gènes, comme ceux des PR protéines et *PDF1.2* est dépendante de la signalisation des deux voies et peut augmenter la sensibilité à certains pathogènes si une des voies ne fonctionne pas correctement. Dans le cas du gène *PDF1.2*, les deux voies sont sollicitées, obligatoirement, pour son activation. Donc ces voies interagissent pour la co-régulation de l'expression de certains gènes de défense (Wang *et al.*, 2002).

### 2.2.2 L'antagonisme entre les voies du JA et SA

Les voies du JA et du SA sont souvent antagonistes et au cours de l'évolution, certains agents pathogènes profitent du cross-talk entre ces deux voies pour pouvoir se développer. Chez la tomate, la bactérie *Pseudomonas syringae* secrète une phytotoxine, la coronatine (COR) qui fonctionne comme une molécule qui mime le JA entraînant une inhibition des réponses de défense régulées par le SA (Uppalapati *et al.*, 2007) diminuant ainsi la résistance de la tomate. *B. cinerea*, pathogène nécrotrophe, exploite également cet antagonisme entre le SA et le JA comme une stratégie pour provoquer le développement de la maladie. En effet, ce champignon



produit des exopolysaccharides qui induisent la voie du SA et par cross-talk, la voie du JA est supprimée (El Oirdi *et al.*, 2010).

### 2.2.1 Autres phytohormones impliquées dans la régulation des défenses des plantes et les « crosstalks » entre les voies de signalisations

Bien que les voies du SA et du JA soient considérées comme les plus importantes dans la défense contre les stress biotiques, le réseau de phytohormones est plus complexe. Les phytohormones responsables pour le développement et la croissance de la plante, l'ABA, l'AUX, les GAs, la CK et les BRs, vont contribuer au système immunitaire des plantes de façon synergique ou antagoniste (« cross-talk ») avec les hormones de défense. Les interactions entre ces phytohormones sont complexes et quelques exemples sont apportés ci-dessous (Figure 15) (Shigenaga *et al.*, 2017).

L'**acide abscisique** a comme principale fonction la réponse aux stress abiotiques. Il interagit avec la signalisation du SA et du JA. Ainsi, la signalisation de l'ABA et du SA simultanément est sollicitée pour la fermeture des stomates lors d'une perception de MAMPs par la plante cependant, les mécanismes sous-jacents à cette interaction sont inconnus. En effet, dans la majorité des cas, ces phytohormones sont antagonistes (Berens *et al.*, 2017). Chez le riz, l'ABA bloque l'activation du SA en inactivant le facteur de transcription WRKY45, essentiel pour la suite de la voie du SA (Ueno *et al.*, 2015). En revanche, l'ABA agit de façon synergétique avec le MYC, le facteur de transcription du JA, pour une résistance aux herbivores (Pieterse *et al.*, 2012).

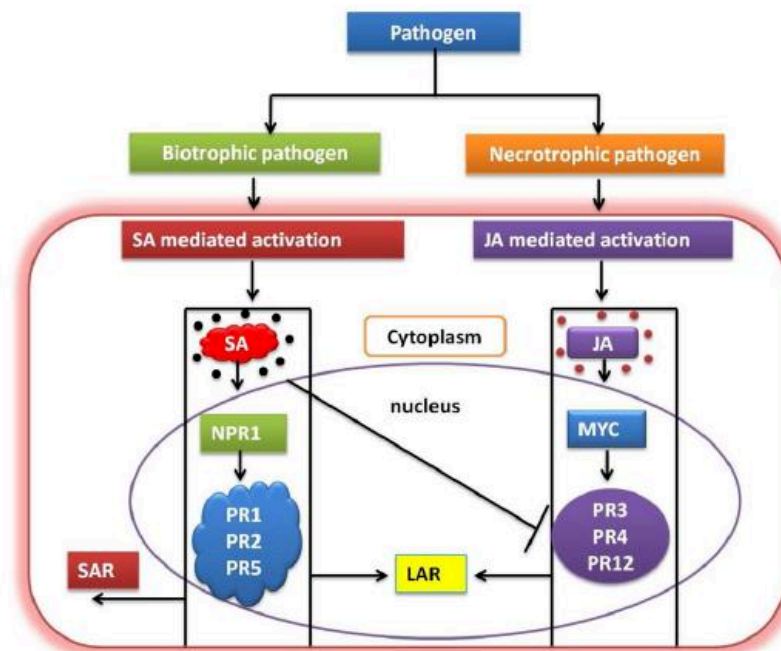
L'**auxine** est l'hormone régulatrice de la croissance et du développement. L'activation de cette phytohormone est souvent associée à la sensibilité aux maladies et principalement à celles induites par les biotrophes. Chez *Arabidopsis*, *P. syringae* par son système de sécrétion de type III injecte son effecteur AvrRpt2, et supprime l'expression des gènes *PR* activés par la voie du SA (Fu and Wang, 2011). De plus, chez *Physcomitrella patens*, l'application de l'acide indole-3-acétique (IAA), une auxine, amène à une sensibilité à l'oomycète *Pythium debaryanum*, alors que de faibles concentrations d'IAA favorisent la résistance de la plante à cet agent pathogène (Mittag *et al.*, 2015).

Les **gibbérélines** sont des hormones responsables du processus de développement comme par exemple, l'élongation de la tige. Ces hormones contrôlent la croissance par la répression de la protéine DELLA. La dégradation de cette protéine implique une sensibilité des plantes d'*Arabidopsis* à deux agents pathogènes nécrotrophes : *A. brassicicola* and *B. cinerea*



**Tableau 1. Les protéines PR connues, leurs fonctions et les plantes où elles ont été trouvées. Tableau adapté de Ali et al. (2018)**

PR-Proteins	Gene Accession No.	Property/function	Source
PR1	Y00707	Antifungal	Nicotiana. tabacum
PR2	M59443.1	$\beta$ -1,3-glucanases	N. tabacum
PR3	X77111.1	Class I, II, IV, V, VI, VII Chitinases	N. tabacum
PR4	NW_015888419.1	Class I, II Chitinases	N. tabacum
PR5	NW_015793016	Thaumatin-like proteins	N. tabacum
PR6	NW_004196001.1	Proteinase inhibitor	Solanum lycopersicum
PR7	NC_015445.2	Endoproteinase	S. lycopersicum
PR8	NC_026660.1	Class III Chitinase	Cucumis sativus
PR9	EC 1.11.1.7	Peroxidase	N. tabacum
PR10	NC_026940.1	Ribonuclease-like proteins	Petroselinum crispum
PR11	gi 899342	Class I Chitinase	N. tabacum
PR12	NC_025209.1	Defensin	Raphanus raphanistrum
PR13	gi 1181531	Thionin	<i>Arabidopsis thaliana</i>
PR14	gi 1045201	Lipid-transfer protein	Hordeum vulgare
PR15	gi 2266668	Oxalate oxidase	Hordeum vulgare
PR16	gi 1070358	Oxidase-like	H. vulgare
PR17	-	Antifungal and antiviral	N. tabacum



**Figure 16. Agents pathogènes ciblés par des protéines PRs et leur voie de signalisation. Schéma proposé par Ali et al. (2018)**

L'infection des pathogènes biotrophes et nécrotrophes entraîne l'accumulation d'hormones de défense des plantes comme le SA et le JA. Certains gènes PRs sont dépendants de ces voies. Ainsi la PR1, PR2 et PR5 sont SA-dépendantes et les PR3, PR4 et PR5 sont JA-dépendantes. Chaque voie utilise des facteurs de transcription pour cette synthèse des gènes PRs. La production des gènes PRs est utilisée au niveau de la cellule et configure le « local acquired resistance » (LAR), mais aussi à un niveau systémique, « systemic acquired resistance » (SAR).

(Bari and Jones, 2008). Cette protéine interagit avec la voie du JA par la répression de l'enzyme JAZ1. La dégradation de la DELLA par les GAs favorise la suppression de JAZ et par conséquent la répression de la voie du JA. Ce réseau modifie l'équilibre entre la signalisation du JA et du SA (Pieterse *et al.*, 2012).

La **cytokinine** a sa fonction principale liée à la croissance de la plante *via* la division cellulaire. Dans l'immunité de la plante, cette phytohormone agit en synergie avec le SA. Le « ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 » (ARR2) interagit avec le facteur de transcription TGA3 de SA, et de plus, l'application de SA renforce la liaison de l'ARR2 au promoteur PR1, NPR1 (Choi *et al.*, 2011).

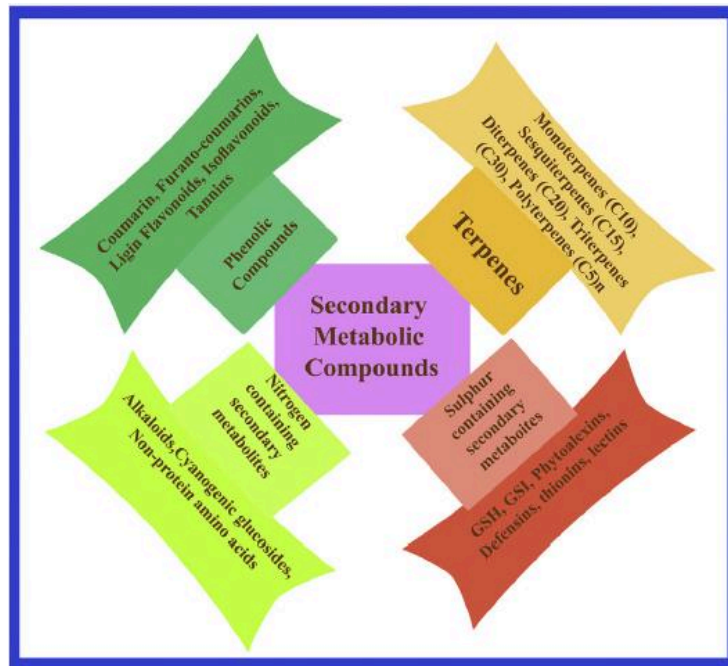
Les **brassinostéroïdes**, une classe unique d'hormones stéroïdes végétales, régulent aussi la croissance de la plante. Chez le riz, les BRs sont antagonistes du SA, du JA ainsi que des GAs par la stabilisation de DELLA. Dans le pathosystème riz /*Pythium graminicola*, agent pathogène des racines, les BRs rend la plante sensible à l'oomycète alors que les GAs augmentent la résistance (De Vleeschauwer *et al.*, 2012).

### III. Produits de défenses

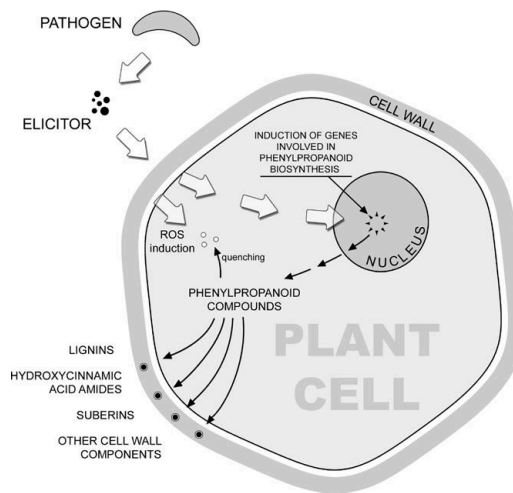
Les réponses de défense des plantes impliquent des molécules de signalisation, des molécules constitutives et des molécules antimicrobiennes. Ces dernières sont souvent de nouvelles molécules induites pour faire face à l'attaque d'un agent pathogène (Naoumkina *et al.*, 2010). Ces molécules peuvent être des protéines, comme les protéines PR « Pathogenesis-Related », bien identifiées pour leurs activités antimicrobiennes (van Loon *et al.*, 2006) ; ou des métabolites, principalement du métabolisme secondaire, qui sont aussi connus par leurs rôles d'antimicrobiens (Ahuja *et al.*, 2012; Zaynab *et al.*, 2018)

#### 1. Les protéines « Pathogenesis-Related » (PRs)

Les premières protéines PR identifiées ont été : PR1, PR2, PR3, PR4 et PR5, identifiées chez le tabac suite à l'infection du virus de la mosaïque du tabac (Bol *et al.*, 1990 vu dans Ali *et al.*, 2018). Actuellement, 17 familles de PRs sont identifiées sur différents pathosystèmes (Tableau 1) (van Loon *et al.*, 2006). Plusieurs auteurs ont lié la production de ces protéines à la résistance à différents pathogènes mais le rôle exact de chaque protéine a été découvert au fil



**Figure 17. Métabolites secondaires des plantes et leur rôle dans le système de défense des plantes. (Zaynab et al., 2018)**



**Figure 18 - Réponses de défense précoces de la voie des phénylpropanoïdes contre des agents pathogènes, d'après Kostyn et al. (2012)**

La perception d'un PAMP déclenche au sein de la cellule végétale plusieurs réactions de défenses. Les composés de la voie des phénylpropanoïdes sont impliqués dans la détoxification des molécules toxiques de la cellule, comme les ROS, mais aussi au renforcement de la paroi végétale dans la tentative d'empêcher l'entrée de l'agent pathogène.

du temps, même si une des premières protéines découvertes, la PR1 n'a vu son mode d'action élucidé que récemment par Gamir *et al.* (2017).

La PR1 est considérée comme un antimicrobien par ses effets contre les champignons, les oomycètes et les bactéries. Par exemple, la résistance des plantes de *Wasabia japonica* contre *B. cinerea* est attribuée à la protéine PR1 (Kiba *et al.*, 2007). Le gène de la PR1 d'une espèce de riz sauvage - *Oryza grandiglumis*, *OgPR1* - introduit sur des plantes d'*Arabidopsis* mutants a induit de la résistance contre *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Shin *et al.*, 2014). Cependant, cet effet n'est pas observé après infection avec des virus (Breen *et al.*, 2017). Récemment, Gamir *et al.* (2017) ont découvert le mode d'action de la protéine PR1. Cette protéine a la capacité de se lier aux stérols et d'inhiber la croissance des agents pathogènes par la séquestration du stérol particulièrement indispensable à la survie des oomycètes. Cet effet anti-microbien de la PR1 a été démontré par le test *in vitro* avec l'oomycète *Phytophthora brassicae* dont le développement a été limité en présence de PR1. Un autre exemple de protéine PR est la PR4 qui est liée à la résistance du riz contre le champignon *Magnaporthe grisea* (Wang *et al.*, 2011b). L'induction du gène *OsPR4* a aussi amené l'induction des deux voies des phytohormones, le JA et l'ABA.

Les phytohormones participent à la signalisation qui conduit à la production de certaines protéines PR. Les PR1, PR2 et PR5 sont produits suite à l'activation de la voie du SA qui utilise le facteur de transcription NPR1 en ciblant les agents pathogènes biotrophes. Au contraire, les PR3, PR4 et PR12 sont produits suite à l'activation par le JA, le facteur de transcription MYC, ciblant les agents pathogènes nécrotrophes (Figure 16) (Ali *et al.*, 2018). L'activation des protéines PRs peut être plus complexe et dépendante du pathosystème étudié.

## 2. Les métabolites

Au niveau métabolomique, les plantes produisent un grand nombre de composés chimiques constituant le métabolome de la plante. Ces composés sont classés en deux groupes : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites primaires sont essentiels à la survie de la plante. Ils sont en particulier responsables de sa croissance et de son développement. Les métabolites secondaires longtemps considérés comme ayant des rôles non-essentiels à la plante sont actuellement définis comme constituant d'un métabolisme spécialisé. Ils sont différents suivant les espèces et/ou les genres de plantes et responsables de l'interaction de la plante avec son environnement (Scossa *et al.*, 2016). Les pigments des fruits, les

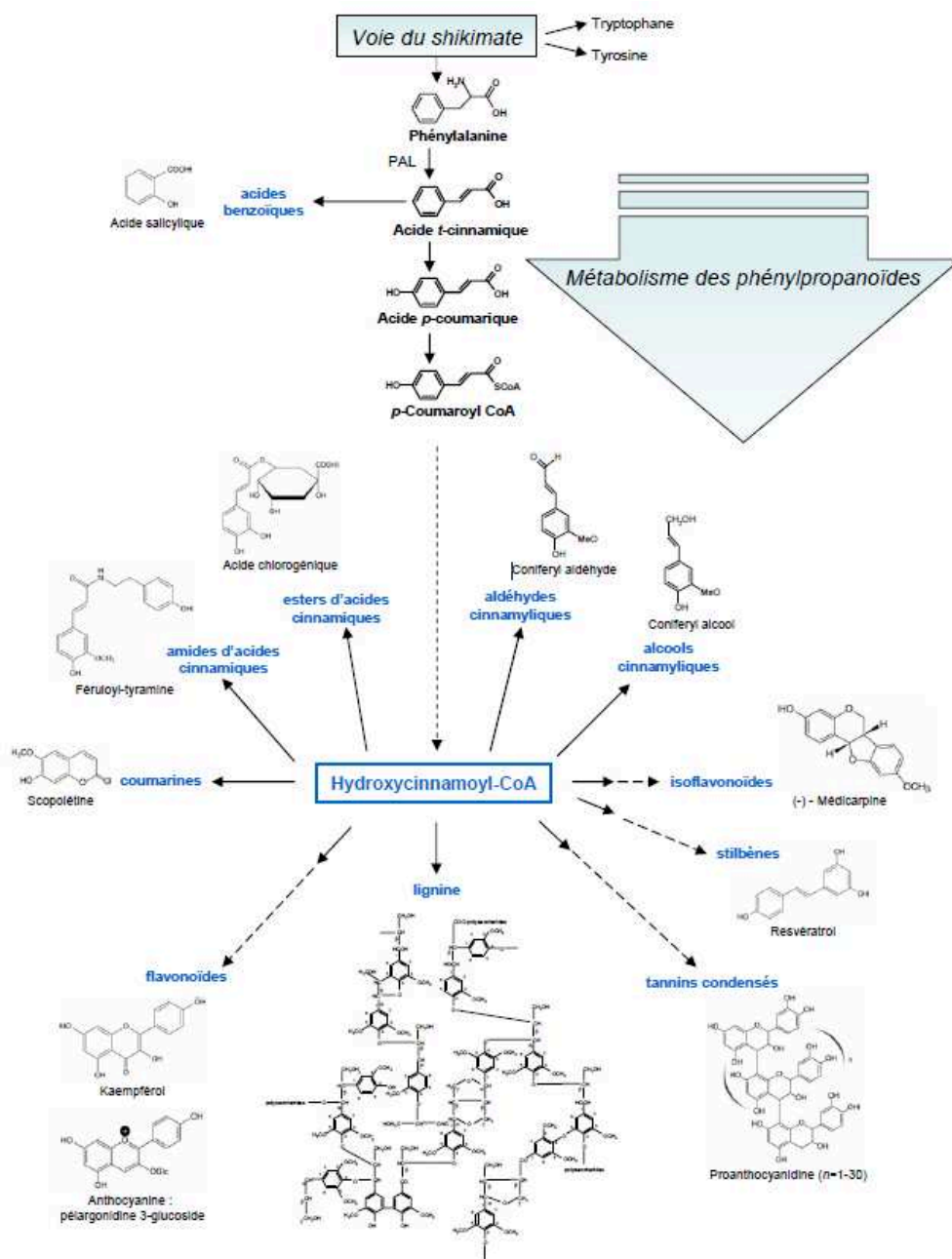


Figure 19. Sous-familles et exemples de métabolites dérivés du métabolisme des phénylpropanoïdes. Schéma présenté dans la thèse de Hoffmann (2003).

hormones, les métabolites antimicrobiens font partie de ce métabolisme secondaire. Pour cette raison, cette classe de métabolites a été beaucoup étudiée en protection des cultures où des marqueurs de défense ont pu être identifiés (Ahuja *et al.*, 2012). Les principales classes de métabolites secondaires sont : les terpènes, les alcaloïdes et les phénylpropanoïdes (Figure 17) dont 50.000 structures chimiques ont été déjà identifiées.

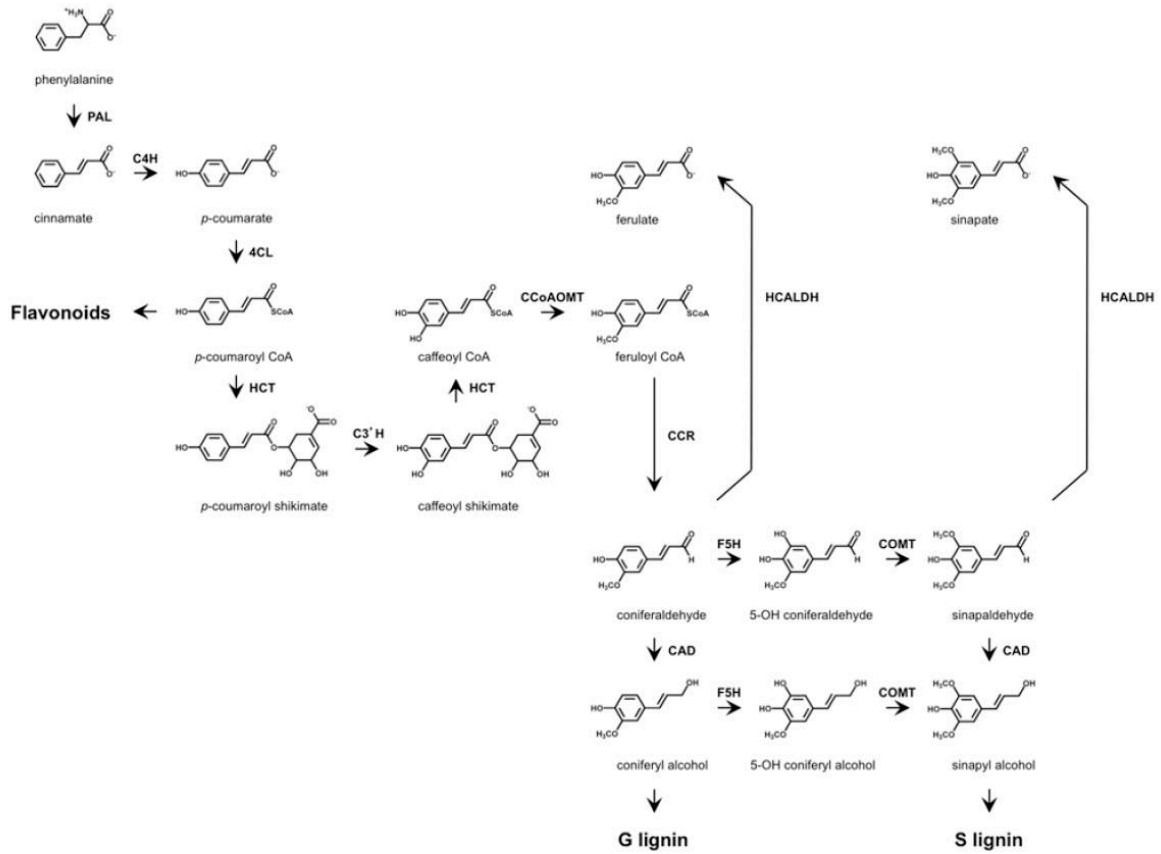
### 2.1 Les phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes forment une famille de métabolites importante pour la protection et l'amélioration des plantes pour leur rôle potentiel dans la résistance aux stress (Treutter, 2010). Cette classe de métabolites est présente *via* des molécules constitutives, des molécules antimicrobiennes et dans les voies de défense impliquées dans la signalisation (Dixon, 2001). L'activation de l'ensemble de la voie des phénylpropanoïdes contribue à plusieurs processus antioxydants, comme le clivage des molécules de ROS pour lequel l'acide caféique et l'acide chlorogénique se montrent plus efficaces que la vitamine C et le glutathion (Figure 18) (Kostyn *et al.*, 2012). Les phénylpropanoïdes sont des composés phénoliques, avec une fonction hydroxyle (–OH) et des esters et amides de l'acide hydroxycinnamique (Figure 19).

Cette activation conduit également au renforcement de la paroi végétale pour empêcher l'entrée de l'agent pathogène. Des molécules comme les lignines, les acides hydroxycinnamiques (HCAA), et les suberines sont impliquées dans ce renforcement. Certains auteurs soulignent que les principales sous-classes des phénylpropanoïdes liées à la défense sont les lignines, les coumarines et les flavonoïdes (Naoumkina *et al.*, 2010).

**La biosynthèse des phénylpropanoïdes** (Figure 20) commence par la l-phénylalanine à partir de la voie du shikimate. L'enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes est la « Phénylalanine Ammonia Lyase » (PAL) qui relie le métabolisme primaire au métabolisme secondaire. Cette enzyme catalyse la production de l'acide *trans*-cinnamique, premier métabolite de la voie et précurseur des acides benzoïques dont l'acide salicylique (Fraser and Chapple, 2011).

Dans la voie de biosynthèse, l'action de la PAL est suivie par celle de l'enzyme cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) et celle de l'enzyme 4-coumarate: CoA ligase (4CL), qui conduisent à la production d'acide p-coumarique et du p-coumaroyl Co-A, respectivement. A partir de ces métabolites seront produits les stilbènes et les flavonoïdes par la stilbène synthases (STS) et la chalcone synthase (CHS).



**Figure 20. Biosynthèse de la voie des phénylpropanoïdes chez *Arabidopsis* (Fraser and Chapple, 2011)**

Ce schéma montre les métabolites et les enzymes impliqués dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes. Les enzymes sont : PAL - phenylalanine ammonia lyase; C4H - cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL - 4-coumarate :CoA ligase; HCT - hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate:quinate hydroxycinnamoyl-transferase; C3'H - p-coumaroyl shikimate 3'hydroxylase; CCoAOMT - caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase; CCR - cinnamoyl-CoA reductase; F5H - ferulate 5-hydroxylase; COMT - caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase; CAD - cinnamyl alcohol dehydrogenase; HCALDH - hydroxycinnamaldehyde dehydrogenase. Les esters de ferulate et de sinapate esters sont catalysés par HCALDH.

L'hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate: quinate hydroxycinnamoyl-transferase (HCT) et p-coumaroyl shikimate 3'hydroxylase (C3'H) sont à l'origine des coumarines comme : le p-coumaroyl shikimate, le caffeoyl shikimate et le caffeoyl CoA. Ce dernier est transformé en feruloyl CoA par la caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT).

Suite à ces différentes synthèses, les lignines commencent à être synthétisée par deux enzymes principales : la cinnamoyl-CoA reductase (CCR) et la cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) (Figure 20) (Naoumkina *et al.*, 2010; Fraser and Chapple, 2011).

### **Le rôle des phénylpropanoïdes dans les réponses de défense :**

La **PAL** est souvent utilisée comme un marqueur de la défense des plantes principalement pour lier cette défense à l'activation de la voie des phénylpropanoïdes (Kröner *et al.*, 2011) et à la voie hormonale du SA (El Modafar *et al.*, 2012; Kim and Hwang, 2014). Sur des plantes de soja, la PAL se montre un régulateur positif de la réponse à l'infection par *Phytophthora sojae*. Son activation est possiblement liée à l'augmentation d'isoflavonoïdes antimicrobiens comme les glycécollines, le daidzéine, la génistéine et du SA (Zhang *et al.*, 2017).

De la même façon chez la tomate, Chandrasekaran *et al.* (2017) ont mis en évidence la diminution des symptômes causés par la bactérie pathogène *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* après traitement avec la bactérie *Bacillus subtilis*, associée à la forte augmentation (94% plus forte que le contrôle) des gènes *PR2* et principalement de la *PAL*. Cette forte augmentation contribuerait *via* les mécanismes d'activation des défenses de la plante à une résistance accrue à la bactérie.

Les **coumarines** jouent un rôle d'antimicrobiens et d'antioxydants. Dans la majorité des cas, ce sont les formes glycosylées qui sont plus présentes dans la cellule ce qui évite les effets toxiques de ces métabolites sous leur forme active. Le métabolite le plus connu pour ses fonctions antimicrobiennes est la scopolétine, une phytoalexine, et ses formes glycosylées (Figure 18) (Naoumkina *et al.*, 2010). Les études sur la scopolétine se concentrent majoritairement sur le modèle tabac (*Nicotiana tabaci*). Sun *et al.* (2014) ont montré que ce métabolite amène à une forte résistance *in vitro* contre le champignon nécrotrophe *Alternaria alternata* ainsi qu'*in vivo*, chez une espèce de tabac sauvage, *Nicotiana attenuata*. De plus, cette production de scopolétine est régulée par la voie du jasmonate. Toujours chez le tabac, il a été démontré que l'accumulation de la scopolétine est fortement corrélée (i) à une résistance acquise localisée induite par le virus de la mosaïque du tabac (Costet *et al.*, 2002) et (ii) à une

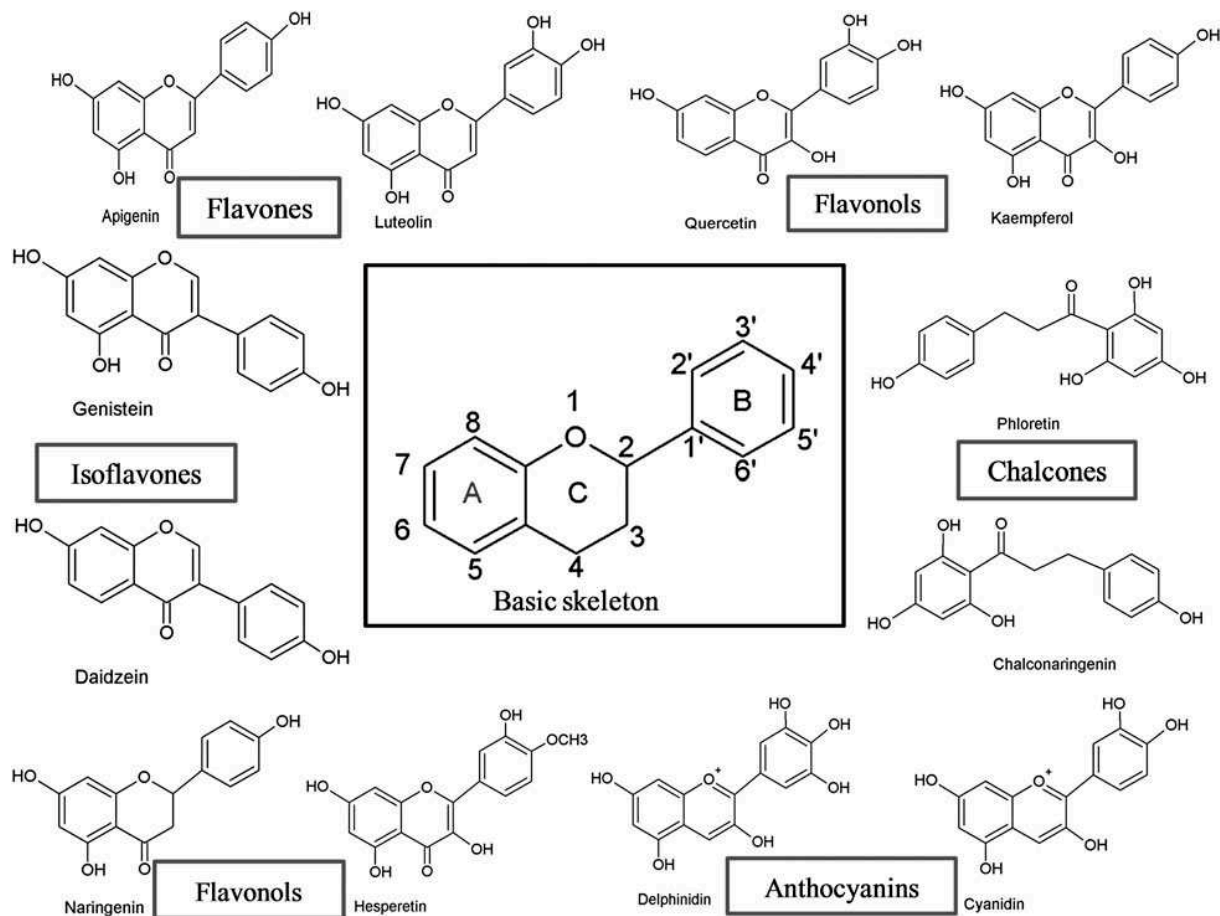




résistance contre *Botrytis cinerea* après infection des spores de l'agent pathogène. Dans ce dernier cas, le gène précurseur des gènes *PRs*, le *NPR1*, était fortement induit (El Oirdi *et al.*, 2010). Des éliciteurs de l'agent pathogène *Phytophthora palmivora* ont induit la scopolétine et d'autres composés phénoliques chez l'*Hevea brasiliensis*, ou « arbre à caoutchouc » ce qui a entraîné sur des jeunes plantes une résistance locale contre *P. palmivora* (Dutsadee and Nunta, 2008).

Les **HCAAs**, sont connus pour renforcer les défenses au niveau de la paroi végétale. L'augmentation des dépôts des HCAAs au niveau de la paroi cellulaire créent une barrière contre les agents pathogènes et diminue la digestibilité de la paroi. La production des HCAAs est réalisée dans le cytoplasme et ce sont ses biopolymères insolubles qui sont déposés entre la paroi cellulaire primaire et le plasmalemme (Macoy *et al.*, 2015). La phénylalanine et la tyrosine sont, par exemple, les précurseurs de la biosynthèse des HCAAs pour la réponse contre les herbivores et les agents pathogènes (Macoy *et al.*, 2015) mais d'autres acides aminés sont aussi liés à cette biosynthèse. Chez *Arabidopsis*, la résistance contre *Alternaria brassicicola* a été attribuée aux HCAAs comme la p-coumaroylagmatine, la feruloylagmatine, la p-coumaroylputricine et la feruloylputrescine, dont la biosynthèse est faite à partir des acides hydroxy-cinnamiques et l'agmatine ou la putrescine (Muroi *et al.*, 2009). Chez la pomme de terre, plusieurs HCAAs, le terrestriamide, le feruloylserotonin, le 4-coumaroyl-3-hydroxyagmatine, la feruloylagmatine, la 4-coumaroylagmatine, la N-feruloyltyramine, la p-coumaroyltyramine et la feruloylputrescine sont accumulés dans le génotype résistant après infection par *P. infestans* (Yogendra *et al.*, 2014). Ils pourraient donc participer à la résistance contre cet oomycète. Les HCAAs sont aussi impliqués dans la résistance du riz vis-à-vis de *Bipolaris oryzae* (Ishihara *et al.*, 2008), du blé contre *Fusarium graminearum* (Gunnaiyah *et al.*, 2012) et de l'oignon contre *Botrytis allii* (McLusky *et al.*, 1999).

**Les lignines** se positionnent aussi au niveau de la paroi végétale comme une barrière physique. La présence de lignines rend plus difficile l'entrée des champignons et oomycètes (Naoumkina *et al.*, 2010). Elles sont formées par des liaisons de trois monomères ou monolignols (Figure 18) : les alcools coumaryliques (précurseur des unités p-hydroxyphényles-H), coniférylique (précurseur des unités gâïacyles-G) et sinapylique (précurseur des unités syringles-S). Les deux principaux gènes responsables de la synthèse des lignines sont le *CCR* et le *CAD*. L'étude de deux génotypes d'olivier a montré que dans le génotype résistant à *Xylella fastidiosa*, la bactérie « tueuse » des oliviers décrite en Italie et plus récemment en France (EFSA Panel on Plant Health *et al.*, 2018), l'expression du gène *CCR* est fortement induite au



**Figure 21. Structures des flavonoïdes, d'après Panche et al. (2016)**

La structure de base des flavonoïdes est au milieu du schéma et aide à comprendre l'insertion des cycles aromatiques dans la molécule et la division des molécules dans les sous-classes. Les sous-classes sont déterminées par l'insertion du carbone du cycle C au cycle B et d'oxydation du cycle C.

niveau du tronc infecté (Sabella *et al.*, 2018). Ce résultat suggère un important rôle des lignines dans la résistance à la bactérie. Au contraire, dans le génotype sensible les gènes *4CL* et *C4H*, liés à la voie des phénylpropanoïdes et la synthèse de SA sont réprimés. De la même façon, la résistance des plantes de blé au champignon nécrotrophe *Rhizoctonia cerealis* a diminué considérablement après la suppression du gène *CAD* (*TaCAD12*) tandis que l'induction de ce gène, sur d'autres lignées transgéniques, a amélioré nettement la résistance contre le pathogène (Rong *et al.*, 2016).

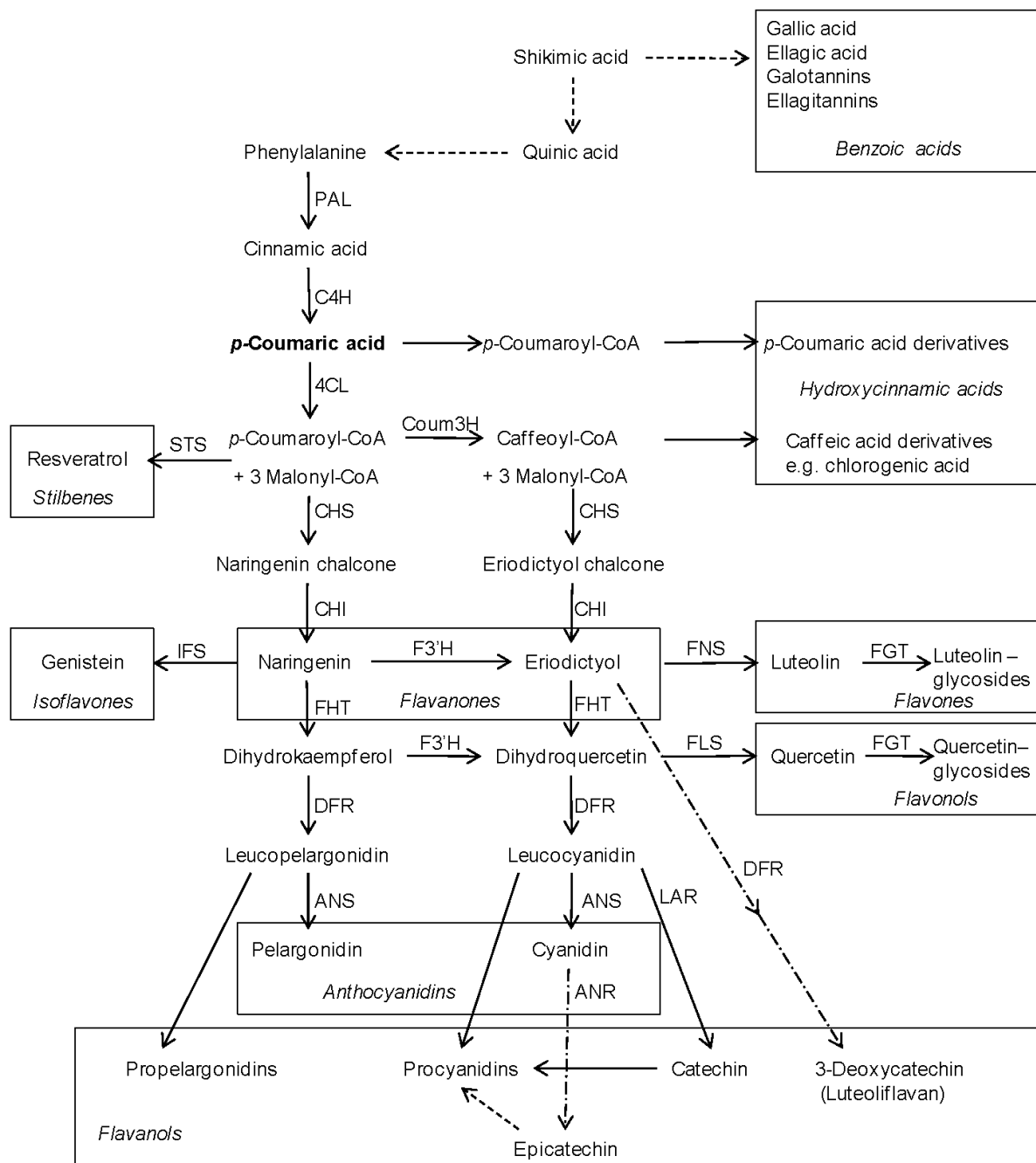
Etonnamment, si l'augmentation de la teneur en lignines est importante pour empêcher les agents pathogènes d'entrer, la diminution de ces composés peut aussi entraîner indirectement une résistance chez la luzerne à un pathogène fongique *Colletotrichum trifolii* (Zhao and Dixon, 2014). Cet effet peut s'expliquer par le fait que les molécules de lignines reléguées dans la cellule peuvent être un signal de déclenchement d'autres réponses de défense (Gallego-Giraldo *et al.*, 2018) se comportant ainsi comme des DAMPs.

### 2.1.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont connus par leur effet de protection aux stress biotique et abiotique, ainsi que par les anthocyanes (pigments naturels) qui aident à la reproduction des plantes attirant les pollinisateurs (Winkel-Shirley, 2002). Les flavonoïdes représentent la plus grande classe des phénylpropanoïdes avec 10.000 structures identifiées (Naoumkina *et al.*, 2010).

**Les différences de structures chimiques** des métabolites au sein de cette voie sont utilisées pour diviser la classe des flavonoïdes en 3 sous-classes. La structure basique d'un flavonoïde possède majoritairement trois cycles aromatiques notés A, B et C sur la figure 21. La position de l'insertion du deuxième cycle (B) sur le troisième est un des critères pour déterminer les sous-classes de flavonoïdes: les **isoflavonoïdes** ont le cycle B lié au cycle C en position 3 ; les **néoflavonoïdes** ont le cycle B lié au C en position 4 ; et **les flavonoïdes** ont le cycle B lié en position 2. Ces derniers sont encore subdivisés en d'autres sous-classes (Figure 21): les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavononols, les catechines, les anthocyanidines et les chalcones (Panche *et al.*, 2016). L'ensemble de ces sous-classes n'est pas présent dans toutes les espèces de végétaux.

**La biosynthèse des flavonoïdes** commence à partir de l'acide cinnamique issu de la voie des shikimates (Figure 22) et de ses dérivés (l'acide p-coumarique, p-coumaroyl-CoA et 3 malonyl-CoA) (Treutter, 2010). La chalcone synthase (CHS), première enzyme de la biosynthèse des flavonoïdes (Dao *et al.*, 2011), catalyse la synthèse de la naringénine chalcone,



**Figure 22. Biosynthèse des composés phénoliques: les flavonoïdes, d'après Treutter (2010).**

Ce schéma montre les métabolites et les enzymes qui composent la biosynthèse des composés phénoliques, les flavonoïdes. Les enzymes sont : PAL - phenylalanine ammonia lyase ; C4H - cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL - p-coumarate:CoA ligase ; Coum3H - coumaroyl 3-hydroxylase ; STS - stilbene synthases ; CHS - chalcone synthase ; CHI - chalcone isomerase ; FHT - flavanone 3-hydroxylase ; IFS - isoflavone synthase ; FNS - flavone synthase ; FGT - flavonoid glycosyltransferase ; F3'H - flavanone 3'-hydroxylase ; FLS - flavonol synthase ; DFR - dihydroflavonol 4-reductase ; ANS - anthocyanidin synthase ; ANR - anthocyanidin reductase ; LAR - leucoanthocyanidin reductase.

le principal composé de cette voie. A partir de cette molécule, la chalcone isomerase (CHI) conduit à la naringénine, molécule centrale à partir de laquelle les différentes classes de flavonoïdes vont diverger :

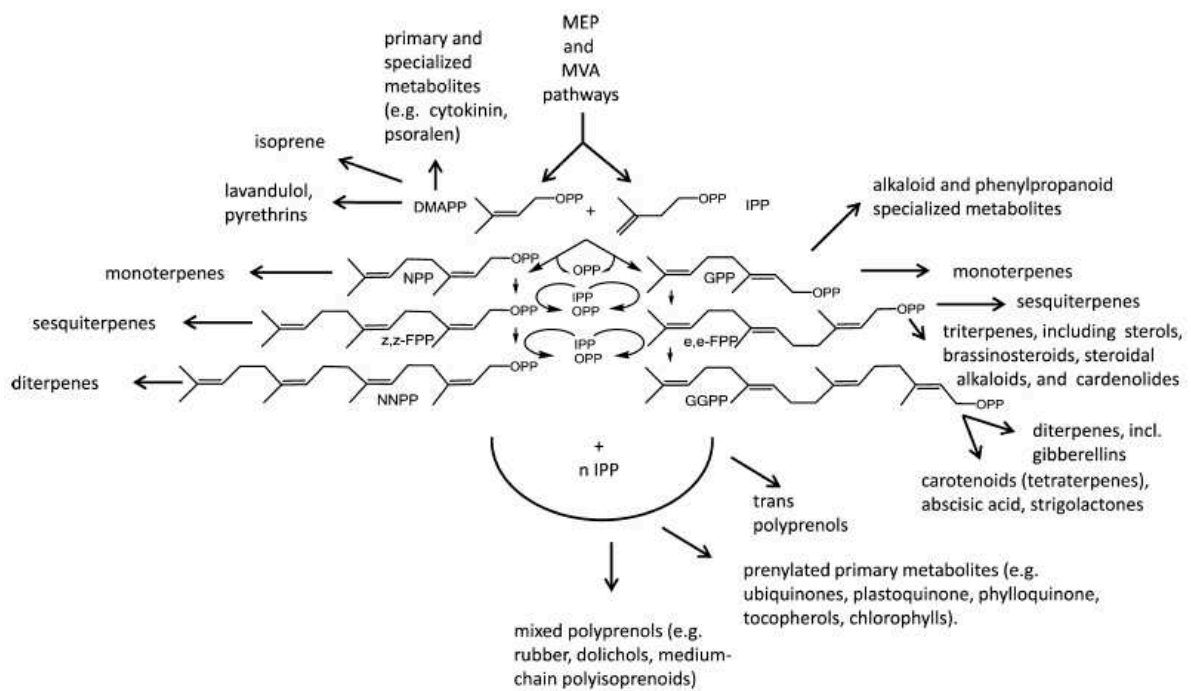
- La flavonone 3'-hydroxylase (F3'H) est responsable de la formation des flavonones ;
- L'isoflavone synthase (IFS) catalyse la réaction pour former les isoflavonoïdes ;
- La flavanone 3-hydroxylase (FHT) avec la dihydroflavonol 4-reductase (DFR) et l'anthocyanidine synthase (ANS) participent à la synthèse des anthocyanes. Les flavonols peuvent être synthétisés à partir de l'ANS, la DFR et la leucoanthocyanidin reductase (LAR) ou après les flavonones *via* l'enzyme flavonol synthase (FLS). La flavone synthase (FNS) est à l'origine des flavones. La flavonoïde glycosyltransferase (FGT) a la double fonction de catalyser les réactions chez les flavones et flavonols (Treutter, 2010; Dao *et al.*, 2011).

### Les rôles des flavonoïdes dans les réponses de défense :

La **CHS** est l'enzyme clé de la voie des flavonoïdes, comme la PAL l'est pour les phénylpropanoïdes (Dao *et al.*, 2011). Elle permet à la plante de produire les molécules de protection. Les flavonoïdes sont impliqués dans la protection des plantes à des stress abiotiques. Ce rôle a été mis en évidence chez le maïs dont la résistance à l'aluminium a été augmentée *via* la libération de catéchine dans le sol, la catéchine formant un complexe avec l'aluminium (Kidd *et al.*, 2001). La régulation des gènes de la biosynthèse des flavonoïdes (*PAL*, *C4H* et *CHS*) sur plantes de *Petunia* augmente la protection contre les rayons UVB (Ryan *et al.*, 2002).

Les flavonoïdes sont des antimicrobiens et montrent des effets contre les stress biotiques. Ainsi, chez la tomate, la production de flavonoïdes vient en réponse à la bactérie pathogène *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Sur des tests *in vitro*, les flavonoïdes comme la naringénine, ont induit la perte des flagelles de la bactérie, l'inhibition de l'expression et de l'organisation du système de sécrétion fonctionnel de type III (Vargas *et al.*, 2013).

La classe des **isoflavonoïdes** est assez peu décrite chez les plantes, elle a été identifiée chez le soja et quelques légumineuses (Panche *et al.*, 2016). Le rôle des isoflavonoïdes dans la défense a été montré dans le pathosystème soja (*Glycine max* (L.) Merrill) / *Sclerotinia sclerotiorum*. En effet, l'accumulation d'isoflavonoïdes comme la daidzéine, la génistéine l'acetyl glycitine dans les feuilles de soja, après élévation avec du calcium a été une réponse à l'inoculation du champignon *Sclerotinia sclerotiorum* (Arfaoui *et al.*, 2016). De plus, la souche



**Figure 23. Les classes de terpènes et leur origine des blocs constitutifs de l'isoprène DMAPP et IPP. Schéma d'après Pichersky et Raguso (2018)**

Dans les plantes les composés des sous-familles de la voie des terpénoïdes sont synthétisés à partir de deux voies : la voie du MEP qui se produit dans les plastides et commence par le pyruvate et glyceraldehyde-4-phosphate ; et la voie du MVA qui se produit principalement dans le cytosol et commence avec l'acetyl-CoA.

agressive de cet agent pathogène induit les gènes de la voie des isoflavones (*CHS3*, *CHS5*, *CHI1B1-CHI1B2*, *IFS2* and *IFR2* : isoflavone reductase). Cette induction des isoflavonoïdes a réduit le pourcentage des symptômes par rapport au contrôle (Arfaoui *et al.*, 2016).

La bibliographie concernant l'effet des **neoflavonoïdes** contre les agents pathogènes des plantes est limitée. Le 4',7-Dimethoxyisoflavone a des propriétés antimicrobiennes *in vitro* contre plusieurs pathogènes des plantes, *Alternaria melongenae*, *A. brassicicola*, *A. brassicae*, *Curvularia maculans*, *C. pallenscens*, *C. lunata*, *Curvularia* species, *Colletotrichum* species, *Helminthosporium penniseti* et *H. speciferum* (Pandey *et al.*, 2002). Cette classe de flavonoïdes semble davantage cibler sur les maladies humaines pour ses effets anti-inflammatoires (Sundur *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2017).

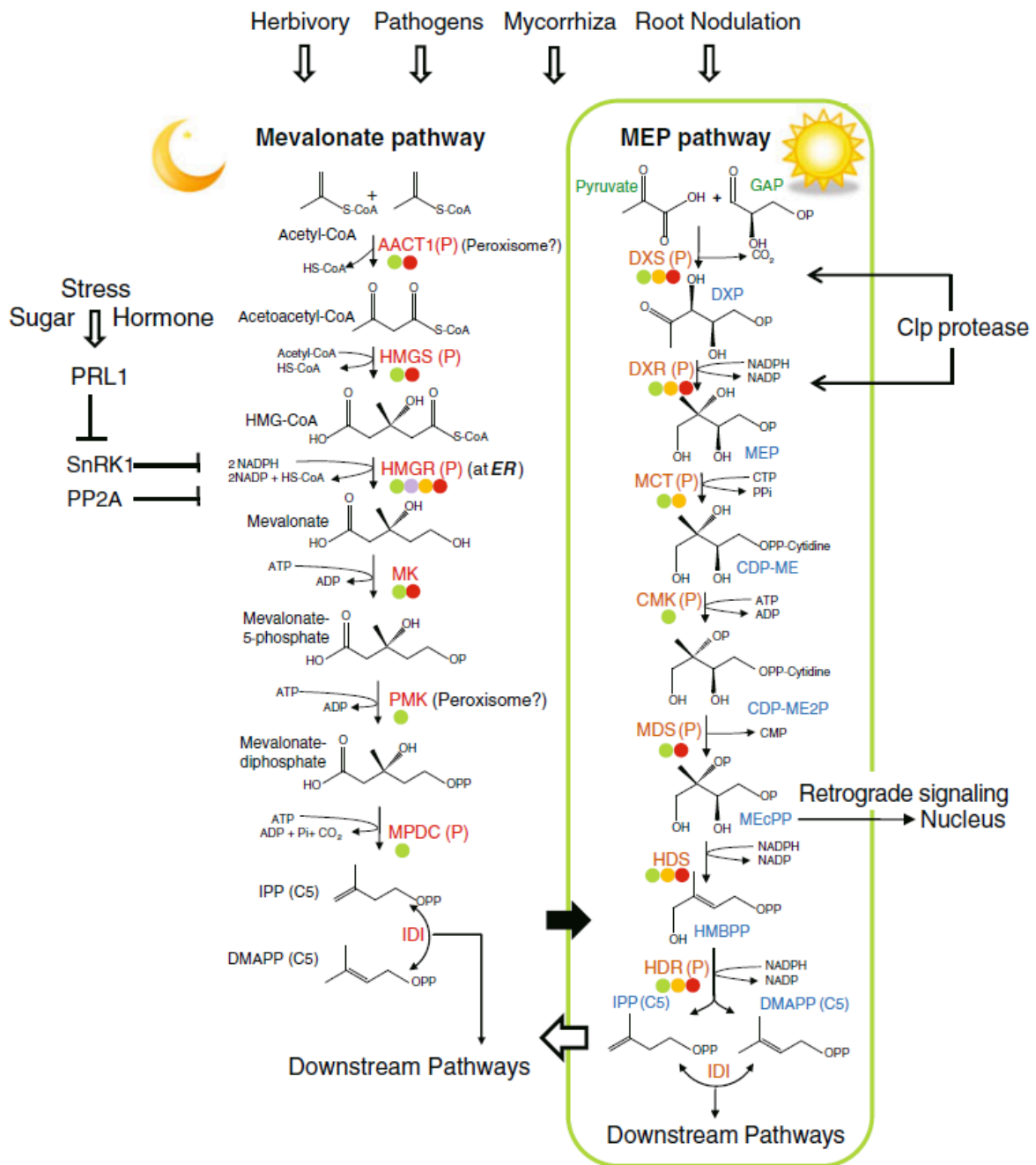
Les métabolites des **sous-classes des flavonoïdes** sont par contre assez étudiés pour leurs effets contre les agents pathogènes des plantes. Par exemple, la rutine, un flavonol, étudié pour ses propriétés antimicrobiennes chez les plantes mais aussi pour ses propriétés anti-inflammatoire et anti-oxydante chez l'Homme, inhibe par contact direct la croissance *in vitro* de la bactérie *Pectobacterium atrosepticum*, agent de la pourriture molle sur pomme de terre, et la croissance mycelienne de *P. infestans* (Kröner *et al.*, 2012). La rutine inhibe également la croissance *in vitro* du champignon *Verticillium dahliae* qui attaque les oliviers (Báidez *et al.*, 2007). Par contre, elle ne présente pas d'effet *in vitro* contre les champignons *Alternaria alternata*, *B. cinerea* et *Fusarium solani*, (Kalinova and Radova, 2009).

La sous-classe des **anthocyanidines** joue aussi en rôle dans la défense des plantes contre les agents pathogènes. La résistance de la tomate contre le champignon *B. cinerea* est dépendante de l'accumulation des anthocyanes qui altèrent la production de ROS pendant l'infection (Zhang *et al.*, 2013). De la même façon, la présence des anthocyanes dans les mangues accroît leur résistance au champignon *Colletotrichum gloeosporioides* et parallèlement diminue le stress lié au froid (Sivankalyani *et al.*, 2016).

## 2.2 Les terpenoïdes

Les terpenoïdes sont à l'interface entre le métabolisme primaire et secondaire. Leurs fonctions dans le métabolisme primaire sont liées, par exemple, à la production des phytohormones et des métabolites antioxydants. Au niveau du métabolisme secondaire, ils sont principalement liés à la défense contre les herbivores et les bio-agresseurs (Pichersky and Raguso, 2018).





**Figure 24. La synthèse des voies du MVA et MEP avec les enzymes et métabolites y participants. Schéma d'après Tholl (2015)**

Des points colorés indiquent les différents niveaux de régulation de chaque enzyme en fonction de l'état actuel des connaissances: vert - transcriptionnel, violet - post-transcriptionnel, jaune - translatif, rouge - post-traductionnel. Les flèches indiquent un trafic préférentiel de précurseurs isoprénoides entre le cytosol et les plastides dans les tissus exposés à la lumière (blanc) et au noir (noir). Les abréviations pour les enzymes (rouge) et les métabolites (voie noire-MVA ; voie bleu-MEP).

Les terpénoïdes présentent des **structures spécifiques** (Figure 23) : Les monoterpénoïdes (10C) sont constitués de deux isoprènes à cinq carbones, les sesquiterpénoïdes de 15C et les diterpènes de 20C. La condensation des isoprènes forme les *trans*-phenyl diphosphate et *cis*-phenyl diphosphate. Ces structures permettent la formation des triterpènes (30C), comme les stéroïdes, et de deux *trans*-sesquiterpenyl diphosphates. Les tetraterpènes (40C), comme les caroténoïdes sont formés par deux *trans*-diterpenyl diphosphates (Pichersky and Raguso, 2018). Ces terpènes dérivent de deux précurseurs : l'isopentenyl diphosphate (IPP) et l'allylic isomer dimethylallyl disphosphate (DMAPP). Ces métabolites sont formés à partir de deux voies indépendantes, la voie de l'acide mévalonique (**MVA**), dans le cytosol de la cellule et la voie du méthyle-erythritol phosphate (**MEP**), dans les chloroplastes (Figure 24).

La **voie du MVA** (Figure 24) commence par la condensation de deux molécules d'acetyl-CoA et d'acetoacetyl-CoA, réaction catalysée par l'acetoacetyl-CoA thiolase (AACT). Ensuite, les enzymes S-3-hydroxy-3-methylglutaryl synthase (HMGS) et HMG réductase (HMGR) catalysent la production du mévalonate ou acide mévalonique. Les réactions continuent jusqu'à la production de l'IPP et du DMAPP (Tholl, 2015). Cette voie est à l'origine des classes des sesquiterpènes, des polyprénols, des phytosterols, des brassinostéroïdes, des triterpénoïdes, ainsi que de la biosynthèse des terpenoïdes dans les mitochondries.

Le premier métabolite de la **voie du MEP** (Figure 24) est le 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), formé par l'enzyme DXP synthase (DXS) à partir d'un composé dérivé du pyruvate et du glyceraldehyde-3-phosphate (GAP). Les différentes réactions impliquées dans cette voie vont conduire à la formation de l'IPP et du DMAPP. Ces produits seront aussi à l'origine de la biosynthèse des hémiterpénoïdes, des monoterpénoïdes, des diterpénoïdes, des caroténoïdes et de plusieurs produits de dégradation, comme les cytokinines et les gibbérellines (Tholl, 2015).

### **Les rôles des terpenoïdes dans la défense :**

L'enzyme **HMGR** est considérée comme une enzyme clé dans la régulation de la voie du **MVA**. Ainsi, plusieurs travaux de recherche réalisés sur coton, tabac et salade, réunis dans la revue d'Ashour *et al.* (2010) montrent que HMGR est pour partie responsable de la production des stérols, même si d'autres enzymes interviennent aussi dans cette biosynthèse. Par contre, chez *Arabidopsis*, l'activation d'HMGR n'a pas induit l'accumulation des stérols et d'autres terpènes soulignant que l'action d'HMGR est dépendante de l'espèce étudiée.

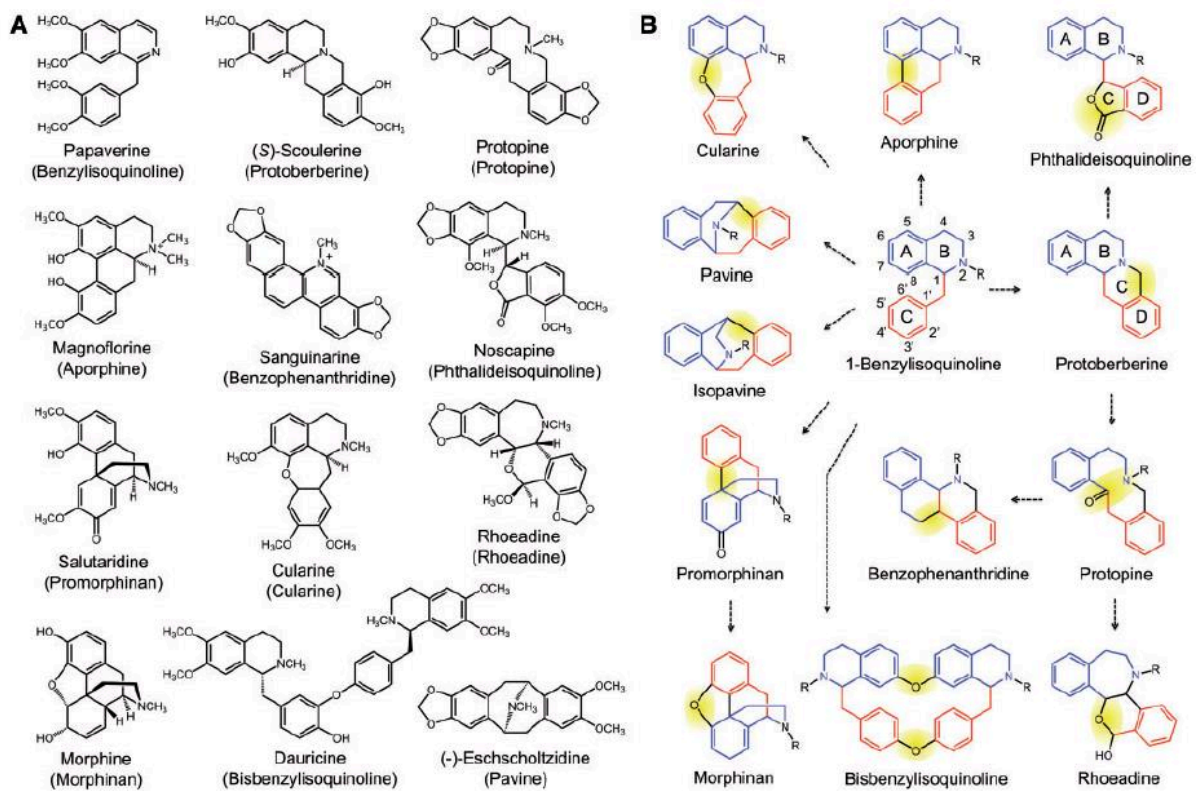


Dans la voie du MVA, les **sesquiterpènes**, par exemple, sont liés à la résistance des plantes contre les agents pathogènes. *Plasmopara viticola*, l'oomycète agent causal du mildiou chez les vignes, a été testé sur des génotypes résistants et sensibles. Son inoculation a augmenté significativement l'émission de sesquiterpènes et de monoterpènes chez les génotypes résistants, mais pas chez le génotype sensible (Algarra Alarcon *et al.*, 2015). Chez *B. lactucae*, la lettucenine A, un sesquiterpène considéré comme une phytoalexine, est liée directement à la réponse de défense HR, contre *P. syringae* pv *phaseolicola*. En plus, de fortes concentrations dans les feuilles ont limité la croissance du pathogène *B. cinerea* (Bennett *et al.*, 1994). Une autre phytoalexine de la famille des sesquiterpènes, le capsidiol, identifié chez les solanacées comme le tabac et le piment d'ornement (*Capsicum annuum*), est responsable de la résistance de ces plantes contre des agents pathogènes (Ahuja *et al.*, 2012).

Dans le cas du tabac, le capsidiol s'est accumulé dans les cultures de cellules et est lié à la HR après infection par *Phytophthora nicotianae* et *P. palmivora* (Perrone *et al.*, 2003).

L'enzyme **DXS** régule la voie du **MEP** et par conséquent les composés de la sous-classe des terpènes qui proviennent de cette voie. Chez la pomme de terre, une étude menée sur le gène *StDXS1*, a montré que la croissance de *P. infestans* coïncide avec la suppression de ce gène et ensuite à l'apparition des symptômes de la maladie (Henriquez *et al.*, 2016). Ces auteurs ont fait l'hypothèse que la suppression de *StDXS1* conduit à la réduction de métabolites (rishitinol, rishitine, lubimine, phytuberine,  $\alpha$ -solanine,  $\alpha$ -chaconine, solanidine, abscisic acid et autres) qui contribuent à la protection des plantes contre cet agent pathogène.

Les **monoterpènes** incluent beaucoup de molécules considérées toxiques vis-à-vis des bioagresseurs. Ils peuvent être utilisés comme fongicides et principalement comme insecticides. Mais chez *Arabidopsis*, l'utilisation des monoterpènes comme l'allo-ocimène, ainsi que les aldéhydes C6, comme éliciteurs, induisait des gènes de défense et rendait la plante résistante contre *B. cinerea* (Kishimoto *et al.*, 2005). Le champignon du haricot, *Colletotrichum lindemuthianum* a vu la germination des conidies inhibée par le monoterpène limonène en test *in vitro* (Quintana-Rodriguez *et al.*, 2015). Produit aussi par la voie du MEV, les **diterpènes**, comme les momilactones A et B, peuvent aussi avoir une efficacité contre les agents pathogènes. Ces métabolites sont des phytoalexines trouvées sur les plantes de riz. Hasegawa *et al.* (2010) ont infecté des plantes de riz avec le champignon *Magnaporthe oryzae* et ils ont vérifié deux jours après l'inoculation la présence de HR chez les plantes résistantes. Cette réaction était dûe à l'accumulation des phytoalexines seulement chez les plantes résistantes.



*Figure 25. Exemples de métabolites de la famille des benzyloquinoléine alcaloïdes (A) et les structures des différents composés de cette famille (B). Schéma d'après Hagel and Facchin (2013).*

### 2.3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de métabolites diversifiés comprenant des composés azotés de faible poids moléculaire et des dérivés des acides aminés. Dans les plantes, ils jouent un rôle dans la défense contre les herbivores et les agents pathogènes. Environ 12.000 métabolites de cette famille sont connus et les sous-familles sont organisées d'après les différentes structures des alcaloïdes (Ziegler and Facchini, 2008). Compte tenu de la complexité des familles des alcaloïdes, nous avons choisi de présenter ci-dessous des exemples de métabolites de chaque sous-famille qui participent à la défense des plantes.

Les métabolites de la sous-famille des **benzylisoquinoléine alcaloïdes** (BIA) ont une grande importance dans la pharmacologie : c'est le cas des analgésiques –comme la morphine et la codéine et des antimicrobiens – la sanguinarine et la berberine (Figure 25A). A l'origine de cette famille sont la dopamine et le 4-hydroxyphénylacétaldéhyde (4-HPAA), dérivés de la tyrosine. Ces métabolites sont condensés par une réaction de type Pictet-Spengler<sup>1</sup> et catalysés par l'enzyme norcoclaurine synthase (NCS) ce qui résulte dans la formation de (S)-norcoclaurine. La figure 25B montre dans la **structure des benzylisoquinoles** : les fractions dérivées de la dopamine (en bleu), la fraction du 4-HPAA (en rouge) et les liaisons C-C ou C-O (en jaune) ; ces trois fractions définissent chaque sous-groupe structural des BIA (Figure 24B) (Hagel and Facchini, 2013).

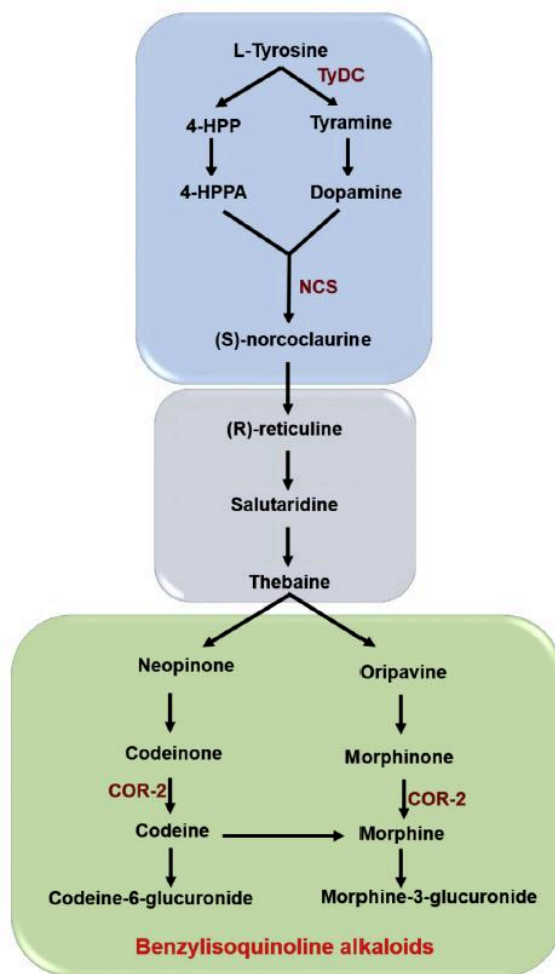
La **biosynthèse des BIAs** commence par le métabolite (S)-norcoclaurine et se poursuit jusqu'à la production de la (S)-reticuline. Ces réactions sont catalysées par les gènes « 6-O-méthyltransferase » (*6OMT*), « coclaurine N-méthyltransferase » (*CNMT*) et « 3'-hydroxy-N-méthylcoclaurine 4'-O-méthyltransferase » (*4'OMT*). La (S)-reticuline est le métabolite central pour la production de la sanguinarine, la noscapine, la berberine et la morphine.

#### **Les rôles des benzylisoquinoléine alcaloïdes dans la défense :**

Un des représentants les plus connus de cette famille est la morphine par son effet d'analgésique, beaucoup utilisé en médecine. Ce métabolite a été trouvé en grand quantité dans les plantes de *Papaver somniferum*, l'opium (Wittstock and Gershenzon, 2002). La morphine joue aussi un rôle dans la protection de cette espèce contre des agents pathogènes. Chez *P. somniferum*, après un dégât mécanique, la morphine a été métabolisée en bis-morphine qui s'accumule dans la paroi végétale où elle s'intègre à la pectine.

---

<sup>1</sup>La réaction de Pictet-Spengler est une réaction chimique dans laquelle un  $\beta$ -aryléthylamine subit une condensation avec un aldéhyde ou une cétone suivie d'une fermeture de cycle.



*Figure 26. Synthèse des benzyloquinoléine alcaloïdes chez la pomme de terre. Schéma d'après Yogendra et al. (2017)*

Cette réaction est possible avec la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de peroxidases dans la cellule qui vont déclencher la métabolisation de bis-morphine. En renforçant la paroi végétale, l'action des enzymes pectinases est par conséquent plus difficile (Morimoto *et al.*, 2001).

Récemment, cette fonction de la morphine et d'autres métabolites de la famille BIA a été clarifiée chez la pomme de terre par Yogendra *et al.* (2017). Après infection par *P. infestans*, les plantes ont induit les gènes *tyrosine decarboxylase*, *NCS*, *codeinone reductase 2* ; et les métabolites morphinone, morphine-3-glucuronide, codeine-6-glucuronide (Figure 26), berbaminine et guattegaumerine.

Les mutants d'*Arabidopsis* ont permis de mettre en évidence que la régulation des gènes et métabolites de la famille des BIAs est faite *via* le facteur de transcription *StWRKY8*. Chez *Coptis japonica*, le facteur de transcription *CjWRKY1* est aussi démontré comme régulateur de la famille des BIAs (Yamada and Sato, 2016).

Les **alcaloïdes tropaniques** et la **nicotine** ont la même origine. Ils sont synthétisés à partir de la méthylation de la putrescine en *N*-méthylputrescine, réaction catalysée par l'enzyme putrescine *N*-méthyltransferase (Ziegler and Facchini, 2008). Dans la défense des plantes, la nicotine est le métabolite plus connu.

### **Les rôles de la nicotine dans la défense :**

La **nicotine** est le principal métabolite des espèces de *Nicotiana*. L'action de la nicotine impacte fortement les insectes. L'attaque de *Spodoptera exigua*, un lépidoptère, herbivore généraliste sur plantes de *Nicotiana attenuata*, le tabac sauvage, a induit la production de nicotine et d'inhibiteurs de la trypsine protéinase (TPI). Les plantes mutantes avec une carence en nicotine ont été plus attaquées par le ravageur (Steppuhn and Baldwin, 2007). La synthèse de la nicotine est réalisée dans les racines. Suite à l'attaque des ravageurs dans les feuilles, la voie du JA est induite et donne le signal pour la production de la nicotine dans les racines. Les auteurs, Halitschke et Baldwin (2003) ont démontré que l'inhibition de la voie du JA et principalement d'une famille des gènes de lipoxygénase (LOX) réduisent la résistance du tabac contre les ravageurs. Contre les agents pathogènes, comme *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, le tabac peut aussi produire de la nicotine et d'autres métabolites comme des acides aminés. Cependant, la voie de signalisation activée dans l'étude était le SA (Vogel-Adghough *et al.*, 2013).





Les **alcaloïdes puriniques** sont dérivés des nucléotide puriniques et synthétisés à partir de la *N*-méthylation de la position 7 de la xanthosine en 7-méthylxanthosine par l'enzyme 7-*N*-methyltransferase (Ziegler and Facchini, 2008). La caféine fait partie de cette famille de métabolites.

### **Les rôles des alcaloïdes dérivés de la purine dans la défense :**

L'implication de ces alcaloïdes dans la défense a été mise en évidence chez le tabac face au virus de la mosaïque et à la bactérie *P. syringae*. En effet, des plantes transgéniques de tabac qui produisaient de hautes doses de caféine ou de 1,3,7-triméthylxanthine se montraient résistantes au virus et à la bactérie.

Après infection par ces agents pathogènes, les protéines PR1a et PR2 sont plus fortement exprimées dans les plantes transgéniques que dans les plantes sauvages. De plus, ces plantes sont aussi résistantes contre l'insecte *Spodoptera litura*. Ces plantes plus résistantes exprimaient de façon constitutive le gène *PR1* et l'inhibiteur de protéinase II (Kim and Sano, 2008).

Les **alcaloïdes pyrrolizidine** sont responsables de la défense contre les herbivores. Cette sous-famille des alcaloïdes est synthétisée à partir de la spermidine et de la putrescine pour former l'homospermidine. La réaction est catalysée par l'enzyme homospermidine synthase (Ziegler and Facchini, 2008).

### **Les rôles des alcaloïdes pyrrolizidine (PA) dans la défense :**

Les études sur cette sous-famille d'alcaloïdes montrent que pour les plantes productrices des PAs comme le *Jacobaea vulgaris*, la relation avec la résistance contre les agents pathogènes aériens est complexe (Joosten and van Veen, 2011). En effet, dans cette plante, de hautes concentrations en PAs augmentent les dégâts causés par le champignon *Puccinia dioicae* mais étonnamment, la diminution de ces concentrations augmente aussi la croissance du mycélium du champignon *Puccinia lagenophorae* (Hol *et al.*, 2003). Cependant, les PAs participent à la protection contre des microorganismes du sol. Les concentrations de PAs et principalement les alcaloïdes, jacobine et seneciphylline, sont fortement produits après l'attaque (Joosten and van Veen, 2011). Les auteurs Kowalchuk *et al.* (2006) ont montré également que sur *J. vulgaris*, la production élevée de PAs, dont la jacobine était la principale source, a empêché le développement de micro-organismes. La rhizosphère de ces plantes à forte teneur en PAs



présente une diversité de champignons plus faible que celle des plantes non productrices ou à PAs faible.

Les **monoterpènes indole alcaloïdes** (MIA) ont un précurseur commun : la strictosidine formée par une condensation d'un fragment indole azoté dérivé de la tryptamine et de la sécologanine. Le tryptophane est converti en tryptamine par l'enzyme la tryptophan-décarboxylase (TDC) (Ziegler and Facchini, 2008). Les MIAs sont trouvés chez les Apocynaceae, Loganiaceae, Rubiaceae et Nyssaceae. L'espèce *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) est considérée comme la plante modèle pour l'étude de cette famille (Matsuda *et al.*, 2005).

### **Les rôles des monoterpènes indole alcaloïdes dans la défense :**

Les concentrations des MIAs sont très faible dans les *C. roseus* mais les stress biotiques et abiotiques vont induire leurs productions. Raina *et al.* (2012) ont démontré que le CrMPK3, qui participe à la cascade de signalisation de défense contre des agents pathogènes, par exemple, se déplace vers le noyau lors d'une blessure, d'un traitement UV ou de l'application de MeJA. L'induction transitoire de CrMPK3 dans les plantes a montré une meilleure expression des gènes clés de la biosynthèse des MIAs et une accumulation de leurs métabolites.



## IV. Mobilisation de la PTI en protection des plantes

Le système immunitaire des plantes est capable de produire des réponses efficaces contre les agents pathogènes, comme expliqué précédemment. En résumé, après perception du stress, l'ensemble des réactions de défense activées en cascade, au sein de la PTI, peut conduire, chez la plante, à une résistance induite. Les molécules inductrices de la PTI sont les PAMPs/MAMPs et les DAMPs. Cependant, des molécules exogènes de différentes origines (naturelle ou synthétique, organique ou minérale) sont aussi capables d'induire les réponses de défense de la PTI par mimétisme des molécules déjà connues par la plante. L'ensemble des molécules inductrice des défenses des plantes est couramment défini sous le terme « éliciteurs ». Ils appartiennent à différentes catégories présentées ci-dessous.

### 1. Eliciteurs des agents pathogènes

Les PAMPs/MAMPs comme la flg22, l'Et-Tu, sont bien décrits dans cette revue bibliographique. Ces PAMPs purifiés sont utilisés pour comprendre les mécanismes de l'immunité des plantes modèles, mais ils ne sont pas utilisés en terme de protection des plantes. Par contre, ils sont particulièrement intéressants car ils miment l'action de l'agent pathogène sans en causer les symptômes.

La harpine, extraite de la bactérie *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien, a été le premier éliciteur bactérien découvert et capable d'induire de la HR. La harpine fait partie d'une famille de protéines riches en glycine, mais ne contenant pas de cystéine. Elles sont sécrétées par le système de sécrétion de type III (Wei and Betz, 2006). Lucon *et al.* (2010) ont testé le produit commercial Messenger<sup>®</sup> dont le principe actif est la harpine, contre *Guignardia citricarpa*, agent de la tache noire des agrumes. Ce produit diminue de 62% les symptômes de ce champignon sur les oranges. Le traitement des melons par ce produit, induit une résistance contre *Alternaria alternata* et *Fusarium* spp (Wang *et al.*, 2011a). La résistance a été attribuée à l'activation de la POX, la PAL, la PR2 et la chitinase dans les fruits traités.

De la même façon, les composant de la membrane externe des bactéries Gram négatif, les lipopolysaccharides (LPS) peuvent induire des réponses de défense. Ils sont composés de trois parties : un lipide, un oligosaccharide et une chaîne polysaccharidique terminale l'antigène-O.



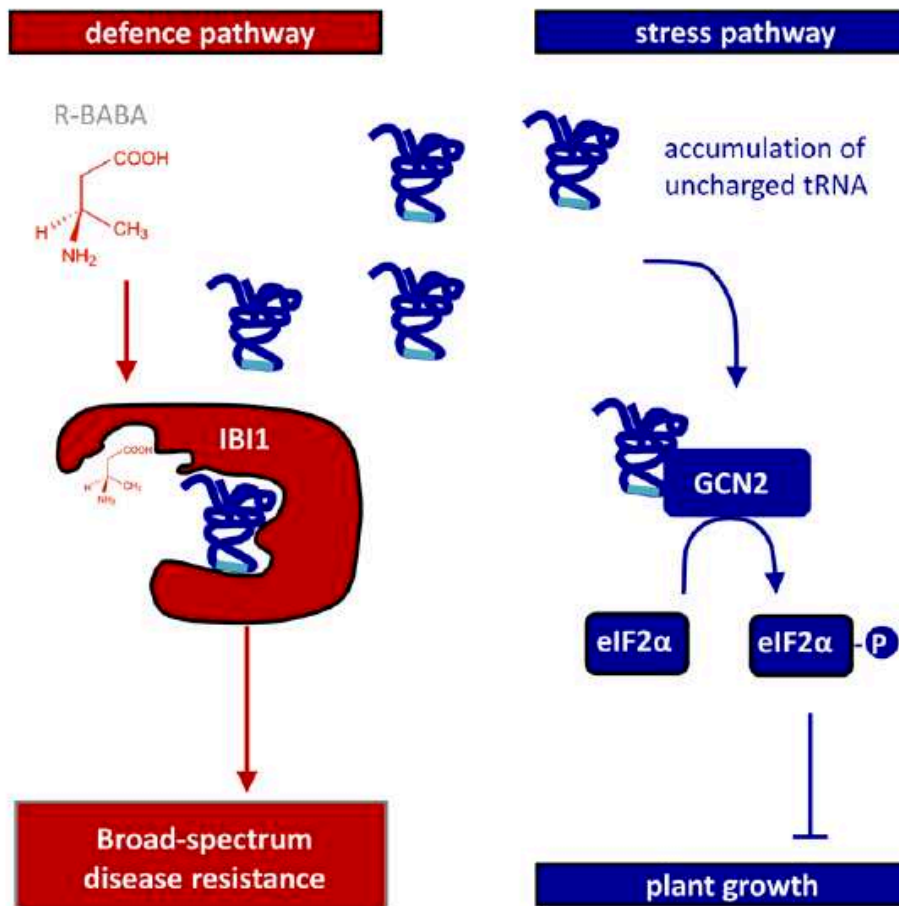
La bactérie pathogène hémibiotrophe, *Xylella fastidiosa*, causant la maladie de Pierce chez la vigne, possède un antigène-O à longue chaîne qui lui permet de retarder la reconnaissance initiale des plantes. Rapicavoli *et al.* (2018) ont démontré que le traitement préalable des plantes avec ce LPS induit la production des ROS et confère une résistance contre *X. fastidiosa*.

## 2. Eliciteurs synthétiques

Les éliciteurs synthétiques sont de petites molécules structurellement différentes des molécules naturelles mais ils sont aussi capables d'induire les défenses des plantes (Bektas and Eulgem, 2015). Les éliciteurs synthétiques les plus connus sont les phytohormones synthétisées comme, le SA ou ses analogues comme le benzothiadiazole ou BTH. D'autres molécules sont beaucoup étudiées sur certaines cultures comme l'acide  $\beta$ -aminobutyrique (BABA) chez la pomme de terre.

Le **BTH**, un analogue du SA, a été bien étudié contre les maladies fongiques (Achuo *et al.*, 2004). C'est un des produits commercialisés en tant que SDP (Stimulateur de Défenses des Plantes), comme la laminarine. Il va mimer l'action du SA, cependant c'est une molécule moins toxique et plus efficace que le SA (Bektas and Eulgem, 2015). Chez la vigne, l'application de BTH augmente la production des anthocyanes, principalement la malvidine 3-glucoside, la malvidine 3-(6-O-acetyl) glucoside et la malvidine 3-(6-O-p-coumaroyl) glucoside ainsi que le resvératrol, une phytoalexine de la famille des stilbènes dévirés des phénylpropanoïdes. Une diminution significative des symptômes du champignon *B. cinerea* est attribuée à ces composés (Iriti *et al.*, 2004) et à d'autres composés phénoliques (Bellée *et al.*, 2018). D'autres auteurs ont identifié l'induction des stilbènes, mais également l'induction des gènes *PRs* après l'application du BTH. Ainsi, les gènes *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR8* et *PR10* ont été induits contre l'oomycète *Plasmopara viticola*, et *PR3*, *PR6* et *PR10* contre le champignon *Erysiphe necator* (Dufour *et al.*, 2013). La réduction des symptômes due à ces deux agents pathogènes a atteint 98%. Chez le tabac, le BTH a utilisé la voie de signalisation du SA pour induire la résistance contre le champignon *Oidium neolycopersici* (Achuo *et al.*, 2004). Chez la fraise, cet éliciteur a induit une résistance contre l'oomycète *Sphaerotheca macularis* par la production de dérivés de la voie des phénylpropanoïdes comme l'acide p-coumarique, l'acide gallique et le kaempferol hexose (Hukkanen *et al.*, 2007).





**Figure 27. Le récepteur du BABA, le IBI1 et la suppression de la croissance des plantes par des voies distinctes. Schéma d'après Luna et al. (2014)**

Liaison du BABA au site de liaison L-Asp du récepteur l'IBI1 qui bloque l'activité canonique de l'aspartyl-tRNA synthétase (AspRS), réaction dans le cytoplasme (rouge) qui déclenche les réponses de défense. Simultanément, l'activité inhibitrice du BABA sur l'activité AspRS conduit à l'accumulation d'ARNt, ce qui déclenche une phosphorylation dépendante du GCN2 du facteur de traduction eIF2α et une suppression de la croissance des plantes (bleu).

Le **BABA**, un acide aminé non-protéique, a également été beaucoup étudié chez les solanacées et chez la plante modèle *Arabidopsis*. Cet éliciteur est considéré comme un potentialisateur des défenses en absence de l'agent pathogène. Il induit principalement du métabolisme primaire comme le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), du SA et ses glycosides, ainsi que de l'acide indole-3-acétique (IAA) (Pastor *et al.*, 2014). La plante est alors prête pour induire des voies de signalisation de défense spécifiques à la suite d'une exposition à un stress (Bacelli and Mauch-Mani, 2016).

Des folioles de pomme de terre traitées avec le BABA ont présenté des points de nécrose défini comme la « HR-like » à l'endroit de l'infection par *P. infestans*. Le traitement a également induit des dépôts de callose et la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, des antimicrobiens comme l'arbutine, l'acide chlorogénique et la PR1. Dans ce cas précis, la diminution de la croissance de l'agent pathogène est bien vérifiée (Bengtsson *et al.*, 2014a). Les auteurs ont testé l'éliciteur sur un génotype résistant et un sensible, et ils ont pu montrer que l'ensemble de l'activation des défenses était plus rapide dans le génotype résistant. La même équipe (Bengtsson *et al.*, 2014b) attribue cette résistance induite par le BABA à la réduction de la source de stérols et de glycoalcaloïdes stérols dans la plante. En effet, les stérols sont essentiels à la reproduction des oomycètes qui n'ont pas la capacité de les synthétiser et dépendent donc de leurs hôtes pour les acquérir. La baisse de production des stérols se fait au détriment de la production d'une phytoalexine sesquiterpénique, vérifiée par l'activation de l'enzyme « vetispiradiene synthase 1 ». Au champs, la réduction des symptômes de *P. infestans* n'est pas significative après traitement avec le BABA seul. Par contre, le BABA en combinaison avec un fongicide, induit une diminution significative des symptômes et, de plus, cette combinaison de molécules a permis de diminuer la dose de fongicide de 20–25% (Liljeroth *et al.*, 2010).

Chez la tomate, le BABA a été testé contre 6 souches de *P. infestans* et il a induit une diminution des symptômes variant entre 43% et 100% (Sharma *et al.*, 2010). Il induit donc des réponses de défense, mais l'amplitude de son efficacité est souche dépendante. Chez le soja le BABA induit une résistance contre des pucerons. Les auteurs ont vérifié l'induction du gène « callose synthase » (*CalS*) responsable de la production de callose ainsi que le dépôt de callose. Ils ont également mis en évidence l'expression des gènes liés à lignines, *PAL*, *C4H*, *4CL* et *CAD* ; et la production des des isoflavonoïdes, daidzein, genistein et glycitein (Yao *et al.*, 2019).

Deux découvertes assez récentes sur le BABA aident à comprendre son mode d'action. Chez *Arabidopsis*, Luna *et al.* (2014) et Schwarzenbacher *et al.* (2014) ont trouvé un récepteur du BABA, le « Impaired in BABA-induced disease Immunity »-IBI1 (Figure 27).



Il est perçu dans le cytoplasme mais cette perception induit l'accumulation de la synthétase aspartyl-tRNA molécule qui est un signal du blocage de la croissance des plantes. Cet effet sur la croissance a été déjà observé à de hautes doses de BABA ( $\geq 50$  mM) (Zhong *et al.*, 2014). Ces auteurs soulignent l'antagonisme potentiel entre induction des défenses et développement de la plante avec probablement une compétition pour mobiliser l'énergie.

Le BABA induit de la défense chez un large spectre de plantes. Thevenet *et al.* (2017) attribuent cet effet à la présence naturel du BABA chez certaines plantes. Dans leur étude, le BABA a été trouvé chez *A. thaliana*, le maïs, le blé, le téosinte et le chou chinois. Cette découverte est importante car jusqu'à présent, le BABA était considéré comme un composé xénobiotique dans les plantes.

Des métabolites comme la **rutine**, un antimicrobien bien connu (Báidez *et al.*, 2007; Kalinova and Radova, 2009; Kröner *et al.*, 2012) peuvent être également utilisés comme éliciteurs de la défense des plantes. La rutine induit la résistance modulée par la voie du SA aux agents pathogènes *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Ralstonia solanacearum* et *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 dans les plantes de riz, tabac et *A. thaliana*, respectivement (Yang *et al.*, 2016).

### 3. Eliciteurs naturels : Plantes et Algues

Les extraits de plantes et d'algues sont des produits naturels qui ont été utilisés pour induire les réactions de défense. Un **extrait de *Vitis vinifera*** du cultivar Grap'Sud qui contient de grandes proportions d'anthocyanes, a été testé sur feuilles de tabac et il a induit les antimicrobiens PR1 et PR2 (Goupil *et al.*, 2012). Les auteurs ne l'ont pas testé contre un agent pathogène, mais il semble avoir le potentiel pour protéger la plante. Sur des tubercules de pomme de terre traités avec un **extrait d'olivier**, Ouanas *et al.* (2017) ont montré une diminution significative des symptômes de pourriture molle causée par les bactéries, *Pectobacterium atrosepticum* et *P. carotovorum*. Cet extrait a augmenté l'activité de la PAL après traitement.

La laminarine et les ulvanes, substances extraites des algues, ont également été utilisés pour leurs effets d'induction de défense (Klarzynski *et al.*, 2003; Cluzet *et al.*, 2004; Menard, 2004; Paulert *et al.*, 2009; Jaulneau *et al.*, 2010).

La **laminarin  $\beta$ -1,3 glucane** et ses dérivés extraits de l'algue brune, la *Laminaria digitata*, montrent un effet éliciteur chez les plantes.



Chez le tabac, l'application de la laminarine induit rapidement une alcalinisation des cellules et la production de ROS. Puis quelques heures plus tard, elle stimule l'activation de la PAL, de l'acide caféique O-méthyltransferase et de la lipoxygénase. En plus, la production des protéines PR1, PR2, PR3 et PR5 a été détectée. L'ensemble des réactions a entraîné une diminution des symptômes de *P. carotovorum* (Klarzynski *et al.*, 2000). Chez la vigne, Gauthier *et al.* (2014) ont testé la laminarine, et son dérivé sulfaté et les deux éliciteurs ont réduit les symptômes de *Plasmopara viticola*. Cependant, les mécanismes pour cet effet ne sont pas les mêmes. La laminarine stimule le flux de  $\text{Ca}^{2+}$ , la production de ROS et l'activation de deux MAPKs tandis que son dérivé n'a pas pu produire les mêmes réactions. Par contre, ils activent tous les deux les voies de signalisation du SA et du JA. Mais après infection par le pathogène c'est le SA qui s'accumule dans les cellules pour les deux traitements. La laminarine est constituée de chaînes linéaires à terminaisons mannitol ou glucane e.g. de résidus de  $\beta$ -1,3 glucane, parfois avec des ramifications de  $\beta$ -1,6 glucane. Klarzynski *et al.* (2000) suggèrent que la laminarine est reconnue par la plante car les parois des cellules fongiques sont aussi constituées de glucanes qui consistent principalement en un squelette de résidus de  $\beta$ -1,3 glucane avec seulement quelques branches de  $\beta$ -1,6 glucane.

Le polysaccharide **ulvane**, extrait de l'algue verte *Ulva lactuca*, appliqué chez les oliviers, a induit le gène de la PAL et a montré une réduction des symptômes dus à différents pathogènes tels que *Verticillium dahlia* (Ben Salah *et al.*, 2018). Également chez les graines de tomate, l'application de cet éliciteur a induit la PAL et a réduit de moitié la mortalité des plantules par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (El Modafar *et al.*, 2012). Ces auteurs suggèrent que l'induction de la PAL indique que la résistance dépendait de l'induction de la voie du SA. Chez les pommes, l'ulvane et l'oligo-ulvans ont été testés contre *B. cinerea*. Les deux éliciteurs ont induit l'accumulation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ainsi que des enzymes antioxydantes comme la CAT et la SOD. L'activité d'autres enzymes comme celle de la PAL, d'une peroxydase et d'une polyphénoloxydase est également activée par le traitement. L'application d'ulvane a réduit de 30% les symptômes de l'agent pathogène, mais l'oligo-ulvane a induit une résistance totale contre cet agent pathogène (Abouraïcha *et al.*, 2015). Les auteurs attribuent cette différence de protection, en partie, à la longueur de la chaîne saccharidique.

D'autres auteurs ont regardé si le degré de sulfatation d'un extrait d'*Ulva fasciata* pouvait changer la protection d'*A. thaliana* vis à vis de deux agents pathogènes, *Alternaria brassicicola* et *Colletotrichum higginsianum*.



Ils ont finalement conclu que, les extraits, indépendamment du degré de sulfatation, réduisent les symptômes des deux champignons (de Freitas *et al.*, 2015). Des extraits d'*Ulva armoricana* ont induit des diminutions de symptôme sur différents pathosystèmes : haricot/*Erysiphe polygoni*, vigne/*Erysiphe necator* et concombre/*Spherotheca fuliginea* (Jaulneau *et al.*, 2011). Des travaux de la même équipe ont montré que *Medicago truncatula* traitée avec un ulvane a activé la signalisation par la voie JA ; ils ont confirmé ces résultats en utilisant un mutant d'*A. thaliana* (Jaulneau *et al.*, 2010).

Les ulvanes sont des polysaccharides proches de la pectine, un polysaccharide pariétal composé principalement de rhamnose et des résidus d'acide uronique (Jaulneau *et al.*, 2010). Jaulneau (2010) propose qu'ils pourraient être perçus indirectement par le récepteur WAK1 des pectines. Cependant, les récepteurs de l'ulvane n'ont pas encore été identifiés.

#### 4. Les éliciteurs homologués ou stimulateurs de défense des plantes

L'activité d'induction de défense est démontrée pour un certain nombre d'éliciteurs testés en conditions contrôlées (Altamiranda *et al.*, 2008; Jaulneau *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2016). Le défi pour ce type de molécules est de montrer une efficacité en condition de plein champs mais ce n'est pas toujours le cas actuellement et c'est ce qui bloque l'arrivée de ces produits en agriculture. En France, les produits SDPs sont définis de la façon suivante (Berthelot and RMT Elicitra, 2018) :

*« Toute substance ou tout micro-organisme vivant non pathogène qui, appliqué sur une plante, est capable de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée, face à des stress biotiques. Un SDP n'agit pas directement sur les bioagresseurs, il est perçu par la plante comme un message d'alerte. Celle-ci va réagir en préparant ou en mettant en place différents mécanismes de défense, ce qui va concourir à la rendre plus résistante aux attaques de bioagresseurs »*

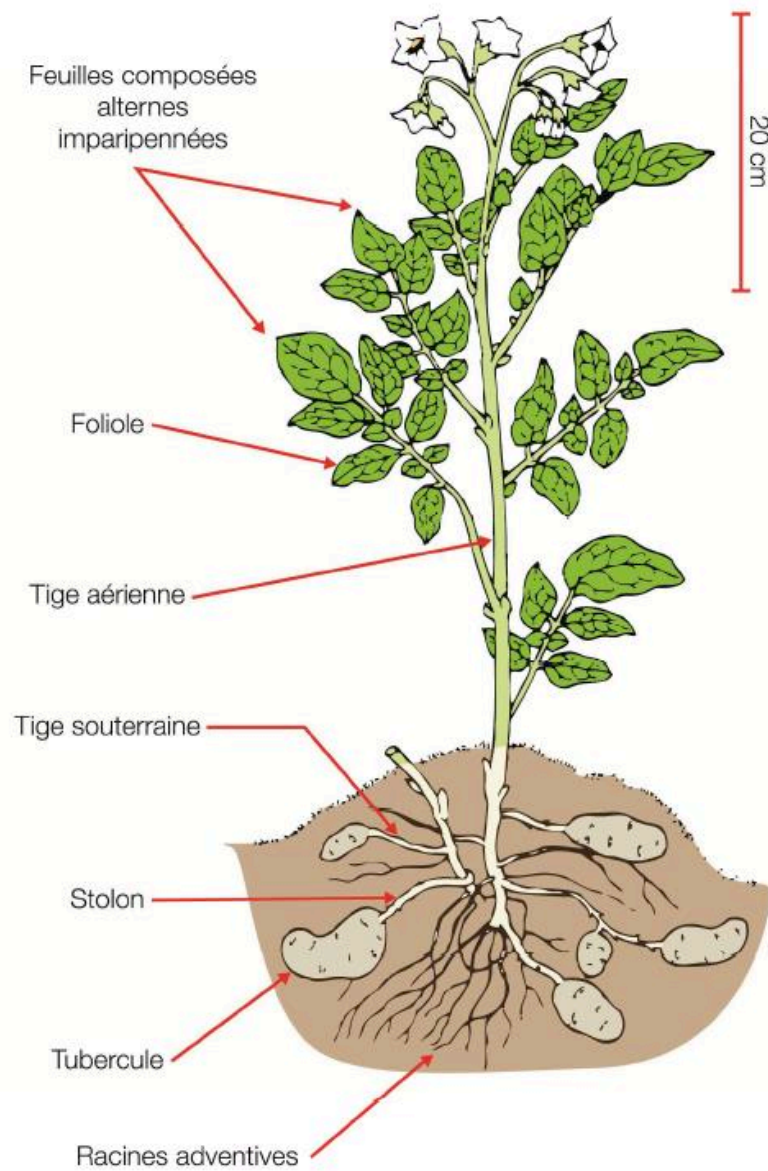
Les SDPs sont des éliciteurs ayant comme principe d'action d'induire le système immunitaire innée des plantes pour activer des réponses de défense ce qui devrait contribuer à diminuer les symptômes dus aux agents pathogènes. Les éliciteurs sont catégorisés comme SDP d'après les tests en condition contrôlée et de plein champs, puis homologués par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. Peu de SDPs sont déjà commercialisés et disponibles pour les agriculteurs.





Parmi les principaux SDPs, on peut citer le BTH, analogue du SA et commercialisé par Syngenta, sous le nom de BION<sup>®</sup>. Ce produit est homologué pour le bananier, le chrysanthème et la tomate de plein champ. De la même façon, un oligosaccharide extrait de l'algue *Laminaria digitata*, la laminarine est commercialisée sous le nom de VACCIPLANT<sup>®</sup> - Arysta Life Science. Il est homologué pour les grandes cultures céréalières (blé tendre, blé dur, orge, seigle, triticale, avoine, épeautre, sarrasin). D'autres produits existent sur le marché international comme l'extrait d'algues brunes, *Ascophyllum nodosum*, sous le nom commercial de Stella Maris<sup>®</sup>. Chez *A. thaliana*, ce produit a pu induire des ROS, activer l'expression des facteurs de transcription *WRKY30*, du *CYP71A12* peptide responsable de la production de la phytoalexine camalexine et du gène *PRI* (Cook *et al.*, 2018). Ces SDPs agissent seuls ou en combinaison avec des pesticides permettant ainsi à la fois la réduction des symptômes dus aux pathogènes et celle des molécules chimiques.

Cependant, le faible nombre de SDPs homologués ne permet pas d'améliorer la protection d'un certain nombre de cultures. C'est le cas en particulier de la culture de pommes de terre qui fera l'objet de notre étude.



*Figure 28. Les différents organes de la plante de pomme de terre. Schéma adapté de Rousselle et al. (1996)*

## V. PTI et Pomme de Terre

La pomme de terre est une culture d'intérêt agronomique et une des cultures les plus consommatrices de fongicides. A titre d'exemple, il est nécessaire d'appliquer en conditions culturales 15 à 20 traitements fongicides pour lutter contre *Phytophthora infestans* agent du mildiou de la pomme de terre en cas de forte pression parasitaire. Les pertes dues à cet oomycète sont encore estimées à 1 milliard d'euro (Haverkort *et al.*, 2008). Dans le contexte actuel de réduction des intrants phytosanitaires, un enjeu majeur pour cette culture est le développement de méthodes alternatives ou complémentaires aux fongicides dont la stimulation des défenses des plantes.

### 1. Modèle d'étude : la pomme de terre

#### 1.1 Physiologie et développement

La **pomme de terre** fait partie de la famille des Solanacées comme la tomate (*Solanum lycopersicum*), le poivron (*Capsicum annuum*) et le tabac (*Nicotiana tabacum*). Elle appartient au genre *Solanum* et à l'espèce *Solanum tuberosum* qui est subdivisée en deux sous-espèces : *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigenum* et *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum*. La pomme de terre est originaire d'Amérique Latine et son introduction en Europe a été faite au 16<sup>ème</sup> siècle en Espagne et en Angleterre (Raker and Spooner, 2002). La sous-espèce *tuberosum* est passée par deux siècles d'adaptation aux conditions de l'Europe (culturelles, biologiques et socio-économiques) pour devenir la culture d'intérêt agronomique connue aujourd'hui (Rousselle *et al.*, 1996).

Angiosperme herbacée, la pomme de terre est composée par plusieurs tiges dont le nombre dépend du génotype. Les feuilles alternées sont composées par de grandes folioles et des folioles secondaires. Les fleurs sont souvent stériles et la production des fruits rare. Les produits principaux de cette plante sont les tubercules qui se forment dans le sol par des stolons. Ce sont les organes de multiplication végétative (Figure 28) (Rousselle *et al.*, 1996).

Le cycle de développement de la pomme de terre est annuel et composé par trois phases : (i) une phase de croissance qui en France commence entre mars et avril jusqu'à mai ; (ii) la phase de tubérisation de juin à août ; et (iii) le repos végétatif où les tubercules ne peuvent pas croître pour produire des germes, en septembre/octobre (Figure 29).

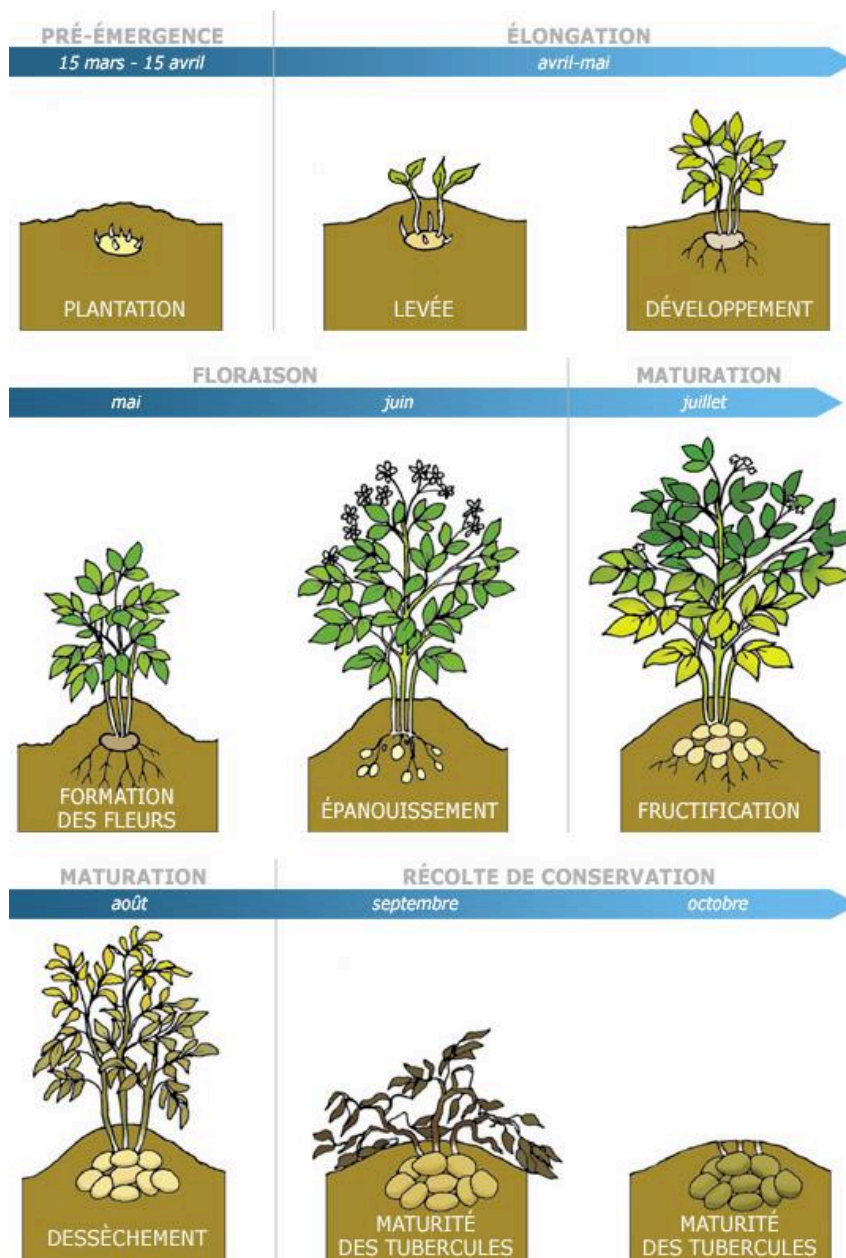


Figure 29. Cycle de développement de la culture de pomme de terre en France. Schéma d'après le site « Le plant français de la pomme de terre » (FN3PT, 2019)

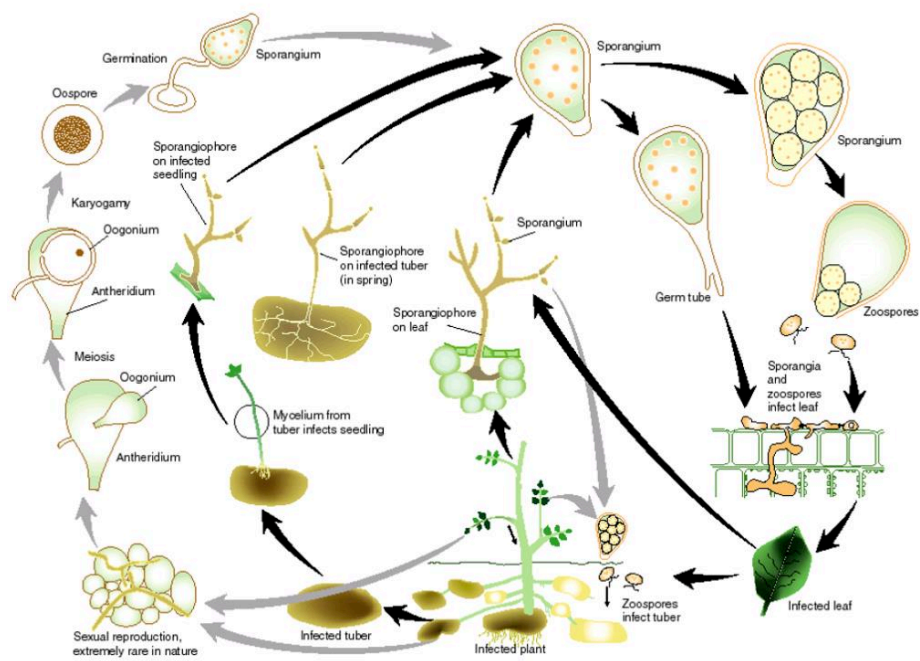
La pomme de terre a été séquencée en 2011 à partir de l'hybride de *S. tuberosum* du groupe Phureja (PI 225669). Cet hybride est un diploïde dont 86 % du génome a été étudié. Son génome a une taille de 844 mégabases et environ 39 031 gènes codant des protéines (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011). La majorité des variétés commerciales de pomme de terre sont tétraploïdes ( $2n = 4x = 48$ ) et cette caractéristique ajoute une complexité aux études sur son génome. Celui-ci n'étant pas encore totalement annoté, la recherche d'amorces spécifiques peut être difficile.

### 1.2 Importance agronomique et limite de la culture

Parmi les Solanacées, la pomme de terre est la plus grande culture de l'Europe (FAO, 2017). La FAO en 2017 a estimé la production mondiale de pomme de terre à 388 M de tonnes (FAO, 2017). L'Europe est le deuxième continent producteur avec 121 M de tonnes, derrière l'Asie. La France participe à cette production avec 7 M de tonnes (FAO, 2017).

Les ravageurs et les agents pathogènes limitent la production de cette culture (Savary *et al.*, 2012). En France, les principaux bioagresseurs de la pomme de terre sont: le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*) et les taupins (du genre *Agriotes*), trois genres de nématodes le *Globodera* (à kyste), le *Meloidogyne* (à galle) et le *Ditylenchus* (libres) (FN3PT, 2019). Parmi les agents pathogènes le virus Y, Potyvirus transmis par de nombreuses espèces de pucerons, est le principal virus de la culture. En France, en terme de maladies « fongiques » on peut citer, l'alternariose, causé par les champignons *Alternaria alternata* ou *A. solani* mais qui produisent des dégâts au niveau foliaire et au niveau des tubercules contrairement à *Rhizoctonia solani* et à *Helminthosporium solani* champignons qui attaquent seulement les tubercules.

Cependant, au niveau mondial, le mildiou de la pomme de terre (Potato Late Blight) reste encore l'une des 10 maladies les plus dommageables (Bull, 2018). Elle est causée par l'oomycète *P. infestans* de la famille des Pythiacées et de l'ordre des Peronosporales (Haverkort *et al.*, 2008). Au XIX<sup>e</sup> siècle, *P. infestans* a conduit à la destruction massive des cultures de pomme de terre en Irlande entraînant une crise alimentaire sans précédent « La Grande Famine » conduisant à 1,5 millions de morts et au départ de 1 millions de migrants Irlandais vers les USA (Fisher *et al.*, 2012). *P. infestans* est considéré comme une menace constante compte tenu des dégâts qu'il engendre, de sa dispersion et de sa capacité d'adaptation grâce à l'évolution de son génome (Fisher *et al.*, 2012; Fry *et al.*, 2015). Le mildiou n'est pas une exclusivité de l'Europe, il cause des dégâts principalement en Amérique Latine, dans les Andes, région possible d'origine de la souche qui a causé « La Grande Famine » (Yoshida *et al.*, 2013; Goss *et al.*, 2014).



**Figure 30. Cycle de vie de *Phytophthora infestans*. Schéma du groupe « AsiaBlight »**  
 (<https://www.asiablight.org/what-is-late-blight/>)

Dessin de Agrios du laboratoire James Hutton Institute.

*P. infestans* est un agent pathogène hémibiotrophe qui possède deux formes de reproduction, sexuée et asexuée (Agrios, 2005; Fry, 2008). Cette dernière est la principale phase de multiplication. L'oomycète infecte les plantes à travers des zoospores biflagellées libérées par les sporanges. La colonisation des tissus se fait par le mycélium au cours de la phase biotrophe de l'agent pathogène. Après la production de sporanges, commence la phase nécrotrophe. Les deux modes de trophie peuvent coexister augmentant ainsi l'efficacité de l'agent pathogène dans la colonisation des tissus (Figure 30). Le succès *P. infestans* est augmenté par son caractère polycyclique et par sa capacité d'adaptation pour contourner les défenses des plantes.

Compte tenu de l'intérêt économique et agronomique de la culture de la pomme de terre et de sa place dans la sécurité alimentaire (Devaux *et al.*, 2014), des méthodes de lutte contre *P. infestans* ont fait l'objet de nombreux travaux pour en limiter le développement. Actuellement deux méthodes sont déployées : la lutte chimique et la lutte génétique.

### 1.3 Méthodes de lutte

**La lutte génétique :** Les programmes d'amélioration de la pomme de terre ont cherché à introduire des gènes de résistance majeur R dans les variétés pour bloquer *P. infestans*. Les premiers gènes de résistance utilisés contre *P. infestans* ont été trouvés sur une espèce sauvage, *Solanum demissum* (R1-R11) mais ils ont été rapidement contournés par le pathogène (Nowicki *et al.*, 2012). Plusieurs plantes sauvages du genre *Solanum* sont sources de gènes de résistance majeurs, par contre le croisement entre les sauvages, souvent espèces diploïdes et la pomme de terre, autotétraploïde ne permet pas d'accéder à ces ressources. Actuellement, les variétés déployées au champs sont des variétés avec des résistances quantitatives plus ou moins efficaces. Elles sont aussi choisies pour d'autres critères que la résistance à *P. infestans*, tels que la résistance à d'autres maladies, le rendement et la qualité organoleptique et nécessitent donc l'application de fongicides.

**La lutte chimique :** Les traitements fongicides sont complémentaires à la lutte génétique et pour certains génotypes de pomme de terre, ils sont essentiels. Malgré les efforts réalisés pour trouver des variétés résistantes, *P. infestans* est principalement contrôlé par les fongicides. Ces produits utilisés contre le mildiou ont des modes d'action différents : les *produits de contact* qui protègent les feuilles présentes au moment du traitement, pour lesquels les substances actives dominantes sont le mancobèze et le manèbe.





Les *produits de contact élaborés* protègent les feuilles et les tubercules et sont à base de cyazofamide, fluazinam ou zoxamide. Les *produits pénétrants*, à base de cymoxanil, sont appliqués en fin de croissance active et en végétation stabilisée si la pression de l'agent pathogène est forte, ils protègent les feuilles et les tubercules. Les *translaminaires* à base de diméthomorphe, de valifénalate, de mandipropamide, de fluopicolide, de benthiavalicarbe, de famoxadone, de propamocarbe et de fénamidone vont réduire le nombre de spores produites et la mobilité des zoospores. Cependant, les produits les plus utilisés contre les oomycètes sont les *produits ascendants de la famille des phénylamides* (Beauvallet and Gaucher, 2015) qui inhibent l'ARN polymérase 1. Ils s'emploient donc principalement durant la forte croissance foliaire.

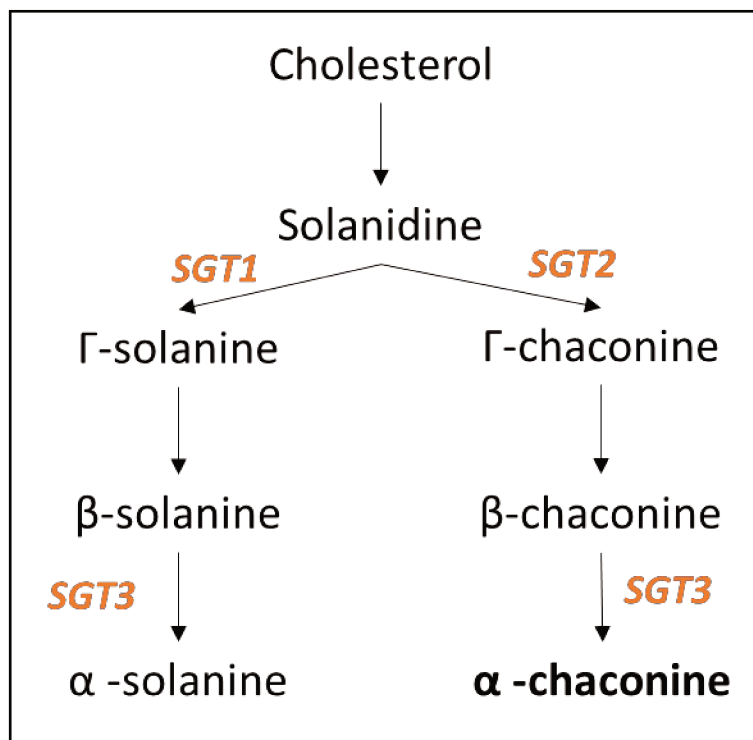
## 2. Etat des connaissances sur la PTI chez la pomme de terre

La mobilisation de la PTI par des éliciteurs qui pourraient potentiellement contrôler les agents pathogènes comme *P. infestans* est dépendante de la connaissance des mécanismes activant les cascades de défense. Les connaissances sur l'induction de la PTI chez la pomme de terre sont encore limitées car c'est une plante plus complexe que les plantes modèles comme *Arabidopsis* et *M. truncatula*.

Concernant la perception de *P. infestans*, un récepteur des élicitines, le ELR a été trouvé chez la pomme de terre (Du *et al.*, 2015) (*cf* Introduction : II-1-1.1). Ce récepteur est probablement impliqué dans la reconnaissance de ces élicitines présentes dans les filtrats de cultures de cet agent pathogène (Saubeau *et al.*, 2014).

Chez la pomme de terre, la transduction du signal est faite par la phosphorylation d'une catégorie spécifique de protéines kinases, les « Calcium-dependent protein kinases » (CDPKs) équivalentes aux MAPKs chez *Arabidopsis*. Blanco *et al.* (2007) ont mis en évidence le rôle essentiel des CDPKs pour l'activation de la cascade de défenses. Ainsi, chez les pommes de terre traitées avec des composants de la paroi des hyphes de *P. infestans*, l'activation de la PAL est dépendante de l'activation des CDPKs. Récemment, une protéine de la famille des CDPKs, le *StCPK7*, a été montrée comme une médiatrice pour l'activation de la PAL (Fantino *et al.*, 2017). De plus, les gènes de ces protéines sont induits après infection par *P. infestans*.

La famille des facteurs de transcription, WRKYs est aussi liée à l'expression des gènes de défenses. *StWRKY1* est activé après infection par *P. infestans* (Dellagi *et al.*, 2000).



*Figure 31. Voie des stérol glycoalcaloïdes de la pomme de terre. Schéma basé sur McCue et al. (2011)*

Plus récemment, Yogendra *et al.* (2015) ont montré que ce gène régule les métabolites de la voie des phénylpropanoïdes et par conséquent, cette cascade confère une résistance contre le *P. infestans*. La même équipe a aussi caractérisé le facteur de transcription *StWRKY8* qui est responsable de l'induction des alcaloïdes benzyloisoquinoline (BIAs) comme les morphinone, codeine-6-glucuronide et morphine-3-glucuronides, après infection par l'agent pathogène (Yogendra *et al.*, 2017).

Chez la pomme de terre, les produits finaux de défense sont communs à d'autres plantes, ils ont été mis en évidence par différents auteurs. L'étude transcriptomique (RNAseq) intégrée à une étude métabolomique non-ciblée chez des génotypes résistants et sensibles à *P. infestans* a permis d'identifier que, effectivement, ce sont les voies des phénylpropanoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et les terpenoïdes qui sont les plus induites chez les génotypes résistants (Yogendra and Kushalappa, 2016). D'autres travaux compilant les gènes liés à la défense de la pomme de terre vont dans le même sens (Saubeau, 2014). L'extension de la puce qPFD pommier (brevet INRA) à la pomme de terre a permis de regrouper 28 gènes liés à un ensemble de voies métabolomiques impliquées dans la défense : les voies des phytohormones (SA, JA et Et), des phénylpropanoïdes, des isoprénoïdes, de la cystéine, des enzymes du stress oxydant, des modifications pariétales et les protéines PRs (Brisset and Duge de Bernonville, 2011; Saubeau, 2014).

Les plantes peuvent aussi avoir des métabolites spécifiques au genre ou à l'espèce. Chez les Solanacées, la tomate et la pomme de terre produisent naturellement les stérol glycoalcaloïdes : la tomatine spécifique à la tomate et la chaconine/solanine spécifique à la pomme de terre. Ces métabolites ont leur origine dans la voie du MEP (terpènes) et sont synthétisés à partir de la voie du cholestérol qui conduit à la production des stérol glycoalcaloïdes (Friedman, 2006). L'équipe américaine qui a décrit les gènes de cette voie (McCue *et al.*, 2006; McCue *et al.*, 2007; McCue *et al.*, 2011) indiquent que le gène « Sterol Alkaloid Glycosyltransferase » (*SGT1*) est lié directement à la production de solanine, le gène *SGT2* à la production de chaconine et le gène *STG3* est lié à la production de ces deux métabolites (Figure 31). Ces études avaient pour objectif de comprendre le mécanisme de production de la chaconine et d'envisager le blocage par transgénèse des gènes codant ce métabolite (Shepherd *et al.*, 2015).

Ces métabolites ont des effets bénéfiques pour la protection de la culture car ils sont toxiques vis-à-vis des agents pathogènes et des ravageurs. L'effet des glycoalcaloïdes contre les ravageurs a été montré par Nenaah (2011) contre un coléoptère, *Trogoderma granarium*.



Les insectes qui ont été nourris avec des glycoalcaloïdes voient leur croissance et leur taux d'alimentation diminués. Fewell and Roddick (1997) ont testé *in vitro* l' $\alpha$ -chaconine et l' $\alpha$ -solanine contre plusieurs agents pathogènes. Ils ont vérifié que la chaconine inhibe la germination des spores d'*Alternaria brassicicola* et de *Phoma medicaginis*, et en plus, la croissance mycélienne de ces agents pathogènes et d'*Ascobolus crenulatus* et *Rhizoctonia solani*. La solanine à l'inverse, n'a pas inhibé ces agents pathogènes. Des chercheurs ont aussi testé l'effet des glycoalcaloïdes contre *P. infestans*, mais les résultats sont contradictoires. Sarquís *et al.* (2000) et Andrivon *et al.* (2003) n'ont pas trouvé de corrélation entre le niveau des glycoalcaloïdes et la résistance à *P. infestans*. Cependant, Carlson-Nilsson *et al.* (2011) ont montré qu'un haut niveau de chaconine dans les tubercules peut, en effet, être responsable de la résistance à *P. infestans*. Les glycoalcaloïdes agissent en causant des perturbations des membranes médiées par les stérols et les agents pathogènes peuvent surmonter la toxicité des glycoalcaloïdes par déglycosylation enzymatique. Dahlin *et al.* (2017) ont montré que *P. infestans* produit plusieurs glycosides hydrolases ayant une activité potentielle sur les glycoalcaloïdes, mais ils n'ont pas pu constater de dégradation de glycoalcaloïdes par l'agent pathogène.

L'effet toxique de ces métabolites affecte aussi les animaux et les humains (Friedman, 2006). A cause de cette toxicité, les programmes d'amélioration ont sélectionné des génotypes avec une teneur en chaconine/solanine en dessous du seuil de toxicité pour l'Homme. Par contre, la chaconine est plus toxique que la solanine donc actuellement les cultivars commerciaux ont un taux de chaconine dans les tubercules entre 1 à 35 mg/100 g de poids frais, valeurs tolérées par les humains (Friedman, 2006). La limite d'innocuité acceptée pour le niveau de glycoalcaloïdes est de 200 mg/kg de poids frais (voir dans Shepherd *et al.*, 2015). Les teneurs de ce métabolite dans les feuilles sont plus faibles, cependant, une corrélation des teneurs entre feuilles et tubercules n'est pas vérifiée (Sarquís *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces différentes réactions peut être induit par des éliciteurs. Le **BABA**, par exemple, est l'éliciteur le plus étudié sur pomme de terre pour lutter contre *P. infestans*. De nombreux travaux en transcriptomique, protéomique et métabolomique décrits dans la partie « éliciteurs synthétiques » de ce manuscrit (*cf* Introduction : IV-2), ont permis de mieux comprendre l'interaction entre la pomme de terre/le BABA/*P. infestans* (Altamiranda *et al.*, 2008; Liljeroth *et al.*, 2010; Liljeroth *et al.*, 2010; Bengtsson *et al.*, 2014b; Bengtsson *et al.*, 2014a).



Dans le laboratoire où s'est déroulée la thèse, un filtrat de culture concentré « **Concentred Culture Filtrate** » (CCF) de *P. infestans* a fait l'objet de plusieurs études. Considéré comme un PAMPs, il est composé par 3 élicitines INF1, INF4 et INF5 plus une fraction de polysaccharide (Saubeau *et al.*, 2014). L'induction des cellules de pomme de terre avec le CCF a activé fortement la voie des oxylipines (Saubeau *et al.*, 2013). De la même façon, l'activation de la PAL, considérée comme un marqueur de défense, a été mise en évidence sur tubercules de pomme de terre après traitement avec le CCF (Kröner *et al.*, 2011). Ce dernier, testé sur différents génotypes de pommes de terre, a induit principalement des gènes liés à la voie de signalisation du SA, tels que les gènes *PRs*. Dans cette étude, Saubeau *et al.* (2016) ont montré que le génotype résistant, Ackersegen traité par le CCF avant inoculation avec *P. infestans*, a fortement induit les gènes *PRs* contrairement au génotype sensible, Bintje, pour lequel ces gènes étaient moins exprimés. Sur la variété BF15, le traitement par le CCF a permis de diminuer les symptômes dus à une souche spécifique de *P. infestans* (Thomas *et al.*, 2019a). Ces différents travaux montrent donc que l'efficacité de l'induction est dépendante du génotype et de la souche de l'agent pathogène (Thomas, 2019).

**Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux mais avec l'objectif de mieux comprendre les mécanismes qui peuvent conduire à l'induction de la PTI chez une plante particulièrement complexe comme la pomme de terre.**





## Hypothèse et objectif du projet de thèse

---

L'induction des réponses de défense chez les plantes a été démontrée pour un certain nombre d'éliciteurs, principalement testés en conditions contrôlées (Dodds and Rathjen, 2010). Dans ces conditions, l'efficacité des molécules testées est souvent optimale mais le défi pour ce type de molécule est de montrer une efficacité en condition de pleins champs ce qui n'est pas toujours le cas.

L'hypothèse du projet de thèse est que les réponses de défense induites chez la pomme de terre contre les agents pathogènes dépendraient de l'origine des éliciteurs et/ou du génotype. Pour vérifier cette hypothèse deux questions ont été posées :

- ❖ **Les réponses de défense dépendent-elle de l'origine des éliciteurs ?**
- ❖ **Les réponses de défense sont-elles identiques quel que soit le niveau de résistance des génotypes ?**

Pour répondre à ces questions, la stratégie adoptée a été de comparer par des analyses métabolomiques non ciblées puis ciblées, les réponses de deux génotypes de pomme de terre traités, respectivement, par trois éliciteurs différents. Ces analyses devraient permettre d'identifier les composés impliqués dans la défense après stimulation par les différents éliciteurs. Des analyses transcriptomiques de gènes ciblés dans les principales voies de défense ont complété cette étude. Une collaboration avec l'Université de Rouen a également permis d'analyser les réactions de défense au niveau de la paroi végétale.

A l'issue des premiers résultats une troisième question s'est imposée pour la suite de la thèse :

- ❖ **L'induction des réponses de défense par les éliciteurs dépend-t-elle de la cinétique d'action de ces molécules ?**

Cette question a été étudiée par le suivi, en fonction de 6 temps de cinétique, des transcrits des gènes de défense et de métaboliques ciblés.



**CHOIX STRATEGIQUES ET  
MATERIELS & METHODES**



## Choix Stratégiques

### I. Choix des génotypes de pomme de terre

Les génotypes Bintje et Désirée, choisis pour ce projet sont des variétés commerciales avec une résistance quantitative à *P. infestans* : Bintje est sensible et Désirée, moyennement résistante, suivant la classification de « The European Cultivated Potato Database » (Europotato, 2019). La variété Bintje est souvent utilisée dans les expérimentations comme variété témoin de sensibilité (Olivieri *et al.*, 2009; Liljeroth *et al.*, 2010; Saubeau *et al.*, 2014). La variété Désirée a été choisie car elle est plus résistante que Bintje mais aussi pour son inductibilité par les produits SDP (Thomas, 2019) et sa capacité à diminuer la quantité des sporanges de *P. infestans* (Clément, 2011; Thomas, 2019).

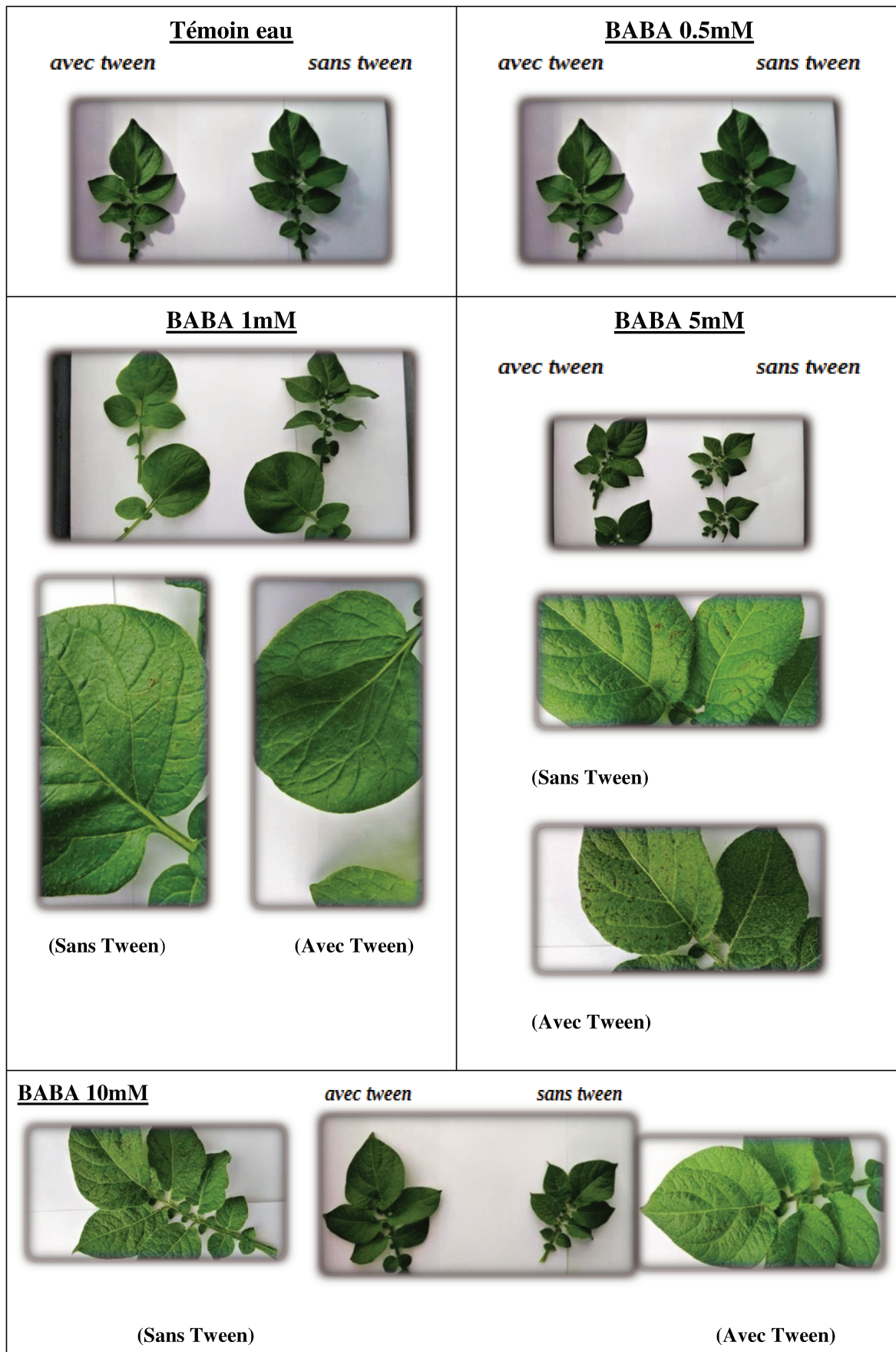
Des travaux antérieurs dans le laboratoire ayant montré que la réponse au CCF était génotype dépendante (Saubeau *et al.*, 2016), il nous a paru intéressant de comparer les réponses métaboliques induites chez Bintje et Désirée. Cette comparaison a été réalisée dans le but de généraliser ou non l'action des éliciteurs intra-espèce.

*NB : Un troisième génotype, BF15, ayant une résistance à P. infestans intermédiaire, aux autres génotypes, avait été sélectionné au début de la thèse pour compléter les études. Ce génotype a été utilisé pour des tests préliminaires mais pendant les expérimentations, ce génotype a subi un stress inconnu (biotique ou abiotique) et toutes les plantes ont été éliminées.*

### II. Choix des éliciteurs

Les éliciteurs ont été choisis en fonction de leur origine et de leur mode d'action sur différentes espèces végétales *via* des références bibliographiques et/ou des expérimentations réalisées dans les différents laboratoires partenaires. Ces éliciteurs appartiennent à trois catégories différentes de SDP (*cf* Introduction) : PAMPs, molécule synthétique et molécules naturelles. Nous avons donc ciblé les trois éliciteurs suivants :

Le CCF : décrit comme un PAMPs de *P. infestans* est choisi pour mimer l'attaque *P. infestans*. En effet, le CCF est un filtrat de culture concentré de *P. infestans* produit dans le laboratoire d'après la méthodologie développée par Desender *et al.* (2007). Il a été caractérisé par Saubeau *et al.* (2014) et contient trois infestines (INF1, INF2 et INF4) et un polysaccharide, responsables de l'induction des réponses de défense de la pomme de terre (Saubeau *et al.*, 2016).



**Figure 1.** Comparatif des symptômes dus à la « phytotoxicité » potentielle du BABA en fonction de la concentration administrée (Burlot, 2017).

Pour les travaux de thèse, il a été produit à partir de la souche de *P. infestans* « 14-P29-03R » caractérisée par Thomas *et al.* (2019) comme une souche à croissance rapide appartenant à la lignée clonale « 13\_A2 » et prélevée en 2016 sur des tubercules de Bintje dans l'essai d'évolution expérimentale de l'INRA-Le Rheu. Sa dose optimale est de 8 mg/ml et l'induction maximale des transcrits de défense est notée chez la variété BF15, 48h après prétraitement des folioles (Saubeau, 2014). Dans l'étude, le CCF est considéré comme l'éliciteur « standard ».

Le **BABA** ou acide  $\beta$ -aminobutyrique a été choisi comme « représentant » d'éliciteurs chimiques synthétiques. C'est un acide aminé non protéique à 97% de pureté (Sigma-Aldrich France). Le BABA induit également des réactions de défense chez la pomme de terre. Il a été testé sur plusieurs variétés de pomme de terre et spécifiquement dans le pathosystème pomme de terre / *P. infestans* (Altamiranda *et al.*, 2008; Liljeroth *et al.*, 2010; Bengtsson *et al.*, 2014). Pour choisir sa concentration d'utilisation pour les travaux de thèse, nous avons traité des plantes de BF15 avec les doses de 0,5 mM, 1 mM, 5 mM et 10 mM, basées sur la littérature (Bengtsson *et al.*, 2014) et suivi ces plantes pendant 7 jours. A partir de 1 mM, les folioles ont présenté des points de nécroses répartis sur la totalité de la surface foliaire (Figure 1). Il ne nous a pas été possible d'identifier ces symptômes qui pourraient être dus à de la phytotoxicité ou à de la HR-like (Bengtsson *et al.*, 2014). Pour l'étude, nous avons donc choisi de travailler à 0,5 mM. Ce travail préliminaire a fait l'objet des travaux de Steven Burlot (2017), stagiaire M1.

**L'extrait d'algue de l'espèce *Ulva spp*, a été choisi comme éliciteur d'origine naturel.** Cet extrait est breveté comme activateur des réactions des défenses des plantes (Briand *et al.*, 2006). C'est le seul des trois éliciteurs qui n'a pas été testé sur le pathosystème pomme de terre / *P. infestans*. Cependant, plusieurs auteurs ont montré l'induction des réponses de défense par les extraits d'algue sur différents pathosystèmes comme *M. truncatula* / *Colletotrichum trifolli* (Cluzet *et al.*, 2004), *A. thaliana*/*P. parasitica* (Jaulneau *et al.*, 2010), *Phaseolus vulgaris* L./*Colletotrichum lindemuthianum* (de Freitas and Stadnik, 2012). Il reste à confirmer sa capacité à induire les défenses chez la pomme de terre. Cependant avant d'engager les travaux de thèse, les extraits utilisés à deux concentrations 3 mg/ml et 8 mg/ml avaient déjà été validés au niveau transcriptomique comme induisant des réactions de défense dans les plants de pomme de terre. Nous avons choisi de garder ces deux concentrations pour l'étude. Concernant ces extraits nous avons également testé le produit formulé fourni par l'entreprise à la seule concentration de 3 mg/ml.





### III.Choix des méthodes d'analyses

#### 1. Métabolomique non ciblée

Dans le cadre de notre projet, il nous a paru pertinent d'essayer d'identifier les métabolites induits au cours de la défense car ce sont les produits finaux. L'avantage des études métabolomiques par rapport à la transcriptomique et la protéomique est que la connaissance du génome de la plante n'est pas nécessaire (Fukusaki and Kobayashi, 2005). Cependant, ces études sont complexes car elles nécessitent des compétences interdisciplinaires mélangeant la chimie analytique et organique, la biologie et la physiologie des plantes et de la bioinformatique pour les métadonnées qui sont générées. De plus, ces méthodes d'analyse vont dépendre du modèle biologique, du matériel et de l'objectif de l'analyse (screening du métabolome, ciblé sur une voie métabolomique ou métabolite).

Après l'engouement de la transcriptomique, les études métabolomiques commencent à augmenter sur les espèces commerciales, comme la pomme de terre (Pushpa *et al.*, 2014; Tai *et al.*, 2014; Yogendra *et al.*, 2014b; Shepherd *et al.*, 2015).

Cependant, à notre connaissance, notre projet est le premier à faire une étude métabolomique sans *a priori* pour mieux comprendre les interactions entre les éliciteurs et la plante.

Notre objectif étant d'obtenir un profil global des métabolites induits ou réprimés chez la pomme de terre par les éliciteurs, nous avons choisi de faire une analyse non-ciblée des métabolites. Nous avons travaillé avec l'UPLC-QToF-MS<sup>e</sup>, une machine assez sensible, capable d'identifier des petites molécules en faible concentration et ciblant des composés non-volatiles contrairement à la GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) qui cible plutôt les composés volatiles et des molécules plus grandes. Cependant, la LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) peut potentiellement identifier des composés volatiles (Heuberger *et al.*, 2014; Pushpa *et al.*, 2014).

Bien que cette analyse ne cible pas de métabolites spécifiques, l'identification de ces derniers reste importante pour l'interprétation biologique. Il existe des bases de données externes comme KEGG, ChEBI, PubChem, Massbank, Metlin (LC-MS) et Golm (GC-MS) qui peuvent aider à cette identification. Nous avons donc développé une base de données « maison » pour faciliter les identifications des métabolites induits dans nos conditions expérimentales. En complément, la validation de certains de ces métabolites a été faite par l'utilisation de standards commerciaux.



### 2. Analyse des transcrits

Dans notre laboratoire, les choix antérieurs avaient porté sur le développement des méthodes transcriptomiques pour analyser les réponses de défenses de la pomme de terre à différents stress biotiques. Ainsi, pendant sa thèse, Guillaume Saubeau (2014) a dessiné et testé 53 couples d'amorces spécifiques impliqués dans les principales voies de défense de la pomme de terre. Ces travaux ont contribué à l'extension de la puce qPFD de 28 gènes de défenses développée sur pommier (Brisset and Duge de Bernonville, 2011) à d'autres espèces dont la pomme de terre. Cette ressource a permis de répondre à plusieurs questions scientifiques sur l'interaction plante/pathogène (Saubeau, 2014; Saubeau *et al.*, 2016; Thomas, 2019; Thomas *et al.*, 2019). Pour le projet de thèse, nous avons choisi d'étudier les transcrits de certains gènes issus de la puce qPFD et/ou impliqués dans les principales voies de défense de la pomme de terre.

Dans notre étude, nous avons donc voulu combiner ces deux approches pour mieux comprendre le niveau de régulation induit au cours de la PTI par les éliciteurs.



## Matériels & Méthodes

### IV. Les plantes et les éliciteurs : Protocole expérimental

#### 1. Les plantes

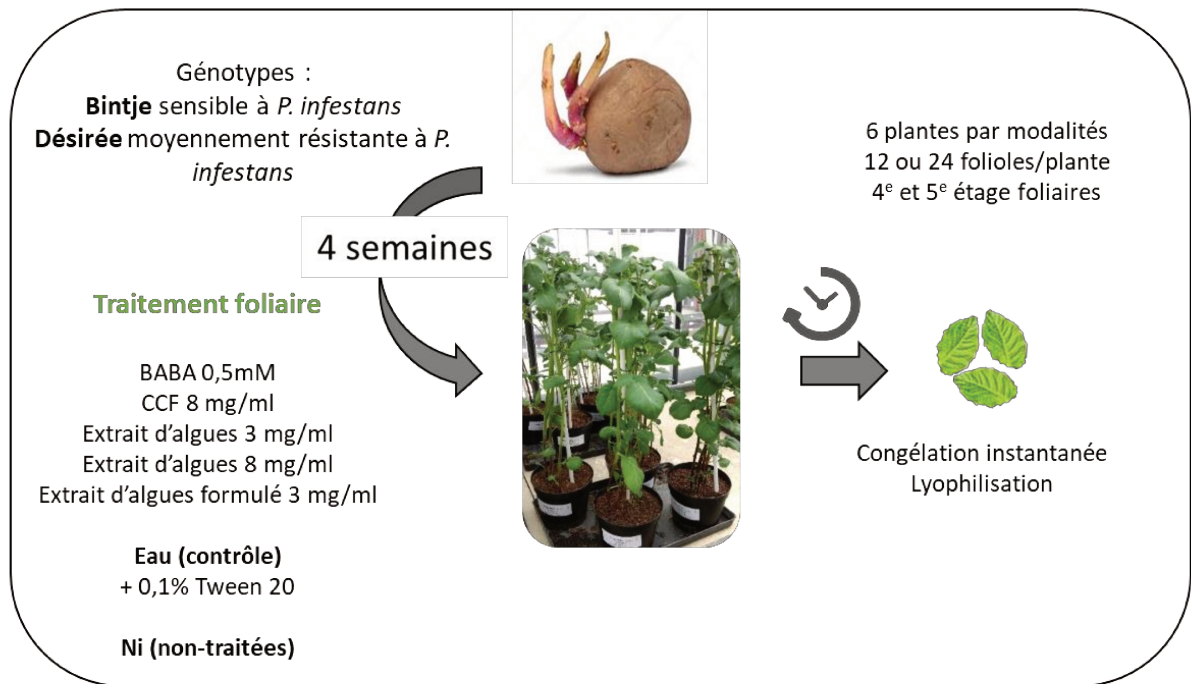
Les tubercules de pomme de terre des génotypes Bintje et Désirée ont été fournis par le Centre de Ressources Biologiques BrACySol de l'INRA basé à Ploudaniel. Les tubercules utilisés dans les essais étaient toujours ceux de la dernière saison culturale, conservés à 4°C. Environ deux semaines avant la plantation les tubercules sont laissés à température ambiante et à l'obscurité pour stopper le période de dormance et induire la germination. Ils ont été plantés dans le terreau « Falienor » (Terreau de France NFU44-551). Les plantes ont été cultivées en serre pendant quatre semaines avec une photopériode de 16h/8h (jour/nuit) et température de 20±5°C. Au cours de cette période de croissance, le terreau a été supplémenté deux fois avec du NPK (15-10-15) aux semaines deux et trois.

#### 2. Les éliciteurs

Les éliciteurs sont (i) un PAMPs de *P. infestans*, le CCF (filtrat de culture concentré de l'oomycète) composé d'élicitines et d'oligosaccharides à 8 mg/ml ; (ii) un extrait naturel de l'algue d'*Ulva* spp formulé à 3 mg/ml et non-formulé à 3 et 8 mg/ml ; et (iii) une molécule chimique, l'acide β-aminobutyrique (BABA) à 0,5 mM ou avec de l'eau + 0,1% de Tween20. Certaines plantes n'ont pas été induites (Non induit = Ni).

**Production du CCF :** Le protocole utilisé pour préparer le CCF a été adapté de la méthode décrite par Desender *et al.* (2006). *P. infestans* se développe dans un milieu de culture liquide stérile de petit pois pendant trois semaines à 15°C, à l'obscurité et sous agitation. La solution est filtrée avec des compresses non-tissées stériles pour séparer le mycélium du bouillon de culture. Ensuite le filtrat est lyophilisé pendant 72h et après conservé à -20°C. Le CCF est mis en solution à une concentration de 8 mg/ml de matière lyophilisée (ML). L'efficacité du CCF a été testée suivant la méthode développée par Kröner *et al.* (2011).

**Production de l'extrait d'*Ulva* :** L'extrait d'algue a été produit à partir d'un lot d'*Ulva* spp. récoltées la même année (2014) par le Laboratoire de Nutrition Végétale du Groupe Roullier à Saint-Malo. L'extraction des composés de l'algue est réalisée dans une solution d'éthanol, suivant la méthode de Jaulneau *et al.* (2010). Pour ce projet, l'extrait a été utilisé à 3 et 8 mg/ml de matière sèche (MS) d'algue et l'extrait formulé à 3 mg/ml MS. Le protocole



**Figure 1. Design expérimental des essais de la thèse**

Les éliciteurs de différentes origines : le BABA, le CCF, les extraits d'*Ulva* à 3 et 8 mg/ml et l'extrait d'*Ulva* formulé à 3 mg/ml + le contrôle, ont été testés sur deux génotypes de pomme de terre avec différents niveaux de résistances à *P. infestans* (*Bintje* et *Désirée*) âgés de 4 semaines. Chaque modalité comprend 6 plantes 12 ou 24 folioles par plante (essai de 2017 et 2019), ont été récoltées respectivement après les traitements à des temps de cinétique correspondant à la question scientifique. Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et ensuite lyophilisés.

détaillé d'extraction ainsi que le formulant utilisé dans le produit sont maintenus en confidentialité par l'entreprise (Briand *et al.*, 2006).

**Le BABA** : L'acide aminé non protéique, est une molécule à 97% de pureté obtenu chez le fournisseur Sigma-Aldrich France (CAS : 541-48-0) et utilisé à 0,5mM (Burlot, 2017).

### 3. Protocole expérimental

Les plantes, âgées de quatre semaines, ont été pulvérisées respectivement jusqu'à ruissellement, avec les trois éliciteurs. Il y a donc 7 modalités par génotype et chaque modalité contient 6 plantes. A quatre semaines de culture, 24 folioles de chacune des plantes ont été récoltées au 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> étage foliaire (en partant du haut). Ces étages foliaires ont été choisis pour avoir un tissu jeune et une homogénéité des réactions de défense de la plante (Figure 1). Ce protocole a été mis en œuvre à deux reprises pendant la thèse.

Les « Chapitre I et II » sont basés sur les essais cultivés au printemps 2017 (deux essais indépendants) avec les génotypes Bintje et Désirée et 24 folioles/plante ont été récoltées à 48h après traitement par les éliciteurs, pour répondre aux questions suivantes : (i) L'induction dépend-t-elle de l'origine des éliciteurs ? et (ii) Les réponses de défense sont-elles identiques quel que soit le niveau de résistance des variétés ?

Le « Chapitre III » est basé sur l'essai cultivé au printemps 2019 et 12 folioles ont été récoltées sur une cinétique de 0h, 6h, 24h, 48h et 96h. Pour cet essai, nous avons choisi la variété Désirée qui se montrait plus inductible après élicitation. Cette expérimentation a été mise en place pour répondre à la question : La cinétique d'induction est-elle identique quel que soit l'éliciteur ?

Après le(s) temps de traitements spécifiques à chaque essai, les folioles ont été récoltées dans un tube Falcon (un par plante) de 15 ml contenant 20 billes de verre puis ont été congelées instantanément dans l'azote liquide. Elles ont ensuite été conservées à -80°C jusqu'à lyophilisation pendant 24h et broyées à température ambiante avec le FastPrep<sup>®</sup>-24 Classic Instrument (MP BIOMEDICALS) pour 6 fois de 30 secondes chacun avec des « runs » de 4,0 m/s. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'aux analyses transcriptomique et/ou métabolomique. Deux expérimentations indépendantes ont été réalisées à une ou deux semaines d'intervalle. Les analyses métabolomiques ont été réalisées au Laboratoire de Nutrition de Plantes du CMI Roullier à Saint Malo et les analyses transcriptomiques à l'UMR IGEP et à la Plateforme Génomique Environnementale et Humaine de Beaulieu (Université Rennes 1).



**Tableau 1. Paramètres de la machine Waters ACQUITY UPLC-QToF-MS<sup>e</sup> pour les analyses métabolomiques non-ciblées**

<b>Colonne</b>	<b>C18</b>
	<b>Phenomenex - Kinex - 2,6µm EVO C18 100Å - LC Column 150 x 2,1 mm</b>
<b>Mode</b>	<b>Positive (P) and Negative (N)</b>
<b>Lock Spray Configurations</b>	
Reference Scan Frequency (sec)	10,000
Reference Cone Voltage (V)	30,000
Reference Collision Energy	6,000
Reference DRE Setting	87,23 (P) and 99,900 (N)
<b>Experimental Instrument Parameters</b>	
Polarity	ES+ and ES-
Analyser	Resolution Mode
Capillary (kv)	3,0 (P) and 2,5 (N)
Sampling Cone	30,0000
Sorce Temperature (°C)	120
Source offset	80
Desolvation Temperature (°C)	550
Cone Gas Flow (L/Hr)	20,0
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	900,0
<b>Acquisition mass range</b>	
Start mass	50,000
End mass	900,000
<b>Detector - Waters Acquity CM</b>	
Target Column Temperature	35 °C
<b>Autosampler</b>	
Target Sample Temperature	10°C
<b>Sample Run Injection Prameter</b>	
Injection Volume (ul)	7,00
Start and End time (mins)	0,000 to 14,000

Un partenariat avec l'Université de Rouen a permis de tester la composition pariétale et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) après traitement par les éliciteurs et le génotype Désirée. Le « Matériel et Méthode » des essais réalisés à Rouen sera présenté dans le « Chapitre II ».

## V. Analyses métabolomiques

Les échantillons lyophilisés ont été transportés dans les tubes Falcon en carboglace (-80°C) de l'UMR IGEP au Rheu pour le CMI à Saint Malo et remis au congélateur à -80°C pour attendre les analyses. Chaque échantillon correspond au prélèvement des 24 folioles sur une plante et par conséquent chaque plante est analysée individuellement.

### 1. Analyses non-ciblées

L'extraction des métabolites est réalisée à partir de 10 mg de matériel lyophilisé par la méthode à base de méthanol 70:29:1 (méthanol/eau ultra pure/acide formique), protocole adapté de Yogendra *et al.* (2014a). Le méthanol et l'acide formique ont été acquis chez Fisher®. Ce solvant, préparé au laboratoire, permet l'extraction des composés polaires à semi-polaires. Les solvants adaptés aux analyses LC-MS ont une pureté  $\geq 98\%$ . 1 ml du solvant est ajouté dans chaque échantillon ainsi que 2 billes métalliques de 3 mm pour lyser les cellules. Les échantillons sont broyés dans un broyeur vibrant à billes (Retsch MM400) 1 min à 30Hz puis agités 30 min avec le vortex à vitesse 7. Une centrifugation de 20 min à 4°C à 18.213 g est ensuite réalisée puis les surnageants sont récupérés. Une deuxième extraction est réalisée à partir culot restant sur lequel 500  $\mu$ l de solvant d'extraction sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite « vortexés » 5 min, vitesse 7, et centrifugés 10 min à la même rotation. Le surnageant est de nouveau récupéré et mélangé au surnageant de la 1<sup>ère</sup> extraction.

Les analyses ont été réalisées sur une machine à chromatographie liquide couplée à la masse : Ultra-High-performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer – Xevo G2-S QToF (UPLC-qTOF-MS<sup>c</sup>, Waters), avec une colonne EVO C18 - 150 x 2,1mm (Phenomenex Kinax 2,6  $\mu$ m 100Å). Les paramètres de l'analyse sont réunis dans le tableau 1. Deux solvants d'élution sont injectés avec les échantillons : le solvant A est constitué par de l'eau ultra pure + 0,1 % d'acide formique et le solvant B par de l'acetonitrile + 0,1 % d'acide formique. Le gradient est linéaire et commence avec 99% du solvant A, diminue linéairement jusqu'à 14 minutes où le solvant B est déjà à 100%. Donc de 0-14 min, le solvant A diminue; de 14-18 min, le solvant B reste à 100% B et entre 18-20 min, se fait le



nettoyage de la colonne avec 99% du solvant A. Le débit du solvant est de 0,6 ml/min. La colonne est maintenue à 35°C pendant toute l'analyse. Les échantillons maintenus à température constante de 10°C sont injectés à un volume de 7 µl. Ce volume a été ajusté pour diminuer la saturation des pics dans la machine.

Deux modes d'ionisation en « Electrospray ionisation » (ESI), positive et négative, sous tension capillaire de 3,0 kV et 2,5 kV, respectivement, sont adoptés. L'ESI- et ESI+ sont utilisés pour élargir le nombre de molécules trouvées dans les plantes. La température de la source est stabilisée à 120°C avec un débit de gaz de 20 l.hr<sup>-1</sup>. La température de désolvatation est de 550°C avec un débit de gaz de 900 l.hr<sup>-1</sup>.

La Leucine Enkephalin (Waters) ou « Lock Spray », une molécule de masse et temps de rétention connue, a été utilisée à une concentration de 1 ng/µl pour la calibration en temps réel de l'analyse. Cette solution est ajoutée à chaque 10 secondes sur une tension dans le cône de 10V et une énergie de collision de 6V. L'analyseur de masse est de type « Time-of-Flight » sur le mode d'acquisition MS<sup>e</sup> et le mode d'analyse est « résolution » avec pour objectif de détecter les principales molécules dans les échantillons. Les masses entre 50 à 900 Da sont annotées dans le spectre de chaque échantillon.

Le contrôle qualité (QC) se fait avec l'ensemble des échantillons à injecter et contient un volume égal de chaque échantillon extrait. Le QC permet une correction *a posteriori* des effets de déviation de la machine et la vérification de la qualité de l'analyse. Le conditionnement de la colonne aux métabolites des échantillons est fait par le QC qui est injecté 15 fois au début de l'analyse puis la solution QC est injectée à chaque 5 injections des échantillons pour permettre la correction des déviations.

Les échantillons des plantes, Bintje et Désirée, cultivées au sein du même essai biologique ont été analysés dans le même « run » de la machine pour avoir le même temps de rétention des molécules et pouvoir les comparer.

### 1.1 Traitements des données métabolomiques non-ciblées

Les analyses par chromatographie liquide couplées à la masse ont plusieurs avantages comme la sensibilité à des molécules de petite taille, mais les résultats dépendent des paramètres utilisés au moment de l'analyse des métabolites, la fragmentation du métabolite et la marque de l'appareil/laboratoire (Gika *et al.*, 2014).



Les analyses métabolomiques non-ciblées permettent de mettre en évidence un grand nombre de métabolites produits dans la plante. Pour traiter ce grand jeu de données, nous avons utilisé le logiciel « ProgenesisQI<sup>®</sup> » (Waters) qui suit les étapes d'importation, d'alignement, de « peak picking », de design expérimental et d'identification de composants. Les pics ont été filtrés par l'Anova ( $p \leq 0,05$ ) avec une valeur de Max fold change  $\geq 2$  et les faux positifs enlevés par le test de q-value ( $p < 0,05$ ). Cette étape enlève les pics considérés comme du bruit de fond et les métabolites qui n'étaient pas différentiels entre les traitements.

### 1.2 Base de données de métabolites des plantes

Après traitement des données, il faut sélectionner les métabolites d'intérêt et les identifier mais les bases de données « online » ne sont pas toujours adaptées pour l'identification de tous les métabolites et surtout pas très riches pour le domaine végétal. Une base de données a donc été construite au laboratoire avec l'objectif d'améliorer l'identification des métabolites d'intérêt et d'avoir une rapidité de l'identification. Les métabolites référencés sont issus (i) des articles publiés sur les métabolites des Solanacées (Yogendra *et al.*, 2014b; Yogendra *et al.*, 2014a; Sade *et al.*, 2015) et (ii) de bases de données « online » (KEGG, PubChem and CHEBI). Nous avons référencé 2.981 métabolites dans notre base de données avec les informations suivantes : l'identification des composés dans les bases des données, le nom du métabolite, la formule chimique, la masse monoisotopique et le lien URL de récupération de l'information, les voies métaboliques priorisées au début du projet faisant partie du métabolisme secondaire des plantes. Cette première partie de la base de données a été construite au début de la thèse et enrichie au cours de la thèse avec des nouveaux métabolites en particulier avec l'ajout de métabolites du métabolisme primaire. Ce travail a été réalisé avec le soutien d'une ingénieure d'étude, Pauline Clin, en 2019. Le logiciel de Waters peut identifier les métabolites d'après une description théorique des molécules (la formule chimique, la masse isotopique...) ainsi que par ces structures chimiques. Donc, en parallèle, une base de structure chimique a été construite, avec les mêmes métabolites que ceux de la base de données, pour élargir la possibilité d'identification par le logiciel de traitement de données.

Cette base de données est appliquée sur « ProgenesisQI<sup>®</sup> » et dans la majorité des cas elle propose pour un seul pic, plusieurs métabolites possibles. La validation de la bonne proposition est faite en se basant sur les critères suivants : les métabolites qui appartiennent à la même famille, l'erreur de masse de  $\pm 5$  ppm par rapport à la formule chimique un profil MS<sup>e</sup> ou MS/MS théorique quand le logiciel peut le construire, la similarité isotopique des profils plus élevé sont considérés dans les critères.



Cette notation est considérée putative au niveau 2 par le « COSMOS Project » (Coordination of Standards in Metabolomics - <http://cosmos-428.fp7.eu/msi.html> - “Level 2” - Putatively annotated compounds). Finalement, plusieurs filtres ont été appliqués pour la matrice de donnée utilisée dans les résultats des analyses métabolomiques non-ciblées. Les métabolites ont été sélectionnés par les filtres statistiques et par identification des métabolites par la base de données. Entre les jeux de données de ESI- et ESI+ quelques métabolites communs ont été validés selon les critères suivants : (i) temps de rétention similaire et (ii) même induction des éliciteurs.

## 2. Analyses ciblées

### 2.1 Prélèvement à 48h (Essai 2017)

Certains métabolites ont été identifiés putativement et nous avons fait une sélection pour les quantifier. Cette quantification a été possible quand les standards commerciaux étaient disponibles. Les critères de choix ont été : la fonction biologique de la molécule et la différence significative de ce métabolite entre génotypes et entre traitements. Les analyses ont été réalisées par Pauline Le Boulch (2018).

Compte tenu de ces critères, les métabolites choisis sont les suivants : la fraxine (Sigma - CAS: 524-30-1) et l'acide 4-O caffeoyl quinique (Sigma - CAS: 905-99-7) de la voie des phénylpropanoïdes, la rutine (Sigma-CAS: 207671-50-9) de la voie des flavonoïdes et  $\alpha$ -chaconine (Carbosynth - Batch n°OC293251601), voie des alcaloïdes (glycoalcaloïdes).

L'extraction des échantillons et les paramètres de l'UPLC sont les mêmes que ceux utilisés pour les analyses non-ciblées. Les métabolites sélectionnés sont chargés négativement et c'est donc l'ESI- qui a été utilisé. Tous les échantillons ont été quantifiés avec une gamme de dilution contenant un mélange des 4 standards utilisés. Nous avons étudié la concentration des métabolites dans les échantillons puis les gammes d'étalonnages ont été préparées. Les points de gamme 100 ppb, 200 ppb, 400 ppb, 600 ppb, 800 ppb, 1,5 ppm, 3 ppm, 6 ppm, 12 ppm, 20 ppm et 50 ppm ont été choisis et préparés à partir des solutions mères des standards concentrés à 1 mg/ml. Les points de gamme faible (ppb) ciblent la fraxine et les points de gamme en ppm ciblent les autres métabolites. Finalement, la fraxine était présente dans les échantillons, mais sa concentration faible s'approche du bruit de fond.





### 2.2 Cinétique (Essai 2019)

Le génotype Désirée a été choisi pour l'étude de cinétique d'induction de réponses de défenses car d'après les résultats des analyses non-ciblées il est plus inductible que Bintje. Cet essai et les analyses des données ont fait l'objet du stage de Master 2 de Thibaud Legros (2019).

Le nombre des métabolites à quantifier a été élargi pour étudier d'autres voies métaboliques. De nouveaux standards ont donc été retenus : la rutine, l'acide 4-O caffeoyl quinique, la  $\alpha$ -chaconine, et le rhoifoline (Sigma – CAS : 17306-46-6), la prunine (Sigma – CAS : 529-55-5), l'acide caféique (Sigma – CAS : 331-39-5), la cellobiose (Sigma – CAS : 528-50-7) et l'acide salicylique (Sigma – CAS : 69-72-7). D'autres métabolites comme l'acide shikimique, le l-tyrosine, l'acide (R)-mevalonique, le (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride, l'acide dihydrofolique, le 2-OPDA et l'acide jasmonique ont également été étudiés mais nos méthodes ne nous ont pas permis de les quantifier.

Le protocole d'analyse utilisé précédemment n'était pas adapté aux nouveaux échantillons. Les métabolites choisis cette fois-ci n'étant pas très concentrés dans les échantillons, nous avons donc changé le mode d'acquisition pour le mode sensibilité (détaillé ci-dessous dans le point 2.2.3-c). Ce mode « sensibilité » permet de trouver plus de métabolites dans les échantillons mais a nécessité de développer une nouvelle méthodologie pour l'UPLC. En effet, la grande quantité de métabolites présents dans les échantillons pouvait gêner la quantification des métabolites ciblés.

#### 2.2.1 Extraction des échantillons

Une étape finale de purification des échantillons a été ajoutée dans le protocole d'extraction précédent. Les échantillons placés en plaques de 96 puits de 2 ml sont évaporés à sec sous flux d'azote à 40°C (Biotage SPE DRY96). Ensuite ils sont dilués dans 800  $\mu$ l d'une solution d'eau ultra pure avec 2% d'acide formique. Cette solution est filtrée ( $> 0,2 \mu$ m) et passe par une colonne Evolute ® Express ABN 30 mg<sup>-1</sup> ml. La colonne est lavée avec 1 ml de méthanol et les solutions sont reprises dans une nouvelle plaque de 96 puits de 2 ml. Le méthanol est évaporé à sec sous flux d'azote à 40°C et les échantillons sont conservés à -20°C. La purification permet d'éluer les composés très polaires qui ne sont pas retenus par la colonne.

Ces échantillons ont été re-dilués avec le solvant d'extraction classique (méthanol/eau/acide formique – 70:29:1). Ensuite, deux dilutions des solutions mères des



échantillons ont été faites à partir de la concentration initiale des métabolites dans les plantes. Une analyse a été faite avec la solution mère et l'autre avec des échantillons dilués 20 fois.

### 2.2.2 Nouvelle gamme d'étalonnage

Pour évaluer la concentration des métabolites dans la plante, deux gammes d'étalonnage ont été préparées. La première pour les échantillons dilués 20 fois est composée de 9 points : 50 ppb - 100 ppb - 200 ppb - 500 ppb - 1 ppm - 2 ppm - 5 ppm - 10 ppm - 20 ppm. Cette gamme permet de mesurer la concentration de la chaconine, l'acide 4-O caffeoyl quinique et la cellobiose. La deuxième gamme est composée de 10 points : 10 ppb - 20 ppb - 50 ppb - 100 ppb - 200 ppb - 500 ppb - 1 ppm - 2 ppm - 5 ppm - 10 ppm ; la cellobiose, la rutine, le rhoifoline, la prunine, l'acide caféique et l'acide salicylique ont été ciblés par cette gamme. Le QC pour cette analyse est un point de la gamme d'étalonnage.

### 2.2.3 Analyse UPLC-QToF-MS ESI- : mode sensible

Deux changements ont été faits pour l'analyse des échantillons. L'analyse est toujours faite en ESI-, mais le mode d'analyse a été changé pour le mode sensible. L'objectif est d'identifier des molécules présentes à de faible concentration. Le deuxième changement est le temps d'acquisition des données et du nettoyage de la machine. Au lieu de 14 min d'analyse, il y a eu une diminution d'une minute dont 13 min de temps d'analyse avec le même débit et 7 min sont ensuite consacrées pour nettoyer la colonne. Cette manipulation a eu pour but de cibler les temps de rétention des métabolites étudiés et limiter la saturation du détecteur de masse.

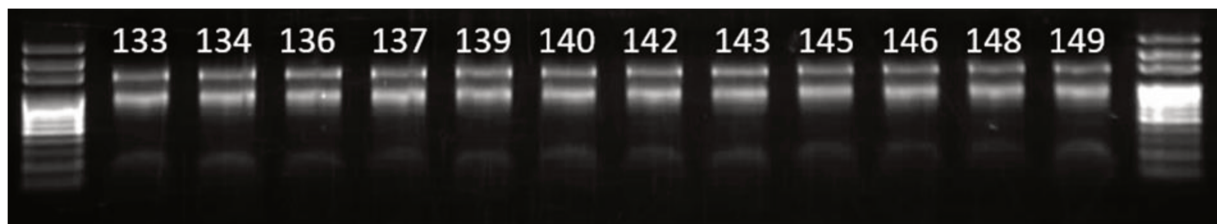
### 2.2.4 Les traitements des données métabolomiques ciblées

Pour les deux analyses ciblées, le traitement des données a été effectué *via* le logiciel « Masslynx » qui calcule l'aire des pics des standards pour chaque échantillon analysé. La concentration du métabolite est estimée par rapport à l'aire des pics déterminée d'après la gamme.

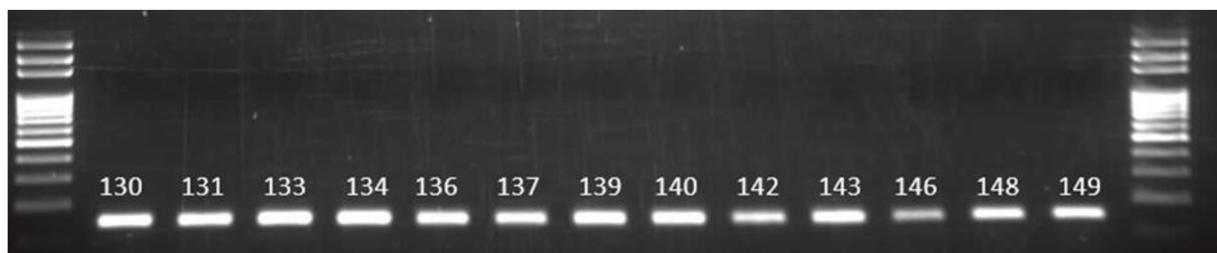
Sur l'essai de cinétique (2019), même avec les changements faits pour diminuer la saturation du détecteur de masse et par conséquent l'effet matrice, les contrôles qualités pouvaient varier. Thibaud Legros a alors développé une méthodologie de normalisation en fonction de la variation des contrôles qualités tout au long de l'analyse. La normalisation est obtenue selon le calcul :

$$TV_n = (QC_0 - ((y \times n) + QC_0)) / QC_0 \text{ et } CN_n = C_n + (TV_n \times C_n).$$

A.



B.



**Figure 2. Contrôle qualité de l'extraction des ARNs jusqu'à traduction des échantillons en cDNA**

*Electrophorèse sur gel d'agarose (A) à 1% présentant la migration des ARNs et (B) à 1,5% présentant la migration des cDNA.*

Le  $TV_n$  correspond au taux de variation associé au point de passage dans l'UPLC-QToF-MS<sup>e</sup> (n) d'après la régression linéaire issue de la variation du QC ;  $QC_0$ , concentration en  $\mu\text{g/ml}$  de la première mesure du QC ;  $y$ , coefficient de la droite de régression linéaire issue de la variation des QC au cours de l'analyse ;  $n$ , ordre de passage ;  $CN_n$ , concentration normalisée associée à  $n$  ; et  $C_n$ , mesure obtenue chez l'individu  $n$ .

### 3. Analyses transcriptomiques

Le protocole d'analyse des données transcriptomiques a été développé pendant la thèse de Guillaume Saubeau (2014) et adapté par Cécile Thomas (2019). Nous avons testé es gènes de ménage suivants : *L2*,  *$\beta$ -tubuline*, *Actine 7* et *GAPDH*. Le(s) gène(s) ou couple de gènes plus stables ont été sélectionnés par l'algorithme « NormFinder » (Andersen *et al.*, 2004). Le gène *GAPDH* a été toujours le gène candidat le plus stable et par conséquent le gène choisi pour normaliser les données et d'évaluer l'accumulation des transcrits.

Chaque modalité est composée par 6 plantes individualisées au moment de la récolte, et les folioles prélevées sont congelées immédiatement à l'azote liquide, lyophilisées et conservées à  $-80^\circ\text{C}$  à l'UMR IGEPP au Rheu. Pour les échantillons récoltés en 2017, 24 folioles ont été prélevées et pour les échantillons récoltés en 2019, 12 folioles ont été prélevées. Les folioles des plantes d'une même modalité sont rassemblées dans un seul échantillon. Ce choix a été fait en raison de limitations techniques mais aussi financières pour l'analyse totale de l'essai car le nombre d'échantillons *versus* le nombre de gènes à tester est grand. A partir du pool d'échantillons, au minimum deux aliquots de 15 mg sont utilisés pour les extractions d'ARNs.

#### 3.1 Extraction des ARNs et production des ADNc

L'extraction a été réalisée avec le kit « SV Total Isolation System » (Promega<sup>®</sup>) selon le protocole décrit par Saubeau (2014). La concentration en ARN dans chaque échantillon ainsi que la qualité des extractions ont été évaluées avec un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La qualité des ARNs a ensuite été déterminée par une migration des échantillons sur gel d'agarose 1% avec Sybr Safe à raison de  $600\text{ ng}/\mu\text{L}$  d'ARN par puit (Figure 2A). L'ADN complémentaire est réalisé avec le kit « iScript cDNA Synthesis » (Biorad<sup>®</sup>). Chaque réaction contient un volume de  $50\text{ ng}/\mu\text{l}$  d'ARN, une enzyme « nuclease free water » et la rétro-transcriptase dans un volume final de  $20\ \mu\text{l}$ . Le programme de la PCR pour les réactions est de 5 min à  $25^\circ\text{C}$  ; 30 min à  $42^\circ\text{C}$  ; 5 min à  $85^\circ\text{C}$  ; et 3h à  $4^\circ\text{C}$  (conservation des échantillons).

**Tableau 2 - Gènes de défenses utilisées dans les analyses transcriptomiques**

Correspondance of metabolic pathway	Gene name	NCBI's GenBank number	Gene function
PR proteins	PR1	AJ250136	Pathogenesis-related protein 1
	PR2	U01901	Pathogenesis-related protein 2 ( $\beta$ -glucanase)
	PR4	AM908515.1	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)
	PR5a	XM_006364057.2	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin like)
Phenylpropanoid pathway	PAL	XM_006367472	Phenylalanine ammonia-lyase 1
	C4H	XM_006350825	Trans-cinnamate 4-monooxygenase
	4CL	M62755	4-coumarate-CoA ligase
	C3H	BQ513122	P-coumarate 3-hydroxylase
Flavonoid pathway	CHS2	NM_001288367.1	Chalcone synthase
Alkaloid and Terpenoid pathways	HMGR2	AB041031	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase 2
	SQS	JF202610	Squalene synthase
	DXS1	GU936657.1	1-D-deoxyxylulose 5-phosphate synthase
	PDS	AY484445.1	Phytoene desaturase
	SGT1	NM_001318679.1	Scopoletin glucosyltransferase-like
	SGT2	JN695006	UDP-glucose:solanidine glucosyltransferase
Parietal modification	SGT3	HM188447	rhamnose:beta-solanine/beta-chaconine rhamnosyltransferase
	CalS2	TA45471_4113	Callose synthase
Système antioxydant	POX	AM231411	Peroxidase (putative peroxidase)
	APX	AB041343	Ascorbate peroxidase
JA pathway	OPR3		12-oxophytodienoate reductase 3
	MeJA	AY615276	Methyl jasmonate esterase
Ethylene pathway	EIN3	CK279984	Potato ethylene-insensitive 3 (EIN3-binding F box protein 1)
Transcription factor	WRKY1	AJ278507	WRKY transcription factor 1
Reference genes	L2	39816659	Ribosomal protein L2
	GAPDH	U170005	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	$\beta$ -tubuline	609267	$\beta$ -tubulin
	Actine	DQ252512.1	Actin 7

Une vérification de la pureté et de la qualité des ADNc obtenus est effectuée par PCR en utilisant des amorces spécifiques d'un gène codant la protéine PR2 dont les transcrits sont toujours exprimés (Figure 2B). La réaction se fait dans une solution composée de 12,1 µL de l'eau ultra pure stérile, 4 µL de tampon GoTaq (5x), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de dNTP (2,5 mM chacun), 0,6 µL d'amorce « forward » PR2 10µM, 0,6 µL d'amorce « reverse » la PR2 à 10µM, 0,05 µL d'enzyme Taq et 1 µl d'ADNc. La vérification est faite par PCR sous un programme de 5 min à 95°C (1 cycle) ; 45 sec à 95°C, 45 sec à 60°C et 15 sec à 72°C (50 cycles) ; 15 min à 72°C (1 cycle). Après toutes les étapes de validation, l'échantillon est prêt pour la qPCR.

### 3.2 Design d'amorces

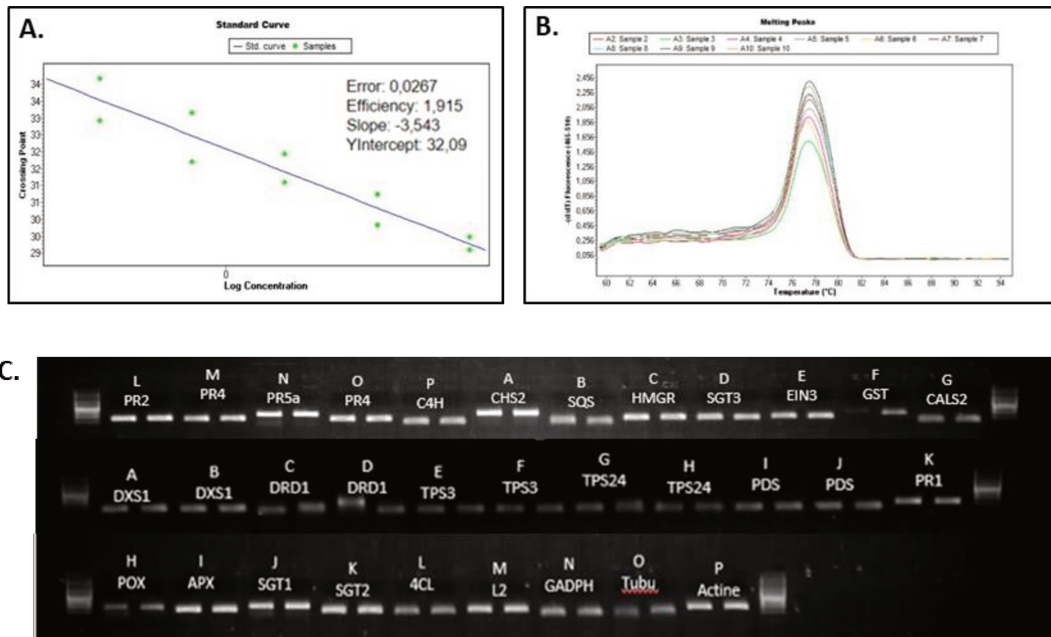
Nous avons sélectionné 15 gènes de la puce qPFD (*PR1*, *PR2*, *PR4*, *C4H*, *HMGR2*, *Cals2*, *POX*, *APX*, *MeJA*, *EIN3*, *WRKY1*, *L2*, *GAPDH*, *β-tubuline* et *Actine*) et redessiné 12 autres gènes (*PR5a*, *PAL*, *4CL*, *C3H*, *CHS2*, *SSI*, *DXS1*, *PDS*, *SGT1*, *SGT2*, *SGT3* et *OPR3*) (Le Boulch (2018) et Legros (2019)).

La gamme de gènes a été augmentée pour étudier les voies de phénylpropanoïdes (*C3H* et *CHS2*), terpénoïdes (*DXS1* et *PDS*) et des stérols alcaloïdes (*SGT1*, *SGT2* et *SGT3*). Les autres gènes appartenait à la puce qPFD, mais ils ont été *de novo* désignés pour améliorer l'efficacité des couples d'amorces. Tous les couples d'amorces utilisés pendant la thèse sont présentés et référencés dans le tableau 2.

Le nouveau design a été effectué à l'aide de Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les séquences de chacun de ces gènes (Tableau 2), annotés dans le génome de *Solanum tuberosum*, ont été obtenues sur GenBank de NCBI. Un alignement des séquences avec le génome de la pomme de terre a pu être directement effectué *via* Primer Blast. Lorsque des gènes avaient plusieurs transcrits, le design des amorces a été réalisé uniquement sur les parties communes aux transcrits.

A partir des informations fournies par PrimerBlast sur chaque couple d'amorces dessiné, une première sélection a été faite selon les critères suivants: (i) la température d'hybridation entre les amorces « forward » et « reverse » doit être comprise entre 58 et 62°C (condition optimale standard, com perso Desert C.) afin que les deux amorces puissent s'hybrider aux brins d'ADN dans les mêmes conditions de température et dans les conditions du programme qPCR, identique pour tous les gènes : 5 min à 95°C (1 cycle) ; 5 min à 95°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C (50 cycles) ; 30 sec à 95°C (1 cycle) ; 30 sec à 60°C (1 cycle) ;

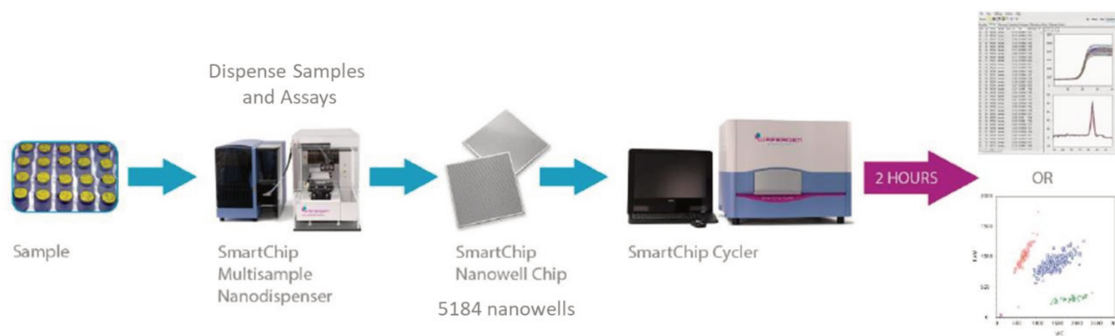




**Figure 3. Exemple de validation des amorces testées**

(A) Droite d'efficacité du gène *DXS1* en fonction du nombre de Ct et du log10 de la concentration issue de la gamme d'étalonnage et (B) la courbe de fusion pour le même gène. (C) Electrophorèse sur gel d'agarose à 2% présentant la migration des couples d'amorces après qPCR, le point de gamme utilisé est le 1/16.

**SmartChip™ Real-Time PCR System Workflow Overview**



**Figure 4. Procédure d'analyse de le SmartChip de Wafergen à la plateforme GEH**

et augmentation continu de 0,03°C pour atteindre 95°C (infini). (ii) L'indice d'appariement des deux amorces en 5' ou 3', c'est à dire la possibilité que les deux amorces s'hybrident entre elles, ne doit pas excéder 5 (maximum acceptable, com perso Desert C). L'efficacité des couples d'amorces a ensuite été analysée.

A partir des Ct « Threshold cycle » et de la gamme de dilution, une droite d'efficacité est générée par analyse qPCR avec l'appareil « Lightcycler480 ». Une analyse de la courbe de fusion des produits PCR est réalisée pour vérifier la spécificité des couples d'amorces pour un seul produit PCR. Afin de compléter les résultats obtenus par le « Lightcycler480 », une migration à 120V des produits PCR pour chaque amorce a été effectuée sur gel d'agarose 2% avec un tampon GoTaq (Figure 3).

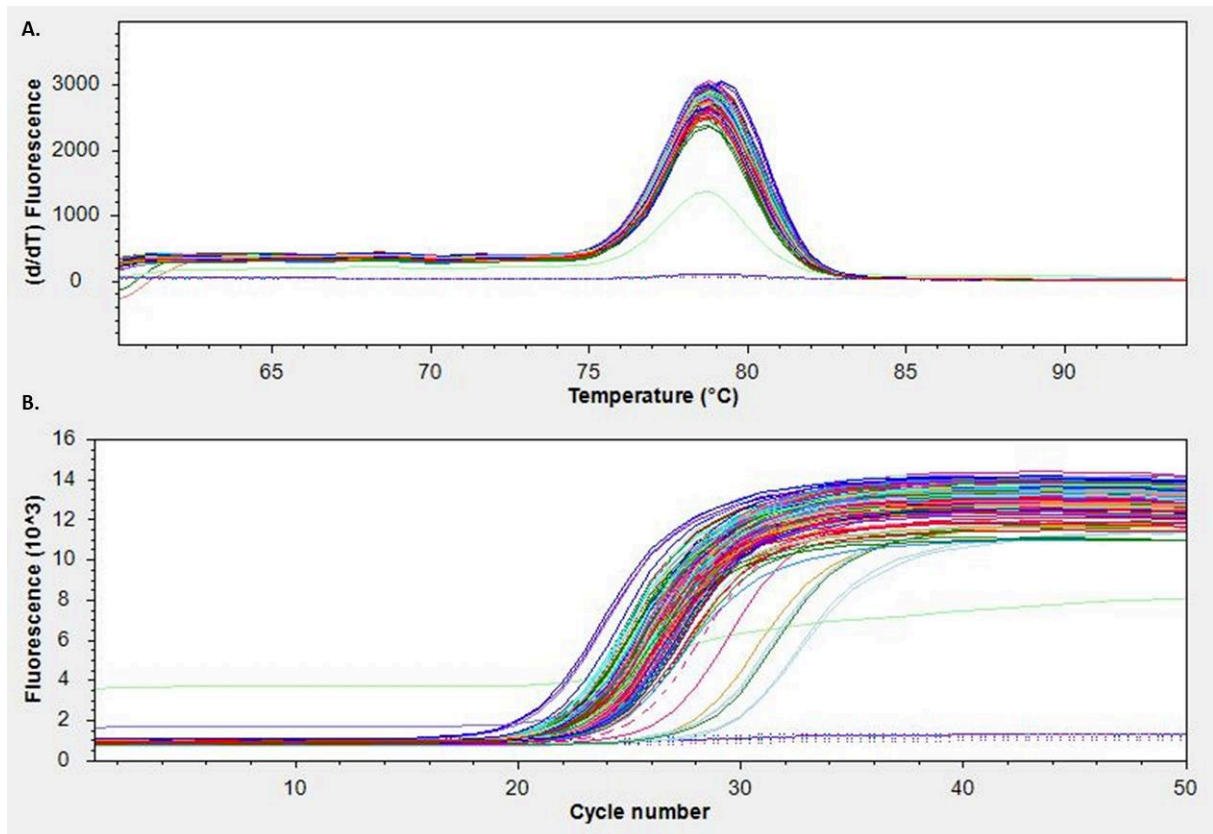
Les critères permettant de valider un couple d'amorces sont (i) la présence d'un seul pic sur la courbe de fusion, confirmant l'amplification d'un seul fragment et (ii) une efficacité d'amplification supérieure à 85%, qui se traduit par une pente de la droite d'efficacité proche de -3,22, calculé par la formule :  $E=10^{[-1/\text{slope}]}$  (E=efficacité) (Figure 3). Pour une bonne amplification, l'efficacité doit être comprise entre 1,7 et 2,2. Après ces étapes, les couples d'amorces ont été choisis pour la suite des expérimentations (Tableau 2).

### 3.3 Analyses haut-débit

L'analyse d'expression des gènes retenus sur l'ensemble des échantillons a été réalisée à la Plateforme Génomique Environnementale et Humaine de Beaulieu (Université Rennes 1). L'équipement « Smart-Chip-Real Time PCR system » (Wafergen) analysant une micro-puce qui contient 5000 puits a été utilisé suivant une conformation de 24 gènes/216 échantillons (Figure 4). Chaque gène extrait des échantillons et les quatre gènes de ménage sont déposés en triplicata sur la puce. Le programme qPCR est le même que celui utilisé pour la validation des amorces. Trois plaques « Smart-Chip » ont été réalisées pendant la thèse ; une pour l'analyse des échantillons du stage de Pauline Le Boulch (2018) et deux pour le stage de Thibaud Legros (2019).

### 3.4 Analyse des données transcriptomiques

Le protocole d'analyse des données transcriptomiques issus de la « Smart-Chip qPCR » a été développé par Cécile Thomas (2019). Les jeux de données obtenues *via* la plateforme ont été analysées avec le logiciel Wafergen-Smart-Chip qPCR Software fournies par la plateforme GEH. Ce logiciel a permis de vérifier la qualité d'amplification des couples d'amorces et de calculer leur efficacité (Figure 5).



*Figure 5. Courbe de fusion et amplification pour le gène 4CL produit par le logiciel de Wafergen après analyse RT-qPCR*

Les couples d'amorces avec une efficacité supérieure à 85% sont utilisés pour l'analyse (Tableau 2). Au sein des répétitions techniques, les étapes suivantes ont été réalisées :

- 1) Les valeurs de Cts s'écartant de plus au moins 1 Ct ne sont pas prises en compte pour les analyses.
- 2) La *linéarisation* des valeurs de Ct est évaluée pour tous les gènes retenus suivant le calcul :  $Ctlg = Eg^{(-Ctg)}$ , où **Ctlg** est la valeur de Ct g linéarisée et Eg est la valeur d'efficacité calculée pour ce gène g. Ce sont ces valeurs de **Ctlg** qui seront utilisées pour l'étape de normalisation.
- 3) Les Cts des gènes de ménage sont aussi linéarisés comme dans l'étape précédente. La stabilité des gènes de ménage est testée avec l'algorithme « NormFinder » (Andersen *et al.*, 2004), puis la moyenne obtenue pour le gène choisi par l'algorithme (GAPDH, dans nos conditions) est utilisée pour normaliser les Cts des gènes de défense préalablement linéarisés.
- 4) Les valeurs de **Ctlg** sont alors *normalisées* telles que :  $Ctng = Ctlg / \mu_{gm}$ , où **Ctng** est la valeur normalisée correspondant à l'accumulation de transcrits, et  $\mu_{gm}$  la valeur moyenne des **Ctl<sub>p</sub>** du GAPDH pour chacune des modalités.

#### 4. Analyses statistiques

L'analyse des jeux de données en métabolomique non-ciblée commence par l'élimination du bruit de fond et des métabolites qui ne sont pas différents statistiquement entre les traitements choisis. Cette étape est aussi réalisée sur le logiciel « ProgenesisQI® » avec une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA)  $\leq 0,05$ , le « Max Fold Change » (FC)  $\geq 2$  et un test de faux positif (q-value)  $< 0,05$  pour chaque pic identifié.

Ce jeu de données de métabolomique non-ciblée et les autres jeux de données de la thèse ont été exploités par des analyses statistiques descriptives. Cette méthode permet de révéler des groupes dans le jeu de donnée (Want and Masson, 2011). Les résultats sont étudiés sous la forme d'Analyse en Composante Principale (ACP), méthode non-supervisée donc exploratoire qui peut être utilisée sur des données numériques de différents types (Jolliffe and Cadima, 2016).

Ensuite, les mêmes données ont été soumises à une analyse hiérarchique des clusters (HCA) calculée avec la distance euclidienne et l'algorithme Ward.D2 pour le clustering utilisant le logiciel R et son package « FactoMineR ». Après identification des métabolites et l'analyse des transcrits, les données ont été représentées sous forme de « heatmap ».



Cette représentation permet de visualiser les composants ayant la même tendance d'activation ou répression. Les « heatmap » sont construites par la distance basée sur la corrélation des coefficients calculés d'après le test de Pearson et par les liaisons du test de Ward.D2 utilisant le logiciel R et son package « gplot ». L'abondance normalisée par métabolites et l'accumulation des transcrits sont présentées sous forme d'histogrammes. La différence entre les traitements a été vérifiée avec une nouvelle analyse de variance avec les modèles linéaires adaptés avec une p-value de  $\leq 0,05$ . Le test de Tukey HSD a également été effectué pour révéler quels groupes d'échantillons étaient différents les uns des autres (p-value  $\leq 0,05$ ). Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R avec les package « lme » « ade4 » et « Tukey.HSD ». A chaque chapitre des résultats, les tests statistiques seront présentés en détail.



## **RESULTATS**





**CHAPITRE I**  
**Analyse comparative du métabolome chez deux génotypes**  
**de pomme de terre après application des éliciteurs**



### I. Introduction

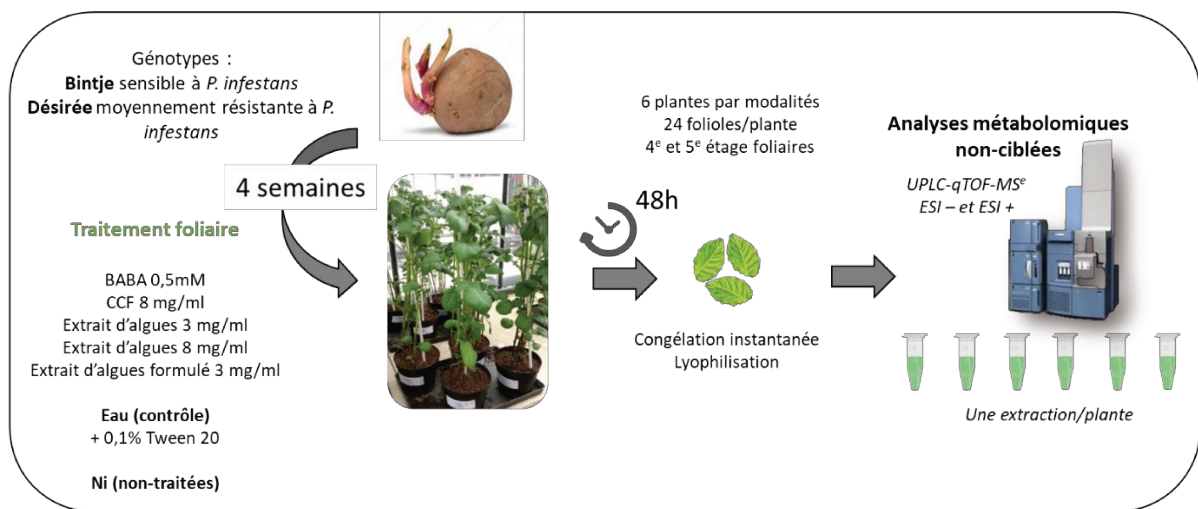
Les défenses induites au cours de la PTI sont composées par des réactions précoces et tardives qui convergent vers la production de molécules qui vont lutter contre les agents pathogènes (Boller and Felix, 2009). Les travaux antérieurs, au sein de notre laboratoire, ciblant les réponses de défense induites au cours de la PTI par des PAMPs de *P. infestans* (CCF), chez la pomme de terre ont montré qu'elles étaient génotype-dépendant (Saubeau *et al.*, 2016). Ces résultats sont obtenus aussi bien pour la signalisation hormonale que pour l'accumulation des transcrits de gènes, des voies hormonales et des principales voies de défense décrites dans la partie introduction (Saubeau, 2014; Thomas, 2019). Cependant, les études ont peu porté sur la production de protéines ou de métabolites. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant d'étudier les réactions de défense au niveau du métabolome de la pomme de terre.

**L'hypothèse de notre travail est que la production des métabolites dépendrait de l'origine de l'éliciteur mais aussi du génotype.**

En serre, les plantes de pomme de terre de deux génotypes Bintje, sensible à *P. infestans*, et Désirée, moyennement résistant (Europotato, 2019), ont été pulvérisées avec des éliciteurs de différentes origines : un PAMPs de *P. infestans* – le CCF à 8 mg/ml, l'acide  $\beta$ -amino butyrique - BABA à 0,5 mM, un extrait de l'*Ulva* spp. à 3 mg/ml ou à 8 mg/ml et l'extrait d'*Ulva* formulé à 3 mg/ml. Les éliciteurs sont dilués dans de l'eau distillée stérile avec 0,1% de Tween 20. La modalité contrôle est donc l'eau distillée stérile avec 0,1% Tween 20. Une modalité non-traitée (Ni) a été ajoutée à l'essai pour étudier l'effet « génotype » sans aucune stimulation par les éliciteurs ou par la pulvérisation.

Les traitements sont réalisés sur des plantes âgées de 4 semaines et les folioles sont récoltées 48h après traitement. Chaque modalité contenait 6 plantes et 24 folioles sont récoltées par plante au 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> étage foliaire en partant de l'apex.

Après la récolte, les folioles ont été congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C. Les échantillons ont été lyophilisés et transportés au laboratoire de Nutrition Végétale du Groupe Roullier dans la carboglace. L'extraction des métabolites a été faite par une méthode ciblée sur les métabolites polaires et semi-polaires (méthanol/eau/acide formique – 70/29/1). L'analyse métabolomique non-ciblée a été réalisée sur l'UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup> suivant deux modes d'ionisation (ESI- et ESI+) pour élargir le nombre de métabolites étudiés (métabolites primaires et secondaires). Les détails du protocole sont décrits dans la partie Matériels & Méthodes et dans la Figure 1.



**Figure 1.** « Design » expérimental des essais « génotype x éliciteurs » (2017)

Cinq éliciteurs (BABA, CCF, Extraits d'algue à 3 et 8 mg/ml et Extrait d'*Ulva* formulé) + le contrôle ont été testés sur deux génotypes de pomme de terre avec différents niveaux de résistances à *P. infestans* (*Bintje* et *Désirée*) âgés de 4 semaines. Chaque modalité comprend 6 plantes et de chaque plante 24 folioles qui ont été récoltées 48h après les traitements. Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et ensuite lyophilisés. Chaque échantillon (24 folioles/plante) a été extrait et analysé à la plateforme métabolomique de Saint Malo.

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

Ce chapitre présente les résultats obtenus suite à l'étude de l'interaction entre les génotypes et les différents éliciteurs par des analyses métabolomiques non-ciblées. Les résultats sont organisés autour de : (i) l'effet éliciteur, impliquant les modalités CCF, BABA et l'extrait d'*Ulva* sur les deux génotypes. Les résultats obtenus pour le génotype Désirée sont présentés sous la forme d'une publication soumise à la revue « **Metabolomics** » et en étape de révision. L'article s'intitule « **Elicitor-specific reprogramming of potato's metabolome during the PTI** ». A la suite à cette publication des compléments d'informations sont apportés sur l'effet « éliciteur » dans le génotype Bintje et sur l'effet génotype. Une discussion intégrant l'ensemble des résultats termine ce chapitre.

## II. Résultats

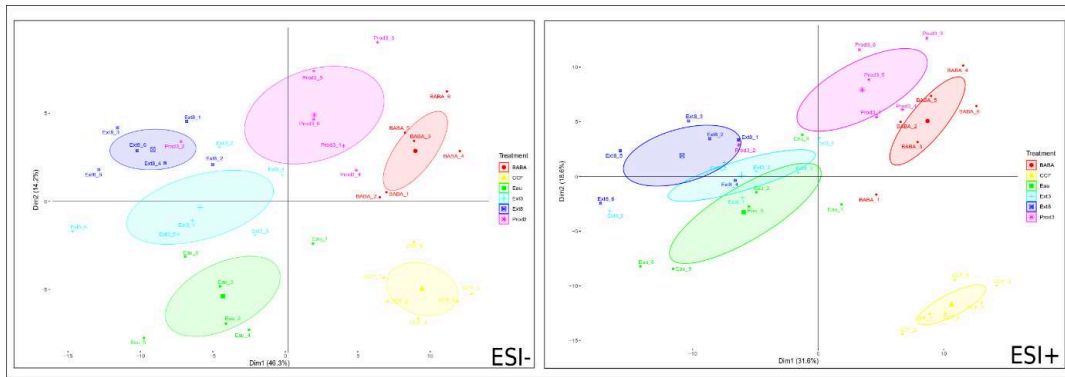
### 1. Effet « éliciteurs »

#### 1.1 Quel que soit le génotype, les éliciteurs induisent des profils métaboliques différents

Pour tester l'effet des éliciteurs, nous avons analysé séparément les génotypes traités avec les modalités CCF, BABA, extraits d'*Ulva* formulés ou non et le contrôle. Les analyses sont représentées par modes d'ionisation, positive et négative, sous forme d'ACP.

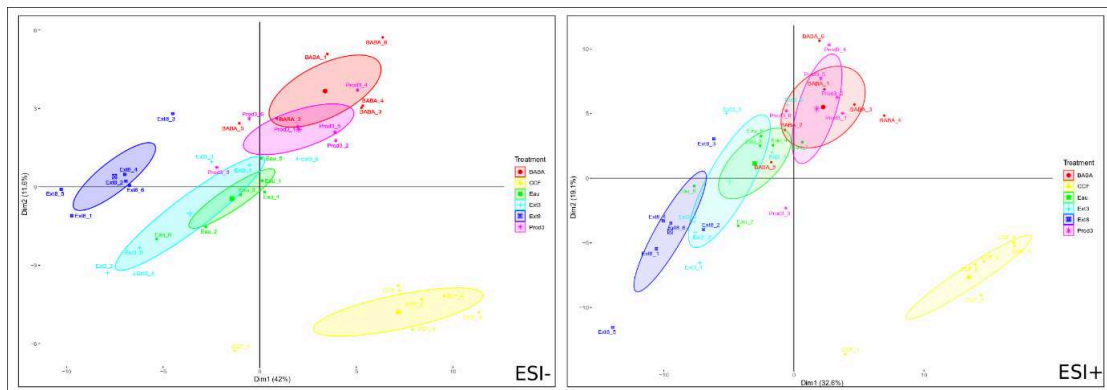
**Pour le génotype Désirée** (Figure 2), en ESI-, 60.5% de la variabilité des données est expliquée, dont 46.3% pour PC1. En ESI+, 50.2% de la variabilité des données est expliquée, dont 31.6% pour la PC1. Les deux modes d'ionisation, PC1 séparent les traitements : le CCF, le BABA et l'extrait d'*Ulva* formulé des autres traitements : l'eau, l'extrait d'*Ulva* à 3 et 8 mg/ml. Les PC2 séparent le CCF du BABA et de l'extrait d'*Ulva* formulé d'une part et l'eau de l'extrait d'*Ulva* à 8 mg/ml d'autre part. L'extrait d'*Ulva* à 3 mg/ml reste proche de ces deux derniers traitements.

**Pour le génotype Bintje** (Figure 3), en ESI-, 53.6% de la variabilité des données est expliquée, dont 42% pour PC1. En ESI+, 51.7% de la variabilité des données est expliquée, dont 32.6% en PC1. L'effet « éliciteur » est moins marqué que pour Désirée. En ESI- et ESI+, les PC1 séparent aussi les traitements CCF, BABA et l'extrait d'*Ulva* formulé des autres traitements. Les PC2 séparent le CCF du BABA et l'extrait d'*Ulva* formulé, mais les traitements « extraits d'*Ulva* » et eau ne sont pas séparés.



**Figure 2. Profils métabolomiques des plantes du génotype Désirée après traitement**

A gauche, l'ionisation négative (ESI-) et à droite, l'ionisation positive (ESI+). Les modalités sont : l'eau (vert), le CCF (jaune), le BABA (rouge), l'extrait d'Ulva à 3 mg/ml (Ext3 – bleu claire), l'extrait d'Ulva à 8 mg/ml (Ext8 – bleu foncé) et l'extrait d'Ulva formulé à 3 mg/ml (Prod3 – rose). Les ellipses représentent 95% de la région de confiance à chaque traitement. Données analysées avec le logiciel R, v. 3.3.3, package « FactoMinerR ».



**Figure 3. Profils métabolomiques des plantes du génotype Bintje après traitement**

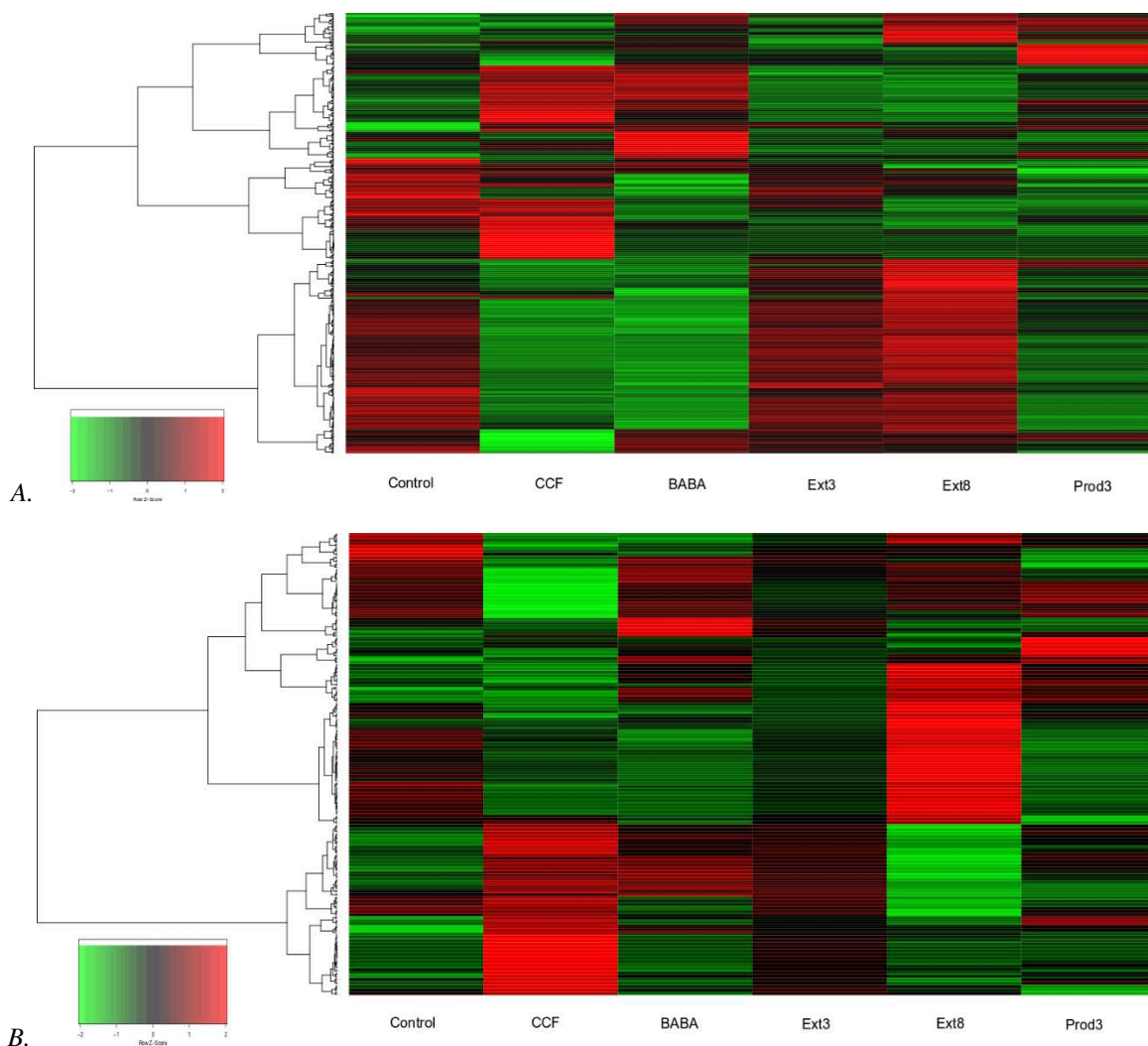
A gauche, l'ionisation négative (ESI-) et à droite, l'ionisation positive (ESI+). Les modalités sont : l'eau (vert), le CCF (jaune), le BABA (rouge), l'extrait d'Ulva à 3 mg/ml (Ext3 – bleu claire), l'extrait d'Ulva à 8 mg/ml (Ext8 – bleu foncé) et l'extrait d'Ulva formulé à 3 mg/ml (Prod3 – rose). Les ellipses représentent 95% de la région de confiance à chaque traitement. Données analysées avec le logiciel R, v. 3.3.3, package « FactoMinerR ».

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

Indépendamment du génotype le CCF, le BABA et les extraits d'*Ulva* induisent toujours des profils métaboliques différents. Curieusement, l'extrait d'*Ulva* formulé semble induire un profil métabolomique très proche de celui induit par le BABA, principalement sur le génotype Bintje. Après identification des métabolites avec la base de donnée décrite précédemment, les données de ESI- et ESI+ ont été regroupées et analysées ensemble. Sur le génotype Désirée, 399 métabolites ont été identifiés putativement et sur Bintje, 261 métabolites. Les abondances normalisées de chaque métabolite sont présentées par génotype sous forme de heatmaps (Figure 4 - A et B).

Malgré la réduction du nombre de métabolites étudiés (après identification), les heatmaps traduisent les tendances observées en ACPs en particulier chaque éliciteur induit un profil métabolomique différent. Cependant, les différents traitements présentent en commun des métabolites induits (en rouge) et réprimés (en vert) mais aussi des groupes de métabolites induits ou réprimés spécifiquement. L'induction par le CCF et le BABA conduit à des profils métaboliques distincts de ceux des autres traitements. L'eau (contrôle) et les extraits d'*Ulva* induisent des profils assez similaires. L'induction par l'extrait d'*Ulva* à 3 mg/ml conduit à un profil très proche de celui induit par l'eau dans le génotype Désirée par contre cet extrait à un effet neutre chez Bintje. Enfin, l'extrait d'*Ulva* formulé induit un profil métabolique très différent de celui induit par les extraits d'*Ulva* sans formulant suggérant des modifications de réponses de défense par le formulant lui-même (Annexe I).





**Figure 4. Profils métaboliques après identification putative des métabolites de (A) Désirée et (B) Bintje**

L'heatmap représente l'abondance des métabolites identifiés (Niveau 2) normalisée en deux ionisations (ESI- et ESI+). Les métabolites sont sur chaque ligne et les colonnes représentent l'abondance moyenne par traitement. Associé aux lignes, l'arbre de groupement hiérarchique regroupe les métabolites par la distance basée sur la corrélation calculée avec le coefficient de corrélation de Pearson et la liaison Ward. Les clusters permettent d'identifier visuellement les profils métaboliques spécifiques à chaque traitement en montrant l'effet de régulation positive (rouge), neutre (noir) et négative (vert) des traitements. L'extrait d'Ulva à 3 mg/ml = Ext3 ; l'extrait d'Ulva à 8 mg/ml = Ext8 ; et l'extrait d'Ulva formulé à 3 mg/ml = Prod3.

(A) Sur le génotype Désirée, 399 identifications putative des métabolites. (B) Sur le génotype Bintje, 261 identifications putatives des métabolites

### 2. Effet éliciteur chez Désirée : Elicitor-specific reprogramming of potato's metabolome during the PTI (Article: Metabolomics)

L'étude plus approfondie de l'effet « éliciteur » a été réalisée en focalisant sur les 3 éliciteurs suivants : CCF- PAMPs de *P. infestans* ; le BABA - produit synthétisé ; et l'extrait d'*Ulva* à 8 mg/ml, un produit naturel. Ce dernier a été choisi car il induisait un profil métabolique plus contrasté que le même extrait à 3mg/ml. L'extrait d'*Ulva* formulé n'a pas été inclus dans cette étude car c'est un produit d'intérêt commercial du Groupe Roullier qui sera breveté prochainement ce qui ne permet pas la diffusion des résultats pour l'instant (Annexe I).

Pour répondre à la question « les réponses de défenses sont-elles dépendantes de l'origine des éliciteurs ? », nous avons focalisé sur le génotype Désirée qui s'est montré plus inductible par les éliciteurs que le génotype Bintje. Cette étude a fait l'objet de la publication présentée ci-dessous. Les résultats obtenus pour Bintje sont présentés en complément de cette publication.

*NB : La diminution du nombre des éliciteurs analysés a fait que le nombre des métabolites identifiés a changé. A chaque « design » expérimental, les tests statistiques sélectionnaient les métabolites significatifs.*



**Authors names:**

**Rafaela Lopes Martin<sup>a,b</sup>, Pauline Clin<sup>a</sup>, Adrián Schwarzenberg<sup>b</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>b</sup>, Eric Nguema-Ona<sup>b</sup> and Florence Val<sup>a\*</sup>**

**Title:**

**Elicitor-specific reprogramming of potato's metabolome during the PTI**

**Affiliations of the authors:**

<sup>a</sup>AGROCAMPUS-OUEST, INRA-UMR IGEPP 1349, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, 65, Rue de Saint Briec, 35042, Rennes, France

<sup>b</sup>Centre Mondial de l'Innovation-Laboratoire de Nutrition Végétale, Groupe Roullier, 18 Avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France

**\*author for contact details: Florence Val (florence.val@agrocampus-ouest.fr)**

**ORCID:**

Rafaela Lopes Martin – 0000-0002-1778-6949

Pauline Clin – 0000-0002-7176-1451

Adrián Schwarzenberg – 0000-0002-2981-5647

Jean-Claude Yvin – 0000-0002-8369-5391

Eric Nguema-Ona – 0000-0002-0292-9273

Florence Val – 0000-0001-7914-6034



### Abstract:

*Introduction* The recognition of elicitors (Pathogen-Associated Molecular Patterns-PAMPs and exogenous elicitors) by plants leads to the induction of general defence responses via the PAMP-triggered immunity (PTI) or innate immunity. PTI possibly provides all plants with an arsenal of antimicrobial compounds directed against a broad spectrum of pathogens. Induction of PTI with elicitors could be a good strategy to protect crops against various pests, but also to reduce pesticide use, especially on potato crops that require multiple fungicide treatments. However, this strategy is not always still very effective in the field and its deployment requires a better understanding of the mechanisms leading to the production of effective antimicrobials.

*Objectives* We assume that the effectiveness of PTI could be related to the nature of the elicitor. *Methods* In this work, using a non-targeted metabolomic approach by UPLC-QTOF-MS<sup>e</sup>, we studied the effect of the application of three different elicitors, a PAMPs of *Phytophthora infestans*, a  $\beta$ -aminobutyric acid and an *Ulva* spp. extract, on potato plants.

*Results* The treatments activated differently PTI-associated metabolic pathways. CCF and BABA particularly regulated the primary metabolism and the alkaloid pathway while the *Ulva* extract activated the phenylpropanoid and flavonoid pathways.

*Conclusion* These results suggest that the responses induced by PTI depend strongly on the nature of the elicitor and challenge the concept of general defences associated with induced resistance. They also highlight elements for better management of plant elicitors in crop protection.

### Keywords:

*Solanum tuberosum*; Plant immunity; PAMPs of *P. infestans*; BABA; *Ulva* extract; Non-targeted metabolomics;



### Introduction

Plants have developed an efficient immune system described in the zig-zag model by Jones and Dangl (2006). Immunity can be triggered *via* the perception of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) named the PAMP-triggered immunity (PTI) or specific pathogens' effectors (effector-triggered immunity). In PTI, the recognition of PAMPs by cell surface pattern-recognition receptors (PRRs) induces a series of early events such as reactive oxygen species (ROS), nitric oxide production and intracellular calcium influx. Then intermediate events consist of activation of mitogen-activated protein kinases and phytohormone signalling (salicylic acid-SA, jasmonic acid-JA and/or ethylene) (Bigeard *et al.*, 2015). These signalling cascades lead later to the induction of defence genes. These events result in molecular and metabolic re-programming events for PAMP-treated plants, leading to the production of various defence-related antimicrobial compounds (Boller and Felix, 2009). However, this scenario do not always translate by an efficacy against targeted pathogens. The need to better understand mechanisms associated with PTI is thus crucial.

It is also well documented that plants are able to recognize a large number of PAMPs, such as bacterial flagellin 22-flg22 (Zipfel, 2009) and fungal chitin (Wan *et al.*, 2008), that induce plant defence responses. Similarly, a concentrated culture filtrate-CCF, from *Phytophthora infestans*, was described as PAMPs (Desender *et al.*, 2006) which is composed with 3  $\alpha$ -elicitins (INF1, INF4 and INF5) and a galactan-based complex polysaccharide (Saubeau *et al.* 2014). In potato, the CCF induced the SA pathway (Saubeau *et al.* 2016) and promoted the reduction of *P. infestans* symptoms (Thomas *et al.*, 2019). Several exogenous molecules, synthetic and/or natural, can also activate PTI. Indeed, the synthetic benzothiadiazole-S-methyl ester, a SA analogue, induced the expression of lignin biosynthesis-related genes, which led to protection against nematodes in tomato crop plants (Veronico *et al.*, 2018).  $\beta$ -aminobutyric acid-BABA, a synthetic non-protein amino acid, increased ROS, callose and antimicrobial compounds in potato genotypes after infection by *P. infestans* (Bengtsson *et al.* 2014). Similarly, *Ulvan*, a major natural polysaccharide component of green algae *Ulva* spp., induced JA pathway when applied to *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* (Jaulneau *et al.*, 2010) increasing protection against several pathogens (Vera *et al.*, 2011).





## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

In fact, transcriptomic (Bengtsson *et al.* 2014; Jaulneau *et al.* 2010; Saubeau *et al.* 2016; Zimmerli *et al.* 2000) and proteomic (Bengtsson *et al.* 2014) studies have shown molecular changes following elicitor applications in plants. However, these studies do not always reflect accurately what is occurring at the biochemical level of the ‘metabolome’. Knowledge is therefore lacking regarding the re-programming/re-routing of biosynthetic pathways that has taken place. Non-targeted metabolomic approaches offer a means to advance our understanding of the PTI-induced defence responses, with a focus on biochemical pathways leading to the production of antimicrobial compounds. This approach is particularly relevant for potato, a Solanaceae species of worldwide agronomic importance, where the knowledge are less developed than in model plants. Our assumption is that the PTI effectiveness would depend on the elicitor. In this study, metabolomic patterns obtained after treatments of potato leaflets with CCF, BABA and *Ulva* extract were compared. Our results highlight a specific metabolic signature of each elicitor in two potato genotypes. They also question the specificity of induced resistance, which could affect the management of elicitor in crop protection.



### Materials and Methods

#### 1. Elicitors solutions

A concentrated culture filtrate (CCF) was produced from *P. infestans*' strain 14-P29-03R according to the method described by Desender *et al.* (2006) adapted by Thomas *et al.* (2019). An *Ulva* extract was produced from green algae *Ulva* spp with the method of Jaulneau *et al.* (2010). CCF and *Ulva* extract were used at 8 mg.ml<sup>-1</sup>. The  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA, 97%) from Sigma-Aldrich France (CAS 541-48-0) was used at 0.5 mM. All elicitors were diluted with "Tween20" at 0.1% in water for better tissue absorption. In all experiments, the water + "Tween20" at 0.1% was used as the control.

#### 2. Plant trials

Tubers from two potato genotypes: Désirée, moderately resistant to *P. infestans* and Bintje, susceptible (Europotato database, 2019) were produced in 2016 by BrACySol (UMR IGEPP, Ploudaniel-France). These tubers were grown according to the method described by Thomas *et al.* (2019) in greenhouse at 20±5°C with a photoperiod of 16:8h for a day-night cycle. After 4 weeks, each elicitor (CCF, BABA and *Ulva* extract) and control were sprayed until runoff on 6 potato plants, respectively. 48h after treatment, 24 leaflets were collected from the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> leaf stage of each plant. They were sampled, pooled and plunge-frozen in liquid nitrogen. This process allowed to obtain 6 independent biological samples per modality. Frozen samples were lyophilized and ground in a FastPrep®-24 Classic Instrument for 3 min at 4.0 m/s (MP Biomedicals, France). They were stored at -80°C before their analysis.

#### 3. Extraction method

Potato leaflets were extracted at 4°C using an ice-cold extraction solvent (70% methanol, 29% water and 1% formic acid; all solvents used were LC-MS grade), known to extract mainly the polar and semi-polar secondary metabolites (Jorge *et al.*, 2016). 10 mg of lyophilized plant were solubilized with 1 ml of extraction solution and mixed for 1 min at 30 Hertz using two 3 mm stainless steel balls to ensure optimal homogenization of plant tissues (Mixer Mill MM400, Retsch, Germany). Samples were vortexed for 30 min and centrifuged for 20 min at 18000 g at 4°C (Eppendorf Centrifuge 5427 R, Hamburg, Germany). Supernatants were collected while pellets were again extracted with 500  $\mu$ l the ice-cold extraction solvent, vortexed 5 min and centrifuged for 10 min. Finally, the two supernatants were pooled and 300  $\mu$ l were transferred into LC-MS vials



### 4. Data acquisition and UPLC-QTOF parameters

Data acquisition was performed using an Ultra-High-performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer - Xevo G2-S QToF (UPLC-QTOF-MS<sup>e</sup> from Waters<sup>®</sup> – Milford/Massachusetts/USA) equipped with an electrospray ion source (ESI). Separation was performed using a Kinetex EVO C18 column (150 x 2.1 mm – 2.6 μm, 100Å, Phenomenex, USA). The metabolites were separated with a gradient elution consisting of a mobile phase (A) Water + 0.1% formic acid and (B) Acetonitrile + 0.1% formic acid, following a linear gradient of 99% A to 100% B at 0-14 min, 14-18 min at 100% B, 18-20 min at 99% A. The flow rate was 0.6 ml/min, and the column temperature was maintained at 35°C. The samples were stored at 10°C before analysis and they were injected at 7μl. The acquisition was performed using both ESI negative and positive (ESI- and ESI+) ionization modes. The source voltage was set to 2.5 kV for negative ionization, 3.0 kV for the positive cone voltage to 30 V for both ionizations. The temperature of the source was stabilized at 120°C with a cone gas flow rate of 20 l.hr<sup>-1</sup>. The desolvation temperature was 550°C with desolvation gas flow rates of 900 l.hr<sup>-1</sup>. Lock spray, Leucine Enkephalin (Waters, Manchester, UK), was injected at 10 μl/min for real-time data calibration at 1 ng.μl<sup>-1</sup>. Before sample injection, the column was cleaned with three consecutive injections of the solvent extraction solution. Samples were individually analysed per treatment and the injection order was randomised to avoid the effects of instrumental drift. To ensure analytical robustness and correction of potential instrumental drift, a quality control solution (QC) was prepared with an equal volume mixture of all samples and introduced in the sequence after each fifth sample analysed. Acquisition mass range was 50-900 Da in a time range of 0-15 min and a scan rate of 0.1 sec. MS data were recorded in profile mode and the resolution was set at 30000 full width half maximum (FWHM). MS<sup>e</sup> data were recorded using an energy ramp from 30 to 45 V. Final recorders used to the followed analysis were MS1. To avoid any mis-interpretation of the results due to the contamination of the extracts with residual, elicitor-associated compounds, elicitors were also treated and analysed like the leaflets samples (point 2.3).



### 5. Data analysis

All the data were analysed using ProgenesisQI software (Nonlinear Dynamics, Waters®). The first phase of analysis was an alignment using one QC run chosen for its similarity with the samples, followed by a peak picking and then normalization to build the data matrix. These procedures were made independently in both ESI- and ESI+ mode. Statistical analysis was performed on ProgenesisQI by one-way analysis of variance (Anova)  $\leq 0.05$  and fold change analysis (FC)  $\geq 2$ , with a false discovery rate correction (q-value)  $< 0.05$  for each metabolite. Following these three steps, the data was analysed using the principal component analysis (PCA), a descriptive non-supervised statistical method in order to highlight the major discriminating variance present in the samples. PCA would allow for visualisation of the data for treatment effects. Then the same data was subjected to hierarchical cluster analysis (HCA) calculated with Euclidean distance and the Ward.D2 algorithm for clustering. The number of groups was confirmed by calibration of inertia gain for the clustering groups.

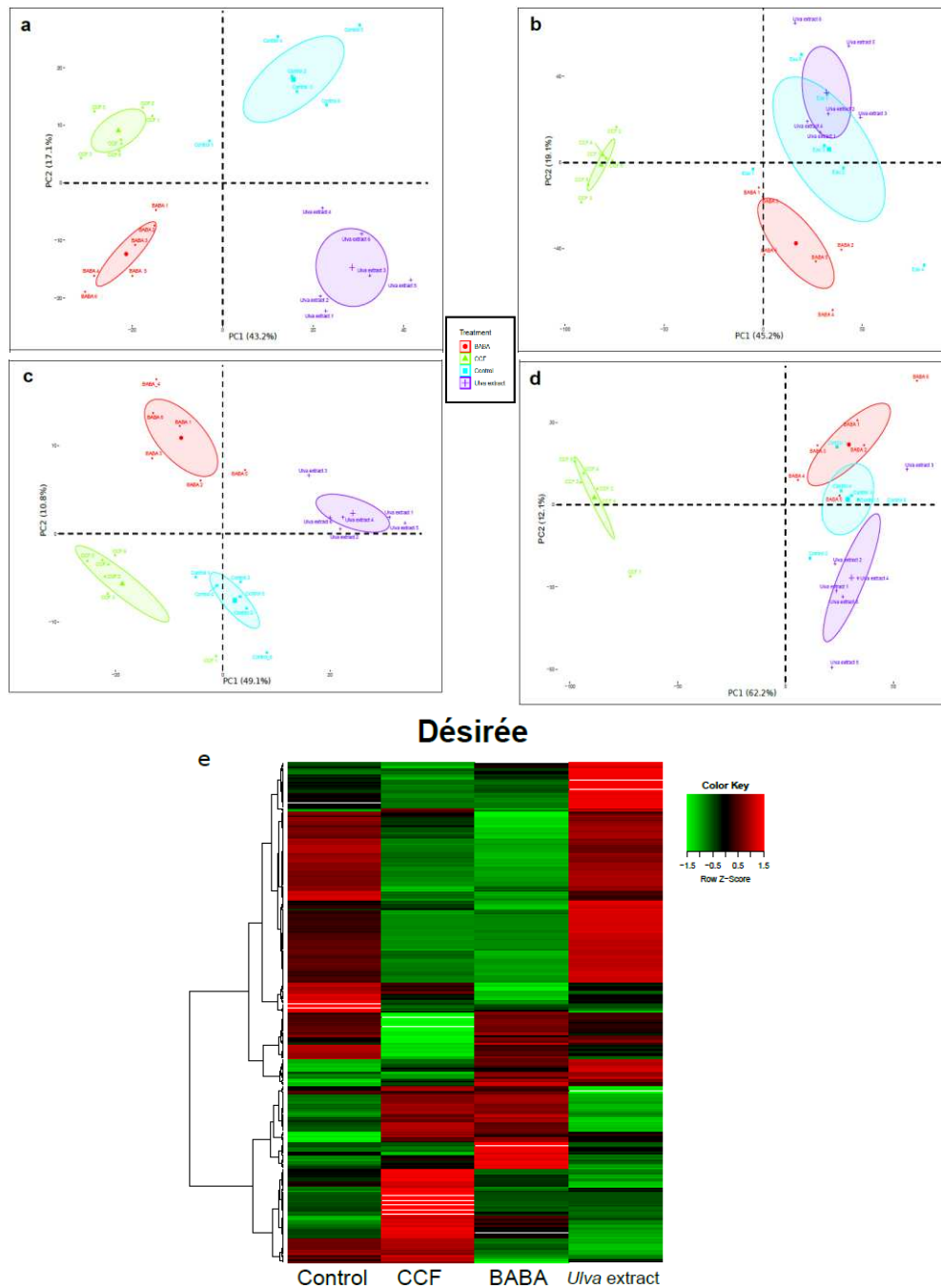
Metabolites were identified following the requirements of the COSMOS Project (Coordination of Standards in Metabolomics-<http://cosmos-fp7.eu/msi.html>). Some metabolites were annotated at "Level 1" after validation of their chemical properties with the use of commercial standards: 4-O-caffeoyl quinic acid (CAS 905-99-7-Sigma), a-chaconine (CAS 20562-03-2 - Carbosynth), rhoifolin (CAS 17306-46-6 - Sigma), cellobiose (CAS 528-50-7-Sigma), (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride (CAS 69056-38-8 - Sigma), chlorogenic acid (CAS 327-97-9-Sigma), fraxin (CAS 524-30-1-Sigma), prunin (CAS 529-55-5-Sigma). Most of the metabolites were putatively annotated at "Level 2" (Salek *et al.*, 2013), due to the lack of available commercial standards. Discriminant metabolites were validated by chemical formulae with a mass error (ppm) of  $\pm 5$  and isotope similarities. Identifications were further assisted by public libraries (KEGG, PubChem and CHEBI) and Solanaceae references (Sade *et al.* 2015; Yogendra *et al.* 2014). After the putative identification, common metabolites between ESI- and ESI+ needed to be validated under the following criteria: similar retention time and same induction of elicitors. The visualisation of this data matrix was performed using a heatmap analysis based on correlation-based distance with Pearson correlation coefficients and Ward.D2 linkages using R software version 3.3.3 with the "gplot" package.





## **Chapitre I - Analyse comparative du métabolome**

Finally, to test whether normalised abundance of selected metabolites differed among the treatments, ANOVA for Linear Model Fits were performed. They were compared with a TukeyHSD tests and represented by histogram charts. These analyses were conducted with the “FactoMineR”, “ade4” and “Tukey.HSD” packages.



**Fig 1. *Désirée* and *Bintje* genotypes metabolic profiles**

(a - d) PCA plot show a grouping of individuals by elicitors based on normalized abundances of the identified metabolites by UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. Ionization under ESI- (a: *Désirée* and c: *Bintje*) and ESI+ (b: *Désirée* and d: *Bintje*). The first and the second principal compounds (PC1 and PC2) represent 60.3% and 59.9% of the data variability in ESI- for *Désirée* and *Bintje*, respectively; and 64.3% and 74.3% in ESI+. Each point represents one plant and each colour is associated with one treatment: the control (blue), the CCF (green), the BABA (red) and the *Ulva* extract (purple). Coloured ellipses represent the 95% confidence regions for each treatment. (e) Normalized abundance heatmap of metabolites found in ESI- and ESI+. 373 putative identified metabolites for *Désirée* (“Level 2”). Each row represents one metabolite and the columns represent the average abundance per treatment. Associated to the rows, the hierarchical clustering tree brings together the metabolites by the correlation-based distance calculated with Pearson correlation coefficient and Ward linkage. Clusters make it possible to visually identify metabolic profiles specific to each treatment by showing up-regulation (red), neutral effect (black) and down-regulation (green) by treatments.

### Results

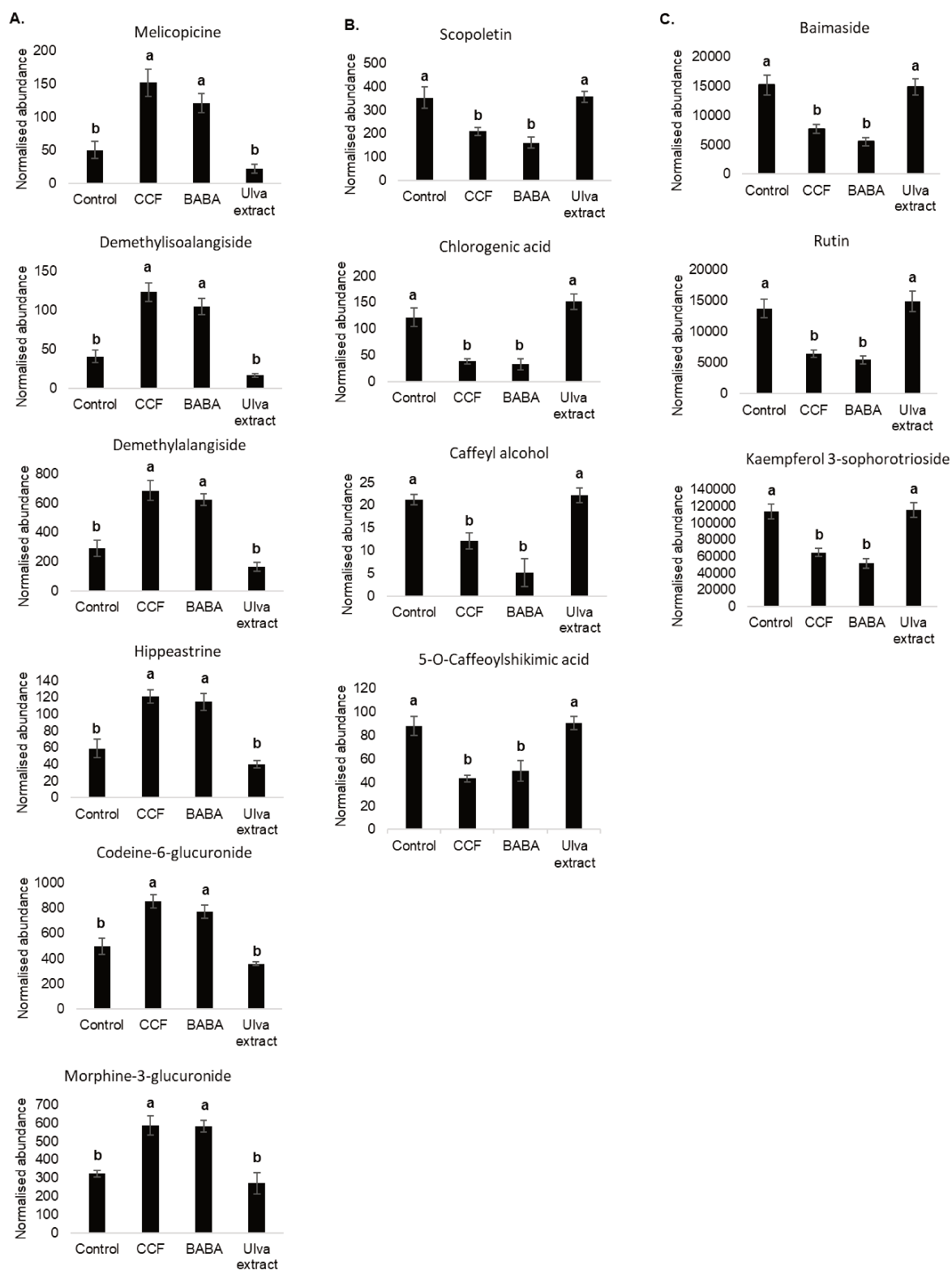
#### 1. Elicitor-treated potato leaflets exhibit contrasting metabolic profiles

Four-week-old potato plants (Désirée and Bintje) were foliar sprayed with either CCF, BABA or *Ulva* extract. Leaflets, collected 48 hours after the treatments, were profiled using an UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. After a filtering by ANOVA, FC and q-values tests, 1314 features from ESI- mode and a further 5655 features from ESI+ mode were found for Désirée genotype. For Bintje genotype, 594 features from ESI- were found and 4484 features from ESI+.

Independently of the ionization mode, four clusters corresponding to each treatment were obtained following PCA for both Désirée and Bintje genotype-derived samples (Fig. 1a-d). The combination of PC1 and PC2 (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> principal component) showed that 60.3% and 59,9% total variance were explained for ESI- (Fig. 1a and 1c) and 64.3% and 74,3% for the ESI+ (Fig. 1b and 1c) in Désirée and Bintje genotypes, respectively. In ESI-, PC1 separated clusters associated with CCF and BABA treatments from the clusters associated with control and *Ulva* extract in Désirée (Fig. 1a), while in Bintje, PC1 separated only CCF cluster (Fig. 1c). In Désirée (Fig. 1a), PC2 separated the CCF from the BABA clusters and the *Ulva* extract from the control while, in Bintje (Fig. 1c), PC2 discriminated between the others treatments (BABA, *Ulva* extract and control). In ESI+, in both genotypes (Fig. 1b and 1d), PC1 separated the cluster associated with CCF treatment from the others, and PC2 separated the cluster associated with *Ulva* extract treatment from BABA and the control treatment.

Together, this analysis showed that both potato genotypes responded in a relatively same manner to the application of elicitors. These responses were characterized by an elicitor-specific metabolic reprogramming. All these results were also subjected to HCA test, which showed again the same clusters on ESI- and on ESI+ (Fig. S1).

From the features detected by ESI- and by ESI+ modes, 373 metabolites were putatively identified in Désirée (Table S1) and 224 metabolites in Bintje (Table S2). These putative identifications were confirmed one by one according to predefined criteria, as described in materials and methods. The total number of metabolites was different between Désirée and Bintje genotypes (Table S1 and S2, respectively). Among these metabolites, 150 were common to both genotypes, while 223 were specific to Désirée and 74 to Bintje.



**Fig. 2** Effect of elicitors on the metabolite regulations on ESI- and on ESI+

Semi-quantitative analysis of (a) alkaloid, (b) phenylpropanoid and (c) flavonoid metabolites based on its normalized abundances. Different letters indicate significant differences based on Tukey HSD test ( $p$ -value < 0.05). Bars represent standard error ( $n=6$ ).

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

Since Désirée genotype data yielded a more important number of identified metabolites, and in order to more extensively analyse potato leaflet responses to elicitor treatment, we choose to further analysis this data here (Bintje genotype data being available as supplementary material- Figs. S1 and S2 and Table S2).

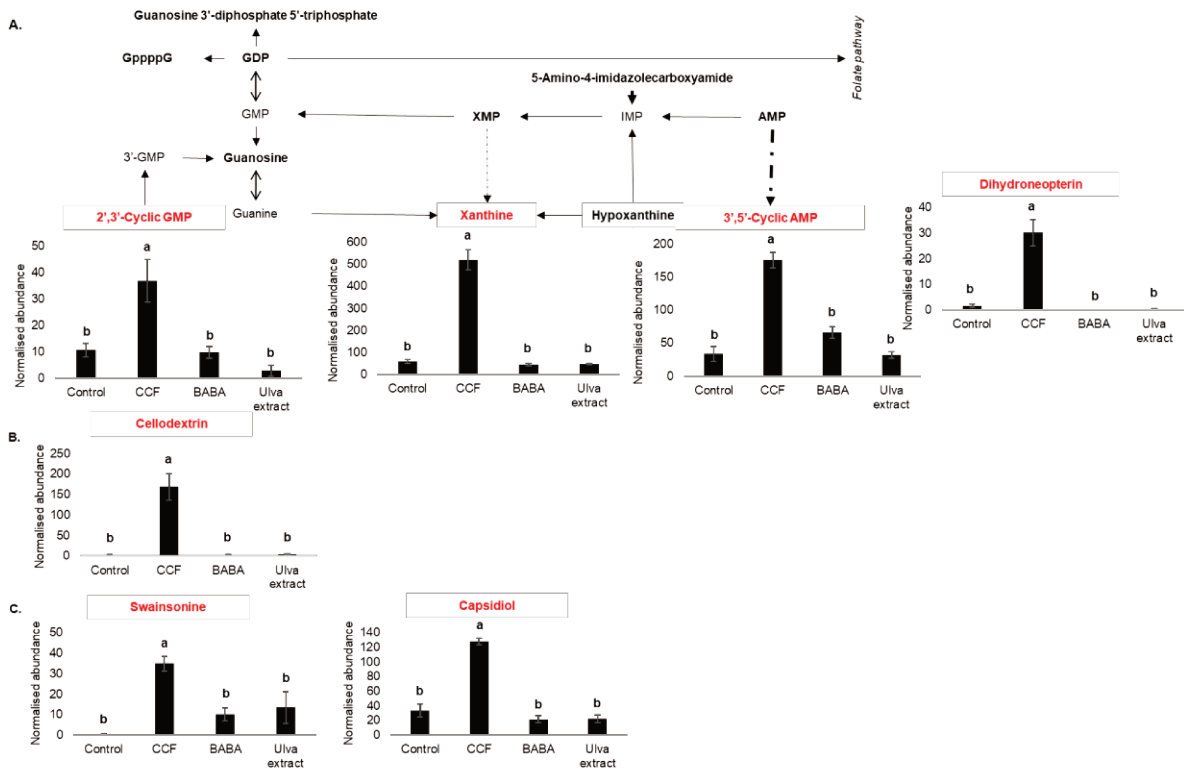
Out of these 373 metabolites, 60% were represented by secondary metabolism: terpenoids (19%), flavonoids (17%), alkaloids (16%), phenylpropanoids (8%) and 40% were associated with primary metabolism: amino acids (16%), lipids (9%), carbohydrates (9%), nucleotides (3%) and others (3%).

A heatmap was generated with the normalised abundances of the 373 metabolites according to the Pearson correlation coefficient and Ward linkage methods (Fig. 1e). The metabolite information and their exact position on the heatmap are presented in Table S1. The heatmap showed four different metabolic profiles supporting the PCA model of four distinct clusters for all metabolites (Fig. 1). The metabolic profiles generated differed by their combinations of up- and down-regulated metabolites. However, some of those metabolites were common to several profiles while others were specific to one profile. The common metabolites were distributed into two major clusters: the first cluster with 238 metabolites that were mostly up-regulated by *Ulva* extract and control treatments and down-regulated by CCF and BABA treatments. Conversely, the second cluster with 135 metabolites that were mostly up-regulated by CCF and BABA treatments and down-regulated by *Ulva* extract and control.

Each treatment also up-regulated the specific metabolites that composed one sub-cluster in which the metabolites were cross-correlated. To illustrate these observations, we focus on common or specific metabolites referenced in the literature to play a direct or indirect role in defence:

### 2. Metabolites commonly regulated by elicitors

Metabolites associated with the alkaloid, phenylpropanoid and flavonoid pathways are highly represented in the analysis. For instance, melicopicine, demethylisoalangsaside, demethylalangsaside, hippeastrine, codeine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide from the alkaloid pathway were significantly ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ) up-regulated by CCF and BABA treatments and down-regulated by the *Ulva* extract and control treatments (Fig. 2a and Table S3).



**Fig. 3 Up-regulated metabolites by CCF treatment**

The specific up-regulations are illustrated by histograms of the normalized abundance of metabolites. Different letters indicate significant differences based on Tukey HSD test ( $p$ -value < 0.05). Bars represent standard error ( $n=6$ ). (a) Schematic representation of purine and folate pathways based on KEGG maps: red bold metabolites up-regulated by CCF treatment; black bold metabolites not regulated by CCF but found on the analysis and the other metabolites not found in the analysis. Solid arrows indicate a direct link between the metabolites and dotted arrows indicate non-direct link with the mentioned metabolite. For (b): Cellodextrin, a product of cellulose degradation and for (c): Swainsonine, phytotoxic and Capsidiol, antimicrobial, there is no sequencing metabolites found in our analysis.

Indeed, the codeine-6-glucuronide, storage metabolite form of codeine, was strongly up-regulated after BABA and CCF treatments. Morphinone and codeinone, precursors of morphine-6-glucuronide and codeine-6-glucuronide respectively, were also detected without significant differences between treatments, but suggest metabolic flux is occurring through the benzyloquinoline alkaloid pathway (Yogendra *et al.*, 2017), a subclass of alkaloid pathway.

Conversely, scopoletin, chlorogenic acid, caffeoyl alcohol and 5-O-caffeoylshikimic acid from the phenylpropanoid and related pathways were significantly ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ) up-regulated by the *Ulva* extract and control treatments and down-regulated by CCF and BABA treatments (Fig. 2b). For instance, scopoletin, a phytoalexin found in Solanaceae species (Ahuja *et al.*, 2012). Rutin and kaempferol 3-sophorotrioside, antimicrobial compounds (Kröner *et al.*, 2012) and baimaside, from the flavonoid pathway were significantly ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ) up-regulated by the *Ulva* extract and control treatments but down-regulated by CCF and BABA treatments (Fig. 2c).

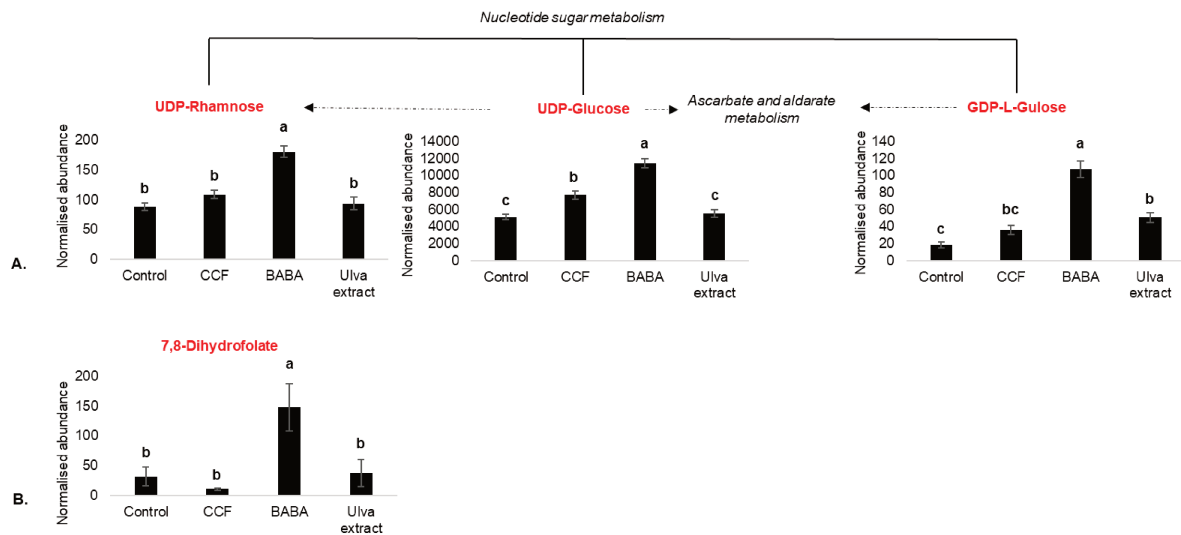
### 3. Metabolites specifically regulated by an elicitor

Inside the two major clusters, specifically regulated metabolites of each elicitor were organised into sub-clusters and selected by a Tukey test.

The CCF treatment up-regulated 32 metabolites (Table S4). Among them, six metabolites are well known to be associated with defence responses (Fig. 3). Xanthine (Ma *et al.*, 2016), 3'5'-cyclic AMP and 2'3'-cyclic GMP from the purine pathway and two folate pathway associated metabolites, 5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin and dihydroneopterin (Gorelova *et al.*, 2017), linked to the metabolism of purine, were also detected (Fig. 3a). In addition, this treatment up-regulated cellodextrin (Fig. 3b) known as a damage-associated molecular patterns (DAMP) in *Vitis vinifera* (Gust *et al.*, 2017). The CCF treatment also up-regulate antimicrobial metabolites such as swainsonine, an alkaloid (Cook *et al.*, 2017) and capsidiol, a phytoalexin from the sesquiterpene pathway which is found in *Capsicum annum* and *N. tabacum* after pathogen infection (Ahuja *et al.*, 2012) (Fig. 3c).

The BABA treatment up-regulated 9 metabolites (Table S4), four of them belong to primary metabolism and are defence-responses related (Fig. 4). Indeed, 7,8-dihydrofolate from the folate pathway is associated with ROS detoxification (Gorelova *et al.*, 2017). The up-regulation of UDP-rhamnose, UDP-glucose, GDP-L-gulose from nucleotide sugar metabolism showed an energy mobilization by the elicited plant.



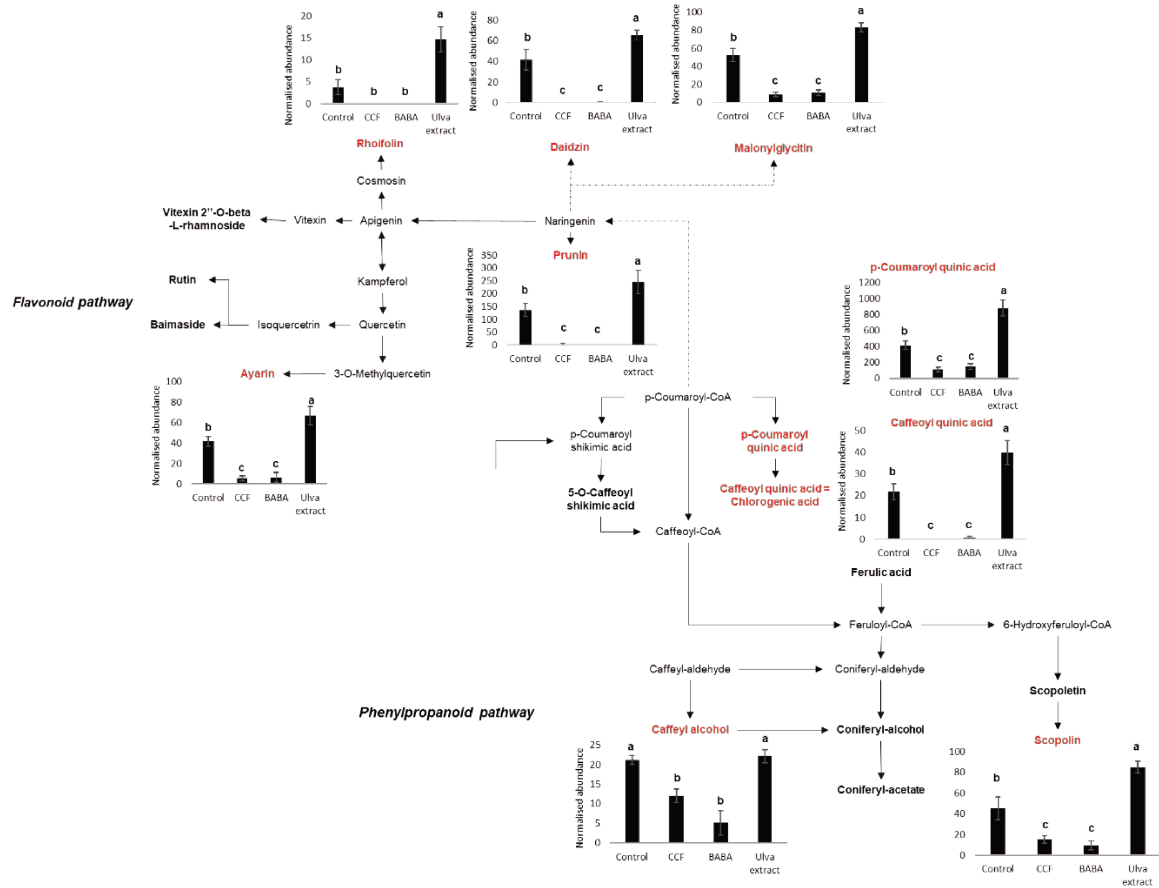


**Fig. 4 Up-regulated metabolites by BABA treatment**

The specific up-regulations are illustrated by histograms of the normalized abundance of metabolites. Different letters indicate significant differences based on Tukey HSD test ( $p$ -value < 0.05). Bars represent standard error ( $n=6$ ). (a) Schematic representation of nucleotide sugar metabolism pathway based on KEGG maps: red bold metabolites up-regulated by BABA treatment. Dotted arrows indicate non-direct link with the mentioned metabolite. For (b): 7,8-Dihydrofolate, a folate metabolite, there is no sequencing metabolites found in our analysis.

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

The *Ulva* extract treatment up-regulated 37 metabolites (Table S4), 11 of which associated with defence responses were selected for analysis (Fig. 5). Coniferyl alcohol, scopolin, the conjugate form of the phytoalexin scopoletin (Sharan *et al.*, 1998), caffeoyl quinic acid, p-coumaroyl quinic acid were strongly up-regulated. These compounds are antimicrobial metabolites belonging to the phenylpropanoid pathway. Moreover, l-quinic acid a conjugate from quinic acid leading to biosynthesis and induction of the phenylpropanoid pathway was also detected (Fig. 5). This treatment also induced metabolites from the flavonoid pathway including rhoifolin, daidzin, naringenin 7-O- $\beta$ -glucoside (prunin), 3,7,4'-Tri-O-methylquercetin (ayarin) and malonylglycitin (Fig. 5). Solanidine was also up regulated by *Ulva* extract. This metabolite from the glycoalkaloid pathway is a precursor of  $\alpha$ -chaconine associated with the resistance level of potato genotypes (Nenaah, 2011).



**Fig. 5 Up-regulated metabolites by Ulva extract treatment**

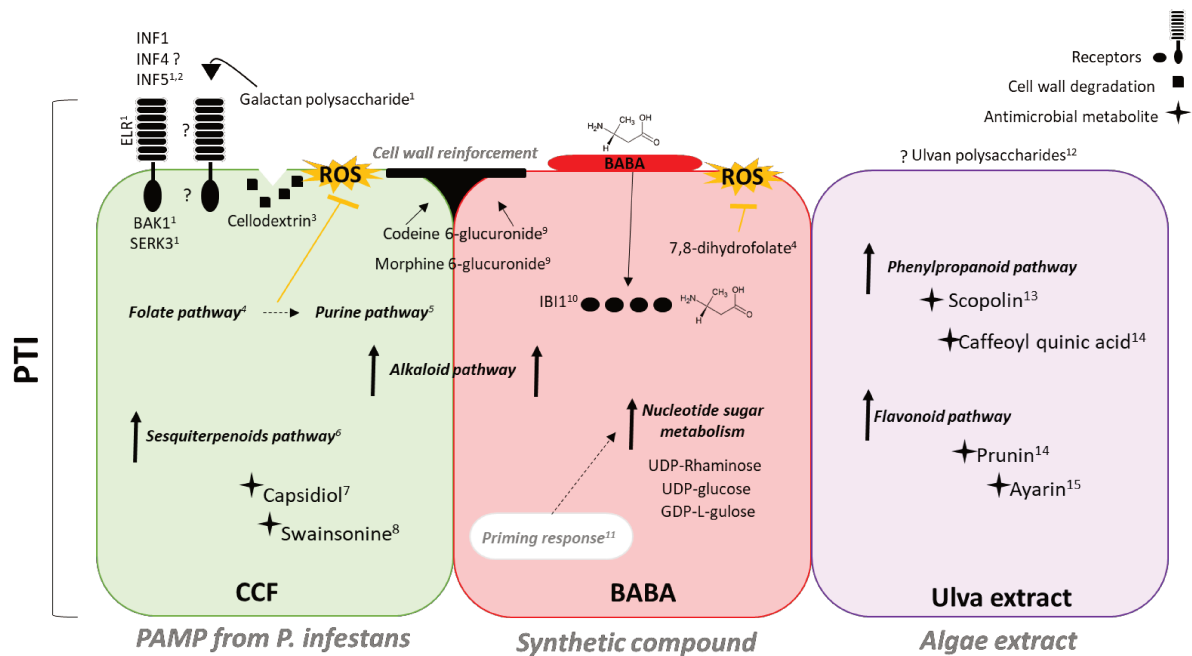
The specific up regulations are illustrated by histograms of the normalized abundance of metabolites. Different letters indicate significant differences based on Tukey HSD test ( $p$  value < 0.05). Bars represent standard error ( $n=6$ ). (a) Schematic representation of phenylpropanoid and flavonoid pathways based on KEGG maps; red bold metabolites up regulated by Ulva extract treatment; black bold metabolites not regulated by Ulva extract and the other metabolites not found in the analysis. Solid arrows indicate a direct link between the metabolites and dottedarrows indicate non-direct link with the mentioned metabolite.

### Discussion

The induction of PTI leads to the production of metabolites whose efficiency may depend on the applied elicitors. We choose to address this question using metabolomics approach, although the lack of available plant specific metabolites resources was a challenge to classify the candidate metabolites with the criteria described in materials and methods. After verifying that the metabolites belonged to the plant and not to the elicitors (Fig S3), the discussion are based on the identification ("Level 2") of 373 metabolites. It is supported by the convergence of metabolites that appear in the same family.

Our results showed that CCF, BABA and *Ulva* extract induced specific patterns of metabolomic responses suggesting that the potato plants reprogram their metabolism according to the elicitor. It is interesting to note that the profiles induced by BABA and CCF have more metabolites in common than the control and *Ulva* extract which also share metabolites. Indeed, the treatment with BABA and CCF mainly leads to the induction of the alkaloid pathway. A cell wall-related nucleotide sugar metabolic reaction was also induced here. For instance, benzyloquinoline alkaloids, codeine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide, were up-regulated by these two elicitors and down-regulated by *Ulva* extract. The benzyloquinoline alkaloids were recently described for their antimicrobial properties and possible role in cell wall reinforcement, following *P. infestans* infection (Yogendra *et al.*, 2017) (Fig. 6). By contrast, the *Ulva* extract treatment mainly leads to the induction of phenylpropanoid and flavonoids pathways (Fig. 6). Indeed, this treatment up-regulated scopolin (Sharan *et al.*, 1998), caffeoyl quinic acid which are antimicrobial compounds (Yogendra *et al.* 2014) and prunin and ayarin which are found after pathogen infection (Kumar *et al.* 2015; Yogendra *et al.* 2014) (Fig. 6). These patterns of up- and/or down-regulated metabolites are specific to one elicitor or common to two or three elicitors. The transcriptomic studies of Gust *et al.* (2007) and Wan *et al.* (2008) also showed that elicitors from different nature (e.g. flg22, chitin, LPS, Ef-Tu, PGN) up- and down-regulated different patterns of genes.

Interestingly, the fact that each set of metabolites differed, suggested that the effectiveness of the immune response to a targeted pathogen would strongly depended on the elicitor.



**Fig. 6 Hypothetic regulation of defense responses by each elicitor**

Each box represents defence responses after one elicitor treatment. Classes of metabolites are highlighted (in bold). The symbol “?” is used when the studies on the literature were not doing on potato plants or were unknown.

1-Du et al (2015) *Nat Plants* 1: 15034; 2-Saubeau et al (2014) *Molecules* 19: 15374–15390; 3-Gust et al (2007) *J Biol Chem* 282: 32338–32348; 4-Gorelova et al (2017) *Front Chem*. doi: 10.3389/fchem.2017.00021; 5-Ma et al (2016) *Plant Cell* 28: 1108–1126; 6-Bengtsson et al (2014b) *BMC Genomics* 15: 315; 7-Giannakopoulou et al (2014) *PLoS ONE* 9: e107462; 8-Cooket al (2017) *Genes Genomes Genetics* 7: 1791–1797; 9-Yogendra et al (2017) *Plant Sci* 256: 208–216; 10-Luna et al (2014) *Nat Chem Biol* 10: 450–456; 11-Pastor et al (2014) *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00295; 12-Jaulneau et al (2010) *J Biomed Biotechnol* 2010: 1–11; 13-Sharan et al (1998) *Plant Sci* 132: 13–19; 14-Yogendra et al (2014b) *Funct Integr Genomics* 14: 285–298; 15-Kumar et al (2015) *Phytochemistry*.

### 1. Reprogramming of defence related metabolites is specific to each elicitor

The CCF has been described as PAMPs from *P. infestans* (Desender *et al.*, 2006), composed of INF1, INF4 and INF5 and a galactan-based complex polysaccharide (Saubeau *et al.* 2014). Interestingly, this treatment specifically induced early and late defence responses in potato (Fig. 6). Particularly it regulates two pathways from primary metabolism which lead to detoxification of ROS (Gorelova *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2016). It up-regulated metabolites such as purine and folates. In Arabidopsis, purine catabolism, leads to up-regulated defence responses through production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the epidermal layers and helps detoxify H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with uric acid in the mesophyll cells (Ma *et al.*, 2016). The folate pathway possibly contributes to NADPH production which can also be used to detoxify ROS (Gorelova *et al.*, 2017). Previously, it has been showed that CCF treatment may induce ROS production (Saubeau *et al.* 2013) and reduce *P. infestans* symptoms on potato plants *via* the antioxidant processes (Thomas *et al.*, 2019). The up-regulation of these metabolites after CCF treatment could be a new evidence of ROS production and detoxification occurring in potato plants. CCF is also able to regulate secondary metabolism such as the alkaloid and sesquiterpenoid pathways. It up regulated, swainsonine (an alkaloid) and capsidiol (a sesquiterpene), two compounds that, to our knowledge, have never been identified in *S. tuberosum*. However, swainsonine is a phytotoxin founded in Fabaceae and produced by endophytic or pathogenic fungi. It induces irreversible damage in herbivores disrupting the endomembrane system of the cell (Cook *et al.*, 2017). In tobacco, the accumulation of capsidiol combined with the production of ROS increases the resistance to *P. infestans* which is highly susceptible to capisidiol (Giannakopoulou *et al.*, 2014). After CCF treatment, the increase of sesquiterpenes could therefore explain the symptoms decrease of *P. infestans* in potatoes (Thomas *et al.*, 2019).

BABA is a synthetic compound, which strongly induces defence responses in potatoes when challenged with *P. infestans* and/or *Fusarium solani* infections (Altamiranda *et al.*, 2008; Olivieri *et al.*, 2009). In our study, the BABA alone up-regulated specifically few metabolites from primary metabolism such as 7,8-dihydrofolate, potentially a ROS marker (Gorelova *et al.*, 2017) and nucleotide sugar metabolites (Fig. 6). These nucleotides suggest a mobilization of the energy sources and reserves. Pastor *et al.* (2014) showed that in Arabidopsis, BABA alone was able to induce preferentially primary metabolism but also phenylpropanoid and octodecanoic pathways.



Conversely, our results showed that only BABA down-regulated phenylpropanoid and flavonoid pathways. However, the induction of these two pathways has been validated by other authors but always in the presence of the pathogen (Bengtsson *et al.*, 2014). Together this data showed that BABA treatment alone or followed by pathogen inoculation primes plant defences (Bacelli and Mauch-Mani, 2016; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2015; Meller *et al.*, 2018).

Few studies are available on the induction of plant defence response with green algae. In our knowledge, it was the first time that *Ulva* extract was applied on potato. This extract contains *Ulvans*, sulphated polysaccharides, which are major structural cell wall polymers of green algae (Vera *et al.*, 2011). These are probably the major compounds responsible for defence induction in our system. The *Ulva* extract up-regulated the phenylpropanoid and flavonoid pathways (Fig. 6). Indeed, *U. lactuca* extracts applied on tomato seedlings, induced phenylalanine ammonia-lyase activity, a key enzyme of the phenylpropanoid pathway and reduced the disease symptoms associated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (El Modafar *et al.*, 2012). These authors suggested the involvement of the SA pathway in the resistance of tomato to *F. oxysporum* but conversely Jaulneau *et al.* (2011) showed that *Ulva* spp. extracts up-regulated the JA pathway on *M. truncatula*.

### **2. Could the specific recognition of elicitors explain the reprogramming of metabolic profiles?**

Plant immunity can be triggered *via* the perception of the elicitors. Particularly, PAMPs can be recognized by PRRs such as the leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK) (Zipfel, 2009). The reprogramming of potato metabolism could be linked to differences in the perception of CCF, BABA or *Ulva* extract by potato. Indeed, the CCF *via* INF1 and INF5, could be perceived by a transmembrane receptor-like protein ELR (elicitin response). This receptor, recently described in *Solanum microdontum* recognizes a broad spectrum of elicitors from *P. infestans* (Du *et al.*, 2015). Moreover, the CCF polysaccharide fraction could also be perceived (Choi and Klessig, 2016) to induce general plant defence responses (Krzyszaniak *et al.*, 2018; Vera *et al.*, 2011) but the receptor is unknown. Interestingly, CCF up-regulated cellodextrin, a compound identified as a DAMP which can additionally be recognised by LRR-AtPEPR1 and AtPEPR2 (Gust *et al.*, 2017), the DAMP receptors (Fig. 6). Conversely, BABA is perceived in the cytoplasm by the IBI1 receptor (*Impaired in BABA-induced disease Immunity*) (Luna *et al.*, 2014; Schwarzenbacher *et al.*, 2014).





## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

These recognition primes defence responses but only after pathogen attack that may explain the small number of secondary metabolites up-regulated by this elicitor in our study (Fig. 6). For the *Ulva* extract, only one study suggested that the plant recognized *Ulvan* polysaccharides through major compounds such as rhamnose, and uronic acid residues (Jaulneau *et al.*, 2010). Despite the absence of identified *Ulvan* receptors, the *Ulvan* treatments induce high protection against several pathogens (de Freitas *et al.*, 2015; Jaulneau *et al.*, 2010) (Fig. 6).

### Conclusions

Our metabolomic approach highlights a differential induction of PTI depending on the nature of elicitors. PTI potentially provides all plants/crops with an arsenal of antimicrobial compounds, or metabolites, which protects them against pathogens. However, our results suggest that PTI may induce specific and not only general defences, as is usually pointed out. Consequently, precautions should be taken regarding the application strategies of the elicitors used in the field. To increase the effectiveness of PTI and mobilize a greater number of antimicrobial compounds, it might be appropriate to apply elicitors in combination for crop treatment.

### Acknowledgements

We acknowledge Pr. PhD Alain Bouchereau and John Moore (University of Stellenbosch, South Africa) for their critical reading of the manuscript and John Moore for the English corrections. We also acknowledge N. Seal (English consultant) for the manuscript correction. We thank Pauline Le Boulch (Agrocampus Ouest, UMR IGEPP/INRA) who help on protocols validation for metabolomic analysis, Viviane Lecomte (Agrocampus Ouest, UMR IGEPP/INRA) for microbiology assays support and Pr. PhD David Causeur (Agrocampus Ouest) for statistical advises. We are grateful to the INRA Genetic Resources Center BrACySol-Ploudaniel, France for providing the potato tubers used in the tests and the Roullier Group for providing *Ulva* extract. Rafaela Lopes Martin is supported by a CIFRE PhD grant from Roullier Group, France and the ANRT-Association Nationale Recherche Technologie, France.



## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

**Author contributions:** F.V. and E.N.O co-supervised the study. F.V., E.N.O., R.L.M. and A.S. conceived and designed the research. R.L.M. and A.S. performed the research. R.L.M. and P.C. analysed data. E.N.O. and J.C.Y. contributed reagents/materials/analysis tools. All authors wrote and contributed to the finalization of the article.

**Funding information:** This work was supported by grants from Roullier Group, France and the ANRT-Association Nationale Recherche Technologie, France.

### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no potential conflicts of interest.

**Human and animal rights** This article does not contain any studies with human and/or animal participants performed by any of the authors.



### References

- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17, 73–90. doi:10.1016/j.tplants.2011.11.002.
- Altamiranda, E. A. G., Andreu, A. B., Daleo, G. R., and Olivieri, F. P. (2008). Effect of  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. *Australas. Plant Pathol.* 37, 421. doi:10.1071/AP08033.
- Azami-Sardooei, Z., Seifi, H. S., De Vleeschauwer, D., and Höfte, M. (2013). Benzothiadiazole (BTH)-induced resistance against *Botrytis cinerea* is inversely correlated with vegetative and generative growth in bean and cucumber, but not in tomato. *Australas. Plant Pathol.* 42, 485–490. doi:10.1007/s13313-013-0207-1.
- Bacelli, I., and Mauch-Mani, B. (2016). Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *Plant Mol. Biol.* 91, 703–711. doi:10.1007/s11103-015-0406-y.
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., and Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant J.* 93, 614–636. doi:10.1111/tpj.13807.
- Bengtsson, T., Holfors, A., Witzell, J., Andreasson, E., and Liljeroth, E. (2014a). Activation of defence responses to *Phytophthora infestans* in potato by BABA. *Plant Pathol.* 63, 193–202. doi:10.1111/ppa.12069.
- Bengtsson, T., Weighill, D., Proux-Wéra, E., Levander, F., Resjö, S., Burra, D., *et al.* (2014b). Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics* 15, 315. doi:10.1186/1471-2164-15-315.
- 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.
- Choi, H. W., and Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol.* 16. doi:10.1186/s12870-016-0921-2.
- Cohen, Y., Rubin, A. E., and Kilfin, G. (2010). Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- $\beta$ -amino-butyric acid (BABA). *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 553–573. doi:10.1007/s10658-009-9564-6.
- Cook, D., Donzelli, B. G. G., Creamer, R., Baucom, D. L., Gardner, D. R., Pan, J., *et al.* (2017). Swainsonine Biosynthesis Genes in Diverse Symbiotic and Pathogenic Fungi. *G3-GenesGenomesGenetics* 7, 1791–1797. doi:10.1534/g3.117.041384.



- de Freitas, M. B., Ferreira, L. G., Hawerth, C., Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., and Stadnik, M. J. (2015). *Ulvans* induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. *Carbohydr. Polym.* 133, 384–390. doi:10.1016/j.carbpol.2015.07.055.
- Desender, S., Klarzynski, O., Potin, P., Barzic, M.-R., Andrivon, D., and Val, F. (2006). Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* Induce Different Defence Response Patterns in Tobacco, Tomato, and Potato. *Plant Biol.* 8, 636–645. doi:10.1055/s-2006-924102.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843–847. doi:10.1038/35081178.
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-García, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L. C. P., Zhou, J., *et al.* (2015). Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat. Plants* 1, 15034. doi:10.1038/nplants.2015.34.
- El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfai, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., *et al.* (2012). Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Sci. Hort.* 138, 55–63. doi:10.1016/j.scienta.2012.02.011.
- Europotato (2019). The European Cultivated Potato Database. Available at: <https://www.europotato.org/varieties/view/Desiree-E#/> [Accessed August 23, 2019].
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz-Jelonek, M., and Abramowski, D. (2015). BABA-primed defense responses to *Phytophthora infestans* in the next vegetative progeny of potato. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00844.
- Friedman, M. (2006). Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8655–8681. doi:10.1021/jf061471t.
- Giannakopoulou, A., Schornack, S., Bozkurt, T. O., Haart, D., Ro, D.-K., Faraldos, J. A., *et al.* (2014). Variation in Capsidiol Sensitivity between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora capsici* Is Consistent with Their Host Range. *PLoS ONE* 9, e107462. doi:10.1371/journal.pone.0107462.
- Gorelova, V., Ambach, L., Rébeillé, F., Stove, C., and Van Der Straeten, D. (2017). Foliates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification. *Front. Chem.* 5. doi:10.3389/fchem.2017.00021.
- 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.
- Gust, A. A., Pruitt, R., and Nürnberger, T. (2017). Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends Plant Sci.* 22, 779–791. doi:10.1016/j.tplants.2017.07.005.





## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

- Jaulneau, V., Lafitte, C., Corio-Costet, M.-F., Stadnik, M. J., Salamagne, S., Briand, X., *et al.* (2011). An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 393–401. doi:10.1007/s10658-011-9816-0.
- Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., *et al.* (2010). *Ulvan*, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–11. doi:10.1155/2010/525291.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi:10.1038/nature05286.
- Jorge, T. F., Rodrigues, J. A., Caldana, C., Schmidt, R., van Dongen, J. T., Thomas-Oates, J., *et al.* (2016). Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress: MASS SPECTROMETRY-BASED PLANT METABOLOMICS. *Mass Spectrom. Rev.* 35, 620–649. doi:10.1002/mas.21449.
- Kostyn, K., Czemplik, M., Kulma, A., Bortniczuk, M., Skała, J., and Szopa, J. (2012). Genes of phenylpropanoid pathway are activated in early response to *Fusarium* attack in flax plants. *Plant Sci.* 190, 103–115. doi:10.1016/j.plantsci.2012.03.011.
- Kröner, A., Marnet, N., Andrivon, D., and Val, F. (2012). Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 23–31. doi:10.1016/j.plaphy.2012.05.006.
- Krzyzaniak, Y., Negrel, J., Lemaitre-Guillier, C., Clément, G., Mouille, G., Klinguer, A., *et al.* (2018). Combined enzymatic and metabolic analysis of grapevine cell responses to elicitors. *Plant Physiol. Biochem.* 123, 141–148. doi:10.1016/j.plaphy.2017.12.013.
- Kumar, Y., Dholakia, B. B., Panigrahi, P., Kadoo, N. Y., Giri, A. P., and Gupta, V. S. (2015). Metabolic profiling of chickpea-*Fusarium* interaction identifies differential modulation of disease resistance pathway. *Phytochemistry*.
- Luna, E., van Hulten, M., Zhang, Y., Berkowitz, O., López, A., Pétriacq, P., *et al.* (2014). Plant perception of  $\beta$ -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 10, 450–456. doi:10.1038/nchembio.1520.
- Ma, X., Wang, W., Bittner, F., Schmidt, N., Berkey, R., Zhang, L., *et al.* (2016). Dual and Opposing Roles of Xanthine Dehydrogenase in Defense-Associated Reactive Oxygen Species Metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28, 1108–1126. doi:10.1105/tpc.15.00880.
- Meller, B., Kuźnicki, D., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J., and Floryszak-Wieczorek, J. (2018). BABA-Primed Histone Modifications in Potato for Intergenerational Resistance to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.01228.
- Nenaah, G. E. (2011). Toxic and antifeedant activities of potato glycoalkaloids against *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 47, 185–190. doi:10.1016/j.jspr.2010.11.003.



## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

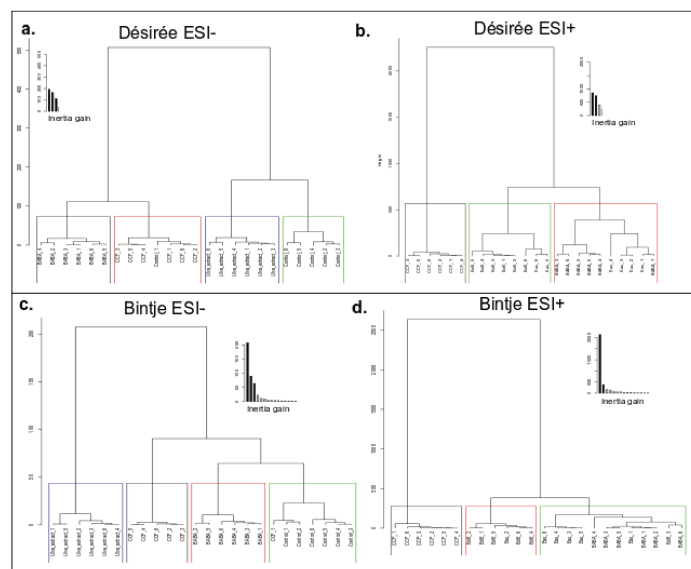
- Olivieri, F. P., Lobato, M. C., González Altamiranda, E., Daleo, G. R., Huarte, M., Guevara, M. G., *et al.* (2009). BABA effects on the behaviour of potato cultivars infected by *Phytophthora infestans* and *Fusarium solani*. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 47–56. doi:10.1007/s10658-008-9340-z.
- Pastor, V., Balmer, A., Gamir, J., Flors, V., and Mauch-Mani, B. (2014). Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00295.
- Sade, D., Shriki, O., Cuadros-Inostroza, A., Tohge, T., Semel, Y., Haviv, Y., *et al.* (2015). Comparative metabolomics and transcriptomics of plant response to Tomato yellow leaf curl virus infection in resistant and susceptible tomato cultivars. *Metabolomics* 11, 81–97. doi:10.1007/s11306-014-0670-x.
- Salek, R. M., Steinbeck, C., Viant, M. R., Goodacre, R., and Dunn, W. B. (2013). The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience* 2. doi:10.1186/2047-217X-2-13.
- Saubeau, G. (2014). Implication de la PAMPs-Triggered Immunity dans la résistance quantitative de la pomme de terre à *Phytophthora infestans*.
- Saubeau, G., Gaillard, F., Legentil, L., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V., Andrivon, D., *et al.* (2014). Identification of Three Elicitins and a Galactan-Based Complex Polysaccharide from a Concentrated Culture Filtrate of *Phytophthora infestans* Efficient against *Pectobacterium atrosepticum*. *Molecules* 19, 15374–15390. doi:10.3390/molecules191015374.
- Saubeau, G., Goulitquer, S., Barloy, D., Potin, P., Andrivon, D., and Val, F. (2013). Differential induction of oxylipin pathway in potato and tobacco cells by bacterial and oomycete elicitors. *Plant Cell Rep.* 32, 579–589. doi:10.1007/s00299-012-1377-y.
- Saubeau, G., Perrin, F., Marnet, N., Andrivon, D., and Val, F. (2016). Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 65, 342–352. doi:10.1111/ppa.12420.
- Schwarzenbacher, R. E., Luna, E., and Ton, J. (2014). The discovery of the BABA receptor: scientific implications and application potential. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00304.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N., *et al.* (1998). Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Sci.* 132, 13–19. doi:10.1016/S0168-9452(97)00260-4.
- Thomas, C. (2019). Interactions entre résistance induite chez *Solanum tuberosum* et traits d’histoire de vie et effecteurs de *Phytophthora infestans*.



## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

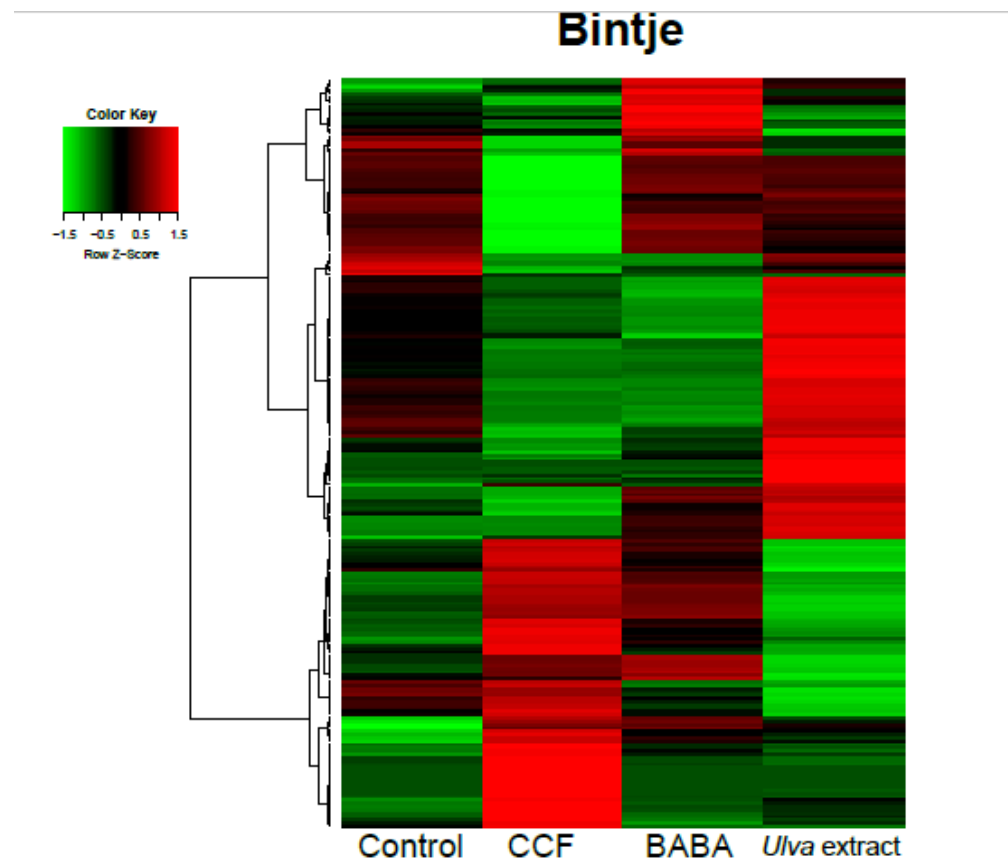
- Thomas, C., Mabon, R., Andrivon, D., and Val, F. (2019). The Effectiveness of Induced Defense Responses in a Susceptible Potato Genotype Depends on the Growth Rate of *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 32, 76–85. doi:10.1094/MPMI-03-18-0064-R.
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., and Moenne, A. (2011). Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. *Mar. Drugs* 9, 2514–2525. doi:10.3390/md9122514.
- Veronico, P., Paciolla, C., Pomar, F., De Leonardis, S., García-Ulloa, A., and Melillo, M. T. (2018). Changes in lignin biosynthesis and monomer composition in response to benzothiadiazole and root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infection in tomato. *J. Plant Physiol.* 230, 40–50. doi:10.1016/j.jplph.2018.07.013.
- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S., *et al.* (2008). A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 471–481. doi:10.1105/tpc.107.056754.
- Yogendra, K. N., Dhokane, D., Kushalappa, A. C., Sarmiento, F., Rodriguez, E., and Mosquera, T. (2017). StWRKY8 transcription factor regulates benzyloquinoline alkaloid pathway in potato conferring resistance to late blight. *Plant Sci.* 256, 208–216. doi:10.1016/j.plantsci.2016.12.014.
- Yogendra, K. N., Kushalappa, A. C., Sarmiento, F., Rodriguez, E., and Mosquera, T. (2014a). Metabolomics deciphers quantitative resistance mechanisms in diploid potato clones against late blight. *Funct. Plant Biol.* doi:10.1071/FP14177.
- Yogendra, K. N., Pushpa, D., Mosa, K. A., Kushalappa, A. C., Murphy, A., and Mosquera, T. (2014b). Quantitative resistance in potato leaves to late blight associated with induced hydroxycinnamic acid amides. *Funct. Integr. Genomics* 14, 285–298. doi:10.1007/s10142-013-0358-8.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J.-P., and Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 12920–12925. doi:10.1073/pnas.230416897.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 414–420. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.003.

## Supplemental data



**Supplemental Figure S1. Hierarchical cluster analysis of metabolic profiles of *Désirée* in (a) ESI-/(b) ESI+ and *Bintje* in (c) ESI-/(d) ESI+**

In *Désirée* ESI- (a), there are two major groups, themselves subdivided into two groups. Each group corresponds to one treatment, which are respectively BABA (black), CCF (red), *Ulva* extract (blue) and control (green). In *Désirée* ESI+ (b), there are also two major groups, which the first correspond to CCF treatment (black), the second is subdivided in two groups corresponding to *Ulva* extract treatment (green) and BABA and control treatment (red). In *Bintje* ESI- (c), there are two major groups, which the first correspond to *Ulva* extract treatment (blue), the second is subdivided in two groups corresponding to CCF treatment (black) and BABA (red) and control treatment (green). In *Bintje* ESI+ (d), there are also two major groups, which the first correspond to CCF treatment (black), the second is subdivided in two groups corresponding to *Ulva* extract (Ext8-red) and BABA and control treatments (green). Calculation methods used to create clusters are the Euclidean distance measure and the Ward linkage.



***Supplemental Figure S2. Putative identifications of metabolites for Bintje genotype***

*Normalized abundance heatmap of metabolites found in ESI- and ESI+. 224 putative identified metabolites for Bintje (“Level 2”). Each row represents one metabolite and the columns represent the average abundance per treatment. Associated to the rows, the hierarchical clustering tree brings together the metabolites by the correlation-based distance calculated with Pearson correlation coefficient and Ward linkage. Clusters make it possible to visually identify metabolic profiles specific to each treatment by showing up-regulation (red), neutral effect (black) and down-regulation (green) by treatments.*





**Supplemental Table S1. Exact position of the 373 metabolites of Désirée genotype represented by the heatmap (Fig. 1e). Read from top to bottom.**

Each metabolite is described by retention time, metabolic unit (m/z), identification, class, chemical formula, error ppm ( $\pm 5$ ), isotope similarity, p-value ( $< 0.05$ ) and ionization.

Position on heatmap	Retention time	m/z	Metabolite	Class	Chemical formula	Error ppm	Isotope Similarity	p-value	Adducts	Ionisation
1	1,87	349,11	Cysteinyl-dopa	Amino acid	C12H16N2O6S	1,07	92,04	9E-09	M+CH3OH+H	ESI+
2	9,93	633,39	Capsaicin	Alkaloid	C18H27NO3	-3,68	80,54	4E-11	2M+Na	ESI+
3	8,28	696,93	Guanosine 3'-diphosphate 5'-triphosphate	Nucleotid	C10H18N5O20P5	-4,72	55,73	4E-07	2M+3H2O+2H	ESI+
4	10,72	882,05	GppppG	Nucleotid	C20H28N10O21P4	1,57	63,64	9E-14	2M+3H2O+2H	ESI+
5	9,65	829,44	17-O-deacetylvindoline	Alkaloid	C23H30N2O5	4,09	84,90	4E-13	2M+H	ESI+
6	9,97	570,03	CDP-4-dehydro-3,6-dideoxy-D-glucose epimer	Carbohydrate	C15H23N3O14P2	-4,55	81,20	0E+00	M+K	ESI+
7	11,68	542,39	Isorenieratene	Terpenoid	C40H48	3,50	81,99	0E+00	2M+3H2O+2H	ESI+
8	2,17	393,13	(S)-N-Methylcanadine	Alkaloid	C21H24NO4+	2,78	83,61	1E-08	M+K	ESI+
9	14,23	841,56	Staphyloxanthin	Terpenoid	C51H78O8	2,68	84,27	2E-09	M+NH4, M+Na,M+K	ESI+
10	9,69	609,31	Presqualene diphosphate	Terpenoid	C30H52O7P2	-0,40	72,68	0E+00	M+Na	ESI+
11	12,75	514,86	Undecaprenyl phosphate alpha-L-Ara4FN	Carbohydrate	C61H100NO8P	-3,29	86,77	5E-15	M+H+Na	ESI+
12	10,63	594,41	Phoenicoxanthin	Terpenoid	C40H52O3	3,12	74,72	1E-09	2M+3H2O+2H	ESI+
13	11,00	397,26	Hercynine	Amino acid	C9H16N3O2	-0,74	95,13	3E-10	2M+H	ESI+
14	11,83	710,50	6beta 7beta-Dihydroxykaurenoic acid	Terpenoid	C20H30O4	4,07	85,38	2E-15	M+H- 2H2O,2M+ACN+	ESI+
15	8,63	769,15	MurNAc alpha-1-phosphate	Carbohydrate	C11H20NO11P	1,93	96,36	3E-06	2M+Na	ESI+
16	4,51	300,12	N-caffeoyltyramine	Phenylpropanoid	C17H17NO4	-4,23	77,47	2E-04	M+H	ESI+
17	7,55	401,21	Dihydrozeatin-O-glucoside	Terpenoid	C16H25N5O6	-3,06	88,42	6E-06	M+NH4	ESI+

18	3,05	341,09	Caffeic acid 3-glucoside	Phenylpropanoi d	C15H18O9	-2,44	93,10	2E-05	M-H	ESI-
19	9,80	627,08	UDP-alpha-D-ManNAc3NAcA	Carbohydrate	C19H28N4O18P2	,62	78,01	7E-14	M+H-2H2O	ESI+
20	0,56	351,10	N-Acetyl-L-aspartate	Amino acid	C6H9NO5	0,64	98,07	9E-04	2M+H	ESI+
21	0,57	395,13	Syringin	Phenylpropanoi d	C17H24O9	-3,48	91,19	2E-08	M+Na	ESI+
22	2,93	302,14	S-6-O-Methylnorlaudanosoline	Alkaloid	C17H19NO4	-1,98	93,24	4E-04	M+H	ESI+
23	9,00	651,37	Ruscopine	Alkaloid	C16H26N4O2	0,07	70,50	4E-05	2M+K	ESI+
24	4,90	678,11	Myricetin	Flavonoid	C15H10O8	4,25	83,39	2E-02	2M+ACN+H	ESI+
25	10,70	587,33	4-Coumaroyl-3-hydroxyagmatine	Phenylpropanoi d	C14H21N4O3	1,23	86,83	2E-06	2M+H	ESI+
26	14,66	898,09	Malonyl-CoA	Lipid	C24H38N7O19P3S	4,16	86,62	7E-06	M+2Na-H	ESI+
27	8,63	800,15	CoA	Lipid	C21H36N7O16P3S	-1,84	72,40	4E-04	M+CH3OH+H	ESI+
28	12,73	571,38	3-Oxohexadecanoyl-acp	Lipid	C16H29O2S	-4,88	93,35	5E-05	2M+H	ESI+
29	14,99	677,96	3-Iodo-L-tyrosine	Amino acid	C9H10INO3	4,90	94,98	1E-02	2M+ACN+Na	ESI+
30	13,02	311,29	Icosenoic acid	Lipid	C20H38O2	-4,52	90,24	5E-05	M+H	ESI+
31	9,69	860,56	Terpendole B	Terpenoid	C27H35NO3	4,91	74,13	3E-04	2M+NH4	ESI+
32	12,16	828,01	Quercetin 3-sulfate	Flavonoid	C15H10O10S	-2,88	78,77	1E-09	2M+ACN+Na	ESI+
33	11,78	489,29	Tubulosine	Alkaloid	C29H37N3O3	-3,70	87,79	3E-07	2M+3H2O+2H	ESI+
34	9,94	389,25	2-Amino-3-methylvalerate	Amino acid	C6H12NO2-	-3,36	97,15	5E-05	3M-H	ESI-
35	,26	344,15	Phaseic acid	Terpenoid	C15H20O5	2,34	93,80	7E-03	M+ACN+Na	ESI+
36	8,49	291,20	2R-HPOT	Lipid	C18H30O4	2,34	86,51	1E-03	M-H2O-H	ESI-
37	3,24	198,11	4-O-Methylnorbelladine	Alkaloid	C10H12O3	0,08	90,10	3E-06	M+NH4	ESI+
38	4,56	721,27	3-Methoxytyramine-betaxanthin	Amino acid	C18H20N2O6	-2,75	84,09	1E-05	2M+H	ESI+
39	5,62	161,10	Methyleugenol	Phenylpropanoi d	C11H14O2	-0,43	88,33	2E-04	M+H-H2O	ESI+
40	5,86	758,19	Digalacturonate	Carbohydrate	C12H18O13	3,91	58,88	1E-06	2M+NH4	ESI+
41	7,49	731,34	Digalactosylceramide sulfate	Lipid	C31H56NO16S	-3,16	78,75	6E-06	M+H	ESI+
42	6,01	673,25	Berberine	Alkaloid	C20H18NO4+	-1,50	94,39	9E-03	2M+H	ESI+
43	7,23	551,28	Feruloylputrescine	Amino acid	C14H20N2O3	-4,76	86,50	3E-02	2M+Na	ESI+
44	8,49	291,20	9S-HPOT	Lipid	C18H30O4	-2,34	86,51	1E-03	M-H2O-H	ESI-
45	0,54	346,05	AMP	Carbohydrate	C10H14N5O7P	-3,35	94,37	1E-04	M-H	ESI-

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

46	0,86	346,05	N-Acetyl-D-glucosamine phosphate	6-Carbohydrate	C8H16NO9P	-0,04	89,29	1E-03	M+FA-H	ESI-
47	0,74	306,08	glutathione	Amino acid	C10H17N3O6S	-2,91	91,36	8E-04	M-H	ESI-
48	2,61	277,17	p-Coumaroylagmatine	Amino acid	C14H20N4O2	-1,74	98,71	4E-03	M+H	ESI+
49	0,55	482,11	2-succinatobenzoate	Alkaloid	C11H8O5-2	-4,49	97,26	5E-04	2M+ACN+H	ESI+
50	4,32	399,12	Xanthohumol	Flavonoid	C21H22O5	-0,52	89,48	2E-13	M+2Na-H	ESI+
51	8,49	291,20	12-OPDA	Lipid	C18H28O3	-2,37	86,74	1E-03	M-H	ESI-
52	11,47	339,29	plaunotol	Terpenoid	C20H34O2	-3,11	94,43	2E-03	M+CH3OH+H	ESI+
53	0,72	173,14	N-Carbamoylputrescine	Phenylpropanoid	C5H13N3O	-1,31	94,24	2E-03	M+ACN+H	ESI+
54	9,34	524,36	trans-Tetradec-2-enoyl-acp	Lipid	C14H25OS	1,31	81,83	1E-02	2M+ACN+H	ESI+
55	8,12	358,37	Behenic acid	Lipid	C22H44O2	-3,78	95,82	4E-02	M+NH4	ESI+
56	5,24	777,28	Allocriptopine	Alkaloid	C21H23NO5	-4,37	94,91	4E-04	2M+K	ESI+
57	5,50	383,13	7-deoxyloganic acid	Terpenoid	C16H24O9	1,27	84,91	9E-03	M+Na, 2M+ACN+H	ESI+
58	11,67	708,47	1-Hydroxy-gamma-carotene glucoside ester	Terpenoid	C47H67O7	-0,12	70,68	7E-06	M+H-2H2O	ESI+
59	2,78	660,17	Delphinidin 3-O-6-caffeoyl-beta-D-glucoside	Flavonoid	C30H27O15+	0,20	95,76	1E-03	M+CH3OH+H	ESI+
60	5,28	649,29	6S-6-hydroxyhyoscyamine	Alkaloid	C17H23NO4	-1,13	94,33	1E-02	2M+K	ESI+
61	11,74	401,21	10beta 14beta-Dihydroxytaxa-420 11-dien-5alpha-yl acetate	Terpenoid	C22H34O4	1,65	91,99	8E-03	M+K	ESI+
62	11,87	559,31	3-Oxotetradecanoyl-acp	Lipid	C14H25O2S	-3,50	83,81	1E-04	2M+FA-H	ESI-
63	1,06	276,99	2-C-methyl-D-erythritol 2 4-cyclic diphosphate	Terpenoid	C5H12O9P2	-3,68	92,60	2E-08	M-H	ESI-
64	2,00	299,08	Salicylate & beta-D-glucose ester	Phenylpropanoid	C13H16O8	-2,76	85,38	1E-07	M-H	ESI-
65	2,01	137,02	3 4-Dihydroxybenzaldehyde	Alkaloid	C7H6O3	-2,28	92,06	3E-07	M-H	ESI+
66	4,26	207,14	Methyl jasmonate	Lipid	C13H20O3	-1,56	89,53	E-02	M+H-H2O	ESI+
67	3,24	198,11	Coniferyl alcohol	Phenylpropanoid	C10H12O3	0,08	90,10	3E-06	M+NH4	ESI+
68	0,54	355,09	D-glucono-1 5-lactone	Carbohydrate	C6H10O6	-3,93	96,66	2E-08	2M-H	ESI-
69	10,27	579,39	Torulene	Terpenoid	C40H54	-4,84	88,38	1E-03	M+2Na-H	ESI+
70	5,39	559,14	Rhoifolin	Flavonoid	C27H30O14	-1,62	75,17	2E-07	M-H2O-H	ESI-

71	10,49	703,40	Isonuatigenin 3-rhamnosyl-1- >2- glucoside	Flavonoid	C39H62O13	-0,96	96,67	2E-04	M+H-2H2O	ESI+
72	0,76	341,11	Cellobiose	Carbohydrate	C12H22O11	-2,91	85,39	4E-06	M-H	ESI-
73	10,50	745,41	Yamogenin 3-O-neohesperidoside	Terpenoid	C39H62O12	-1,42	90,31	1E-03	M+Na	ESI+
74	3,17	261,17	Traumatic acid	Lipid	C12H20O4	3,09	96,81	6E-07	M+CH3OH+H	ESI+
75	10,32	461,32	26-Hydroxybrassinolide	Terpenoid	C28H48O7	-3,34	92,61	1E-02	M+H-2H2O	ESI+
76	11,12	797,44	deacetoxyvindoline	Alkaloid	C23H30N2O4	-4,59	83,05	5E-04	2M+H	ESI+
77	12,37	589,47	Phytoene	Terpenoid	C40H64	2,82	80,38	7E-05	M+2Na-H	ESI+
78	2,98	271,10	Vestitol	Flavonoid	C16H16O4	-3,45	83,58	2E-05	M-H	ESI-
79	3,39	337,09	Gentiopicrin	Terpenoid	C16H18O8	-2,84	94,46	3E-07	M-H	ESI-
80	3,62	735,21	p-Coumaroyl quinic acid	Phenylpropanoi d	C16H18O8	-3,26	97,00	7E-12	2M+Hac-H	ESI-
81	12,32	465,30	Costunolide	Terpenoid	C15H20O2	1,33	94,53	6E-03	2M+H	ESI+
82	3,49	335,08	Scopolin	Phenylpropanoi d	C16H18O9	-3,23	82,90	1E-05	M-H2O-H	ESI-
83	3,42	339,11	2-Isopropylmaleate	Amino acid	C7H10O4	0,93	88,63	1E-05	2M+Na	ESI+
84	3,00	229,10	Formyl-N-acetyl-5- methoxykynurenamine	Amino acid	C13H16N2O4	-1,73	93,54	5E-03	M+H-2H2O	ESI+
85	4,65	191,06	L-Quinate	Amino acid	C7H12O6	-4,66	91,28	2E-05	M-H	ESI-
86	8,87	398,34	Solanidine	Alkaloid	C27H43NO	-3,81	90,26	6E-04	M+H	ESI+
87	4,63	499,12	Formononetin 7-O-glucoside-6-O- malonate	Flavonoid	C25H24O12	-2,13	95,10	2E-04	M+H-H2O, M+Na	ESI+
88	4,46	513,10	Syringetin 3-rhamnoside	Flavonoid	C23H24O12	2,35	77,43	1E-03	M+Na-2H	ESI-
89	11,02	488,33	Sphingosyl-phosphocholine	Lipid	C23H50N2O5P	-1,84	76,64	5E-02	M+Na	ESI+
90	3,43	375,13	Secologanate	Terpenoid	C16H22O10	2,81	92,40	2E-02	M+H	ESI+
91	13,43	607,29	Euphornin	Terpenoid	C33H44O9	4,53	84,07	3E-02	M+Na	ESI+
92	3,33	191,11	Tuberonic Acide	Hormone	C12H18O4	-1,57	89,68	4E-04	M+H-2H2O	ESI+
93	5,56	417,15	Sinapaldehyde	Phenylpropanoi d	C11H12O4	-4,55	94,03	6E-03	2M+H	ESI+
94	2,49	589,17	Guanosine	Nucleotid	C10H13N5O5	-2,15	98,14	4E-03	2M+Na	ESI+
95	3,27	137,10	9-Oxononanoic acid	Lipid	C9H16O3	-3,14	90,01	4E-04	M+H-2H2O	ESI+
96	4,73	471,16	Abscisic acid glucose ester	Terpenoid	C21H30O9	4,63	77,83	2E-02	M+2Na-H	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

97	5,03	351,12	Curcumin	Phenylpropanoi d	C21H20O6	-3,34	95,30	9E-03	M+H-H2O	ESI+
98	3,88	485,11	Malonyldaidzin	Flavonoid	C24H22O12	1,52	93,60	1E-02	M+H-H2O	ESI+
99	4,19	414,33	Peimine	Alkaloid	C27H45NO3	-4,91	87,23	4E-03	M+H-H2O, M+H	ESI+
100	5,61	592,38	13-hydroxylupanine	Alkaloid	C15H24N2O2	-3,98	62,57	3E-03	2M+ACN+Na	ESI+
101	4,45	165,05	Caffeyl alcohol	Phenylpropanoi d	C9H10O3	-4,92	90,07	1E-04	M-H	ESI-
102	4,59	385,19	12-Hydroxyjasmonic acid 12-O-β-D-glucoside	Lipid	C19H30O8	-3,23	79,70	1E-02	M-H	ESI-
103	3,44	385,11	4-O-beta-D-Glucosyl-sinapate	Flavonoid	C17H22O10	-4,02	81,12	2E-04	M-H	ESI-
104	6,06	543,28	Atractyloside D	Alkaloid	C27H46O12	-1,84	74,66	3E-05	M-H2O-H	ESI-
105	3,20	541,16	D-Lombricine	Amino acid	C6H15N4O6P	4,92	63,01	2E-05	2M+H	ESI+
106	3,68	771,21	Portulacaxanthin II	amino acid	C18H18N2O7	-3,77	90,97	3E-03	2M+Na	ESI+
107	5,85	415,32	Calcitrol	Terpenoid	C27H44O4	-4,81	93,43	3E-03	M+H-H2O	ESI+
108	3,60	292,99	5-3-carboxy-3-oxopropyl-4-dihydroxypicolinate	6- Amino acid	C10H8NO7	4,00	94,86	7E-03	M+K	ESI+
109	2,82	357,08	DCDC	Amino acid	C7H8O4	-0,86	92,80	1E-03	2M+FA-H	ESI-
110	2,15	203,08	L-Tryptophan	Amino acid	C11H12N2O2	-3,14	97,23	8E-06	M-H	ESI-
111	4,42	469,33	Rishitinol	Alkaloid	C15H22O2	-3,70	96,44	7E-03	2M+H	ESI+
112	3,95	189,07	4-Guanidinobutanamide	Amino acid	C5H12N4O	1,36	96,89	2E-02	M+2Na-H	ESI+
113	5,34	381,31	Secaliferol	Terpenoid	C27H44O3	-4,67	95,36	2E-03	M+H-2H2O	ESI+
114	3,82	741,19	Quercetin 3-2G-xylosylrutinoside	Flavonoid	C32H38O20	-1,45	96,25	2E-07	M-H	ESI-
115	3,33	297,11	p-Coumaraldehyde	Phenylpropanoi d	C9H8O2	-3,62	90,29	4E-03	2M+H	ESI+
116	5,49	559,14	Kaempferitrin	Flavonoid	C27H30O14	-2,06	78,63	1E-07	M-H2O-H	ESI-
117	4,46	491,12	Iristectorigenin A 7-O-glucoside	Flavonoid	C23H24O12	-1,73	92,46	2E-07	M-H	ESI-
118	3,51	303,13	N-Methylantranilate	Alkaloid	C8H9NO2	-3,58	90,92	2E-05	2M+H	ESI+
119	6,86	539,22	N-caffeoylputrescine	Phenylpropanoi d	C13H18N2O3	-4,80	91,64	5E-03	2M+K	ESI+
120	3,37	277,15	4-Hydroxyphenylethanol	Amino acid	C8H10O2	1,19	91,54	8E-03	M+H-2H2O, 2M+H	ESI+
121	3,90	551,10	Quercetin 3-O-6-O-malonyl-beta-D-glucoside	Flavonoid	C24H22O15	2,14	85,00	5E-06	M+H	ESI+

122	5,32	727,24	Bruceoside A	Terpenoid	C32H42O16	-3,22	75,14	3E-06	M+FA-H	ESI-
123	4,03	727,08	XMP	Nucleotid	C10H13N4O9P	4,83	78,52	1E-05	2M-H	ESI-
124	3,62	175,04	Scopoletin	Phenylpropanoid	C10H8O4	-1,06	95,46	1E-04	M+H-H2O	ESI+
125	3,66	649,14	Baimaside	Flavonoid	C27H30O17	-2,23	96,55	8E-05	M+H, M+Na, M+K	ESI+
126	3,68	271,02	Sedoheptulose 7-phosphate	Carbohydrate	C7H15O10P	4,77	90,81	3E-05	M-H2O-H	ESI-
127	3,91	667,15	Phosphatidylcholine	Lipid	C10H18NO8P	-3,26	92,67	1E-04	2M+FA-H	ESI-
128	3,46	497,16	6-Pyruvoyltetrahydropterin	Folate	C9H11N5O3	0,01	90,66	4E-02	2M+Na	ESI+
129	6,31	435,09	Asperuloside	Terpenoid	C18H22O11	3,11	83,56	1E-05	M+Na-2H	ESI-
130	2,83	465,10	5-Hydroxyferulic acid methyl ester	Phenylpropanoid	C10H10O5	-2,31	95,50	1E-05	2M+FA-H	ESI-
131	4,38	317,06	3-O-Methylquercetin	Flavonoid	C16H12O7	-2,74	99,39	1E-05	M+H	ESI+
132	5,19	690,45	3-Oxo-octadecanoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-phosphate	Lipid	C18H33O2S	-3,97	91,58	2E-04	2M+ACN+Na	ESI+
133	4,65	513,105	Maackiain-3-O-glucosyl-6-O-malonate	Flavonoid	C25H24O13	-2,36	75,60	4E-10	M-H2O-H	ESI-
134	1,90	476,12	Indolylmethylthiohydroximate	Amino acid	C10H10N2OS	4,11	93,94	3E-04	2M+ACN+Na M+H-2H2O,	ESI+
135	4,88	521,13	Kanokoside A	Alkaloid	C21H32O12	-3,01	91,99	1E-06	M+2Na-H	ESI+
136	2,54	179,03	Caffeic acid	Phenylpropanoid	C9H8O4	-4,99	89,89	3E-04	M-H	ESI-
137	3,51	303,05	Dihydromyricetin	Flavonoid	C15H12O8	0,16	99,68	1E-04	M+H-H2O	ESI+
138	4,03	609,15	Rutin	Flavonoid	C27H30O16	0,13	98,36	1E-06	M-H	ESI-
139	2,30	254,17	Traumatin	Lipid	C12H20O3	-3,75	94,51	1E-03	M+ACN+H	ESI+
140	2,98	264,12	Coniferyl acetate	Phenylpropanoid	C12H14O4	-3,48	97,49	7E-07	M+ACN+H	ESI+
141	2,83	303,05	Dihydroquercetin	Flavonoid	C15H12O7	-3,55	84,98	6E-06	M-H	ESI-
142	3,06	595,17	Butein 3 2-diglucoside	Flavonoid	C27H32O15	-1,99	77,83	2E-07	M-H	ESI-
143	5,08	559,14	Vitexin 2-O-beta-L-rhamnoside	Flavonoid	C27H30O14	-1,49	92,99	7E-05	M-H2O-H	ESI-
144	2,44	353,09	Fraxin	Phenylpropanoid	C16H18O10	-1,45	78,96	5E-06	M+H-H2O	ESI+
145	2,87	539,14	2-Methyl-1-hydroxypropyl-ThPP	Amino acid	C16H27N4O8P2S	-1,28	88,65	3E-05	M+ACN+H	ESI+
146	3,19	254,15	L-Hyoscyamine	Alkaloid	C17H23NO3	-3,48	94,39	1E-02	M+H-2H2O	ESI+
147	2,96	148,05	tropate	Alkaloid	C9H9O3	-3,31	90,08	4E-03	M+H-H2O	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

148	2,64	426,02	GDP	Nucleotid	C10H15N5O11P2	3,32	96,45	2E-02	M+H-H2O	ESI+
149	5,07	539,27	Xanthoxin	Terpenoid	C15H22O3	-4,07	96,32	3E-05	M+H, 2M+K	ESI+
150	2,98	357,06	5-O-Caffeoylshikimic acid	Phenylpropanoi d	C16H16O8	4,92	86,05	4E-05	M+Na-2H	ESI-
151	5,84	553,23	Dehydrodolichol diphosphate	Terpenoid	C25H44O7P2	-0,66	74,80	2E-04	M+Cl	ESI-
152	5,31	644,31	Aconitine	Terpenoid	C34H47NO11	3,00	67,82	8E-03	M-H	ESI-
153	5,74	293,14	Abscisic aldehyde	Terpenoid	C15H20O3	-4,56	84,29	6E-08	M+FA-H	ESI-
154	2,52	353,09	1-O-Vanilloyl-beta-D-glucose	Phenylpropanoi d	C14H18O9	4,60	95,48	1E-04	M+Na	ESI+
155	6,31	435,09	Futalosine	Terpenoid	C19H18N4O7	-0,03	82,29	1E-05	M+Na-2H	ESI-
156	3,60	866,16	2-Methylacetoacetyl-CoA	Amino acid	C26H42N7O18P3S	-2,92	66,65	4E-04	M+H	ESI+
157	3,34	769,20	Chelirubine	Alkaloid	C21H16NO5	-1,41	89,67	3E-06	2M+FA-H	ESI-
158	2,47	516,09	Delphinidin 3-O-6-O-malonyl-beta-D-glucoside	Flavonoid	C24H23O15	3,14	86,95	1E-02	M+H-2H2O	ESI+
159	4,99	387,14	2-Descarboxy-betanidin	Amino acid	C17H17N2O6	2,12	96,26	1E-02	M+ACN+H	ESI+
160	6,96	663,33	norajmaline	Alkaloid	C19H24N2O2	3,38	96,14	3E-02	2M+K	ESI+
161	4,49	429,12	Hesperetin 7-O-glucoside	Flavonoid	C22H24O11	4,84	86,28	2E-02	M+H-2H2O	ESI+
162	2,66	367,10	L-Fucose	Carbohydrate	C6H12O5	-4,30	97,09	2E-03	2M+K	ESI+
163	2,92	319,13	N-Glucosylnicotinate	Alkaloid	C12H16NO7	3,82	88,89	6E-03	M+CH3OH+H	ESI+
164	5,01	307,26	Stearate	Lipid	C18H36O2	1,89	90,45	1E-02	M+Na	ESI+
165	7,36	364,32	Terminaline	Alkaloid	C23H41NO2	-3,62	98,07	3E-02	M+H	ESI+
166	3,00	215,06	Caffeine	Phenylpropanoi d	C8H10N4O2	1,34	93,40	2E-06	M+Na-2H	ESI-
167	6,22	747,39	Autumnaline	Alkaloid	C21H27NO5	4,86	90,93	5E-02	2M+H	ESI+
168	4,81	397,15	7-deoxyloganin	Terpenoid	C17H26O9	-2,21	92,07	2E-03	M+Na	ESI+
169	3,21	353,14	Gibberellin A4	Terpenoid	C19H24O5	1,76	80,33	2E-06	M+Na-2H	ESI-
170	2,79	719,16	Rosmarinate	Amino acid	C18H16O8	-3,32	97,62	8E-08	2M-H	ESI-
171	4,64	515,12	1 3-Dicaffeoylquinic acid	Phenylpropanoi d	C25H24O12	-1,05	95,01	6E-07	M-H	ESI-
172	3,68	707,18	Caffeoyl quinic acid	Phenylpropanoi d	C16H18O9	-4,68	86,27	7E-12	2M-H	ESI-
173	3,02	179,03	3-3 5-Dihydroxyphenyl-2-propenoic acid	Phenylpropanoi d	C9H8O4	-3,47	96,73	3E-06	M-H	ESI-



174	2,98	163,04	4-Hydroxycoumarin	Phenylpropanoi d	C9H6O3	3,06	98,95	3E-05	M+H-H2O, M+H, M+ACN+H	ESI+
175	3,00	513,10	Malonylglycitin	Flavonoid	C25H24O13	-2,33	75,47	1E-04	M-H2O-H	ESI-
176	3,25	343,08	3 7 4-Tri-O-methylquercetin Ayarin	Flavonoid	C18H16O7	-3,13	83,98	2E-05	M-H	ESI-
177	4,36	433,11	Naringenin 7-O-β-glucoside =Prunin	Flavonoid	C21H22O10	-2,28	89,65	5E-10	M-H	ESI-
178	4,20	850,49	Solamargine	Alkaloid	C45H73NO15	-0,67	99,19	9E-04	M+H-H2O	ESI+
179	4,58	414,34	Solasodine	Alkaloid	C27H43NO2	-2,77	97,31	7E-04	M+H	ESI+
180	0,61	335,07	3R 4R-3 4-Dihydroxycyclohexa-1 5- diene-1-carboxylate	Amino acid	C7H8O4	-4,29	94,58	6E-04	2M+Na	ESI+
181	3,26	337,09	4-p-Coumaroylquinic acid	Phenylpropanoi d	C16H18O8	-2,87	93,21	8E-07	M-H	ESI-
182	6,15	617,35	Glycosyl-4 4-diaponeurosporenoate	Terpenoid	C36H50O7	4,36	76,18	6E-04	M+Na	ESI+
183	2,90	833,23	Daidzin	Flavonoid	C21H20O9	0,55	95,46	1E-13	2M+H	ESI+
184	5,06	583,14	Arbutin	Carbohydrate	C12H16O7	-2,76	94,30	2E-09	2M+K	ESI+
185	0,51	314,08	7596	Alkaloid	C20H15NO4	2,77	79,45	2E-03	M-H2O-H	ESI-
186	6,08	719,16	3 7-Di-O-methylquercetin	Flavonoid	C17H14O7	0,27	91,21	3E-02	2M+Hac-H	ESI-
187	4,17	587,19	100-1	Terpenoid	C31H34O10	-1,73	71,43	1E-02	M+Na-2H	ESI-
188	3,21	161,02	5-Amino-4-imidazolecarboxamide	Nucleotid	C4H6N4O	-0,06	94,19	2E-04	M+Cl	ESI-
189	4,51	394,31	9-cis-10-Apo-beta-carotenal	Terpenoid	C27H36O	-3,70	84,46	5E-03	M+NH4	ESI+
190	5,18	529,13	Luteolin 7-glucoside-4-Z-2-methyl 1- 2-butenolate	Flavonoid	C26H26O12	-2,27	77,08	4E-06	M-H	ESI-
191	2,86	555,11	CDP-ribitol	Carbohydrate	C14H25N3O15P2	-1,47	90,93	2E-05	M+NH4	ESI+
192	3,47	460,12	5-Butyrylphosphinosine	Nucleotid	C14H19N4O9P	3,32	96,82	4E-03	M+ACN+H	ESI+
193	2,79	243,07	Piceatannol	Phenylpropanoi d	C14H12O4	-3,85	86,39	8E-05	M-H	ESI-
194	2,79	271,10	3 4-Dihydroxystyrene	Phenylpropanoi d	C8H8O2	-3,53	92,32	1E-04	2M-H	ESI-
195	3,02	155,03	Shikimate	Amino acid	C7H10O5	-4,98	91,60	3E-04	M-H2O-H	ESI-
196	3,60	665,24	Flavaprenin 7 4-diglucoside	Flavonoid	C32H40O15	-3,56	80,58	5E-03	M+H	ESI+
197	3,66	649,14	Delphinidin 3-O-3 6-O- dimalonylglucoside	Flavonoid	C27H30O17	-2,23	96,55	8E-05	M+H, M+Na, M+K	ESI+
198	3,60	369,12	3-Oxoocctanoyl-acp	Lipid	C8H13O2S	-1,72	88,48	2E-04	2M+Na	ESI+
199	5,25	615,35	Astaxanthin diester	Terpenoid	C42H50O6	0,32	80,62	2E-02	M+H-2H2O	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

200	3,47	636,24	N-Acetylneuraminat	Carbohydrate	C11H19NO9	-1,59	86,43	7E-03	2M+NH4	ESI+
201	4,31	603,20	Acanthoside B	Phenylpropanoi d	C28H36O13	-3,06	93,56	6E-03	M+Na, M+K	ESI+
202	3,49	389,06	Chlorogenic acid	Phenylpropanoi d	C16H18O9	-3,37	85,05	7E-06	M+Cl	ESI-
203	3,91	449,11	2 3 4 6-Peptahydroxychalcone 4-O-glucoside	Flavonoid	C21H22O11	-1,77	92,01	4E-08	M-H	ESI-
204	8,28	529,28	Abscisate	Terpenoid	C15H20O4	-4,58	96,57	6E-03	2M+H	ESI+
205	4,34	593,15	Scolymoside	Flavonoid	C27H30O15	-1,12	95,40	8E-07	M-H	ESI-
206	4,32	287,05	2-Hydroxygenistein	Flavonoid	C15H10O6	-1,34	99,38	3E-05	M+H	ESI+
207	3,57	367,10	1-O-Sinapoyl-beta-D-glucose	Phenylpropanoi d	C17H22O10	-1,76	96,52	3E-05	M-H2O-H	ESI-
208	0,53	617,17	Thiomethyladenosine	Terpenoid	C11H15N5O3S	-1,65	91,06	5E-07	2M+Na	ESI+
209	3,60	177,05	Ferulic acid	Phenylpropanoi d	C10H10O4	0,56	98,61	2E-04	M+H-H2O	ESI+
210	3,35	575,17	cyclo-Dopa-glucuronylglucoside	Amino acid	C21H27NO15	1,57	79,79	1E-04	M+ACN+H	ESI+
211	5,05	530,38	6alpha-Hydroxy-castasterone	Terpenoid	C28H50O5	2,33	90,44	1E-04	M+ACN+Na	ESI+
212	5,78	780,42	Corydaline	Alkaloid	C22H27NO4	4,26	93,88	4E-06	2M+ACN+H	ESI+
213	2,39	516,23	Carnosine	Amino acid	C9H14N4O3	-0,07	91,89	4E-03	2M+ACN+Na	ESI+
214	4,98	412,36	5 7 22 2428-Ergostatetraenol	Terpenoid	C28H42O	-3,98	98,92	5E-04	M+NH4	ESI+
215	2,65	179,03	3-3 4-Dihydroxyphenylpyruvate	Amino acid	C9H8O5	2,34	94,04	3E-06	M+H-H2O	ESI+
216	3,76	648,19	Raloxifene-6-glucuronide	Flavonoid	C34H35NO10S	1,65	79,55	1E-05	M-H	ESI-
217	2,98	186,05	Indolepyruvate	Amino acid	C11H9NO3	-0,48	97,43	2E-04	M+H-H2O	ESI+
218	3,73	391,10	5-O-Feruloylquinic acid	Phenylpropanoi d	C17H20O9	-4,09		2E-05	M+H, M+Na, M+K	ESI+
219	4,59	578,19	Dalpaniculin	Flavonoid	C25H28O13	-3,32	95,18	2E-03	M+ACN+H	ESI+
220	5,17	797,28	S-adenosyl-L-methionine	Amino acid	C15H23N6O5S	2,24	92,32	5E-04	2M-H	ESI-
221	4,38	621,18	Pelargonidin coumaroylglucoside	3-6-p- Flavonoid	C30H27O12	0,79	88,21	3E-02	M+ACN+H	ESI+
222	5,03	567,13	Irigenin 7-O-glucoside	Flavonoid	C24H26O13	-2,04	77,13	1E-02	M+FA-H	ESI-
223	4,22	848,09	acetyl-CoA	Carbohydrate	C23H38N7O17P3S	-1,10	76,59	2E-02	M+K	ESI+
224	4,85	417,25	5R-6-Hydroxy-5-isopropenyl-2-methylhexanoate	Terpenoid	C10H18O3	-3,65	89,04	4E-05	2M+FA-H	ESI-

225	0,72	744,25	Dihydrochelirubine	Alkaloid	C21H17NO5	-0,84	88,09	5E-02	2M+NH4	ESI+
226	3,20	373,13	3-Ketosucrose	Carbohydrate	C12H20O11	-0,80	75,15	2E-03	M+CH3OH+H	ESI+
227	3,87	447,15	Benzyl alcohol beta-D-xylopyranosyl1->6-beta-D-glucopyranoside	Phenylpropanoid	C18H26O10	-3,86	80,22	4E-03	M+FA-H	ESI-
228	2,82	748,09	Cyanidin-3-O-6-O-malonyl-2-O-glucuronylglucoside	Flavonoid	C30H31O20	4,03	85,60	4E-03	M+K-2H	ESI-
229	5,50	379,30	Carboxyspermidine	Amino acid	C8H19N3O2	4,08	98,06	9E-03	2M+H	ESI+
230	3,59	295,08	Dehypoxanthine fitalosine	Terpenoid	C14H16O7	-3,73	84,43	5E-02	M-H	ESI-
231	3,13	383,16	2-amino-2,3,7-trideoxy-D-lyxo-hept-6-ulosonic acid	Amino acid	C7H13NO5	-3,61	74,61	2E-03	2M+H	ESI+
232	4,73	603,08	UDP-2-acetamido-3-amino-2,3-dideoxy-alpha-D-glucuronate	Carbohydrate	C17H26N4O17P2	4,60	78,53	1E-02	M+H-H2O	ESI+
233	3,66	340,19	Demissine	Alkaloid	C50H83NO20	4,71	61,56	6E-05	M+3H	ESI+
234	5,09	493,29	Thiobinupharidine	Alkaloid	C30H42N2O2S	-0,40	67,95	1E-02	M-H	ESI+
235	4,90	397,22	Decanoyl-acp	Lipid	C10H19OS	-0,52	90,40	5E-04	2M+Na	ESI+
236	12,19	355,07	Isopentenyl phosphate	Terpenoid	C5H11O4P	0,52	70,98	3E-02	2M+Na	ESI+
237	4,85	433,21	Methyl 9,12,13,15-bisepidioxy-16-hydroperoxy-10-octadecenoate	Lipid	C19H32O8	-3,53	90,10	3E-02	M+FA-H	ESI-
238	12,19	575,10	trans-Zeatin riboside diphosphate	Terpenoid	C15H23N5O11P2	2,94	62,04	2E-02	M+ACN+Na	ESI+
239	6,76	839,20	5,3,5-Trihydroxy-3,6,7,8,4-pentamethoxyflavone	Flavonoid	C20H20O10	-0,09	93,94	4E-04	2M-H	ESI-
240	3,86	328,12	3-Epimacronine	Alkaloid	C18H19NO5	-3,13	94,74	2E-05	M-H	ESI-
241	0,83	308,98	D-ribose 1,5-bisphosphate	Carbohydrate	C5H12O11P2	-3,24	92,16	1E-05	M-H	ESI-
242	14,39	253,22	9Z-Hexadecenoic acid	Lipid	C16H30O2	-4,01	83,50	1E-03	M-H	ESI-
243	2,64	160,08	indol-3-ylacetaldehyde	Amino acid	C10H9NO	-1,87	89,20	2E-02	M+H	ESI+
244	3,44	367,27	Phytoceramide	Lipid	C19H38NO4	-2,05	88,55	1E-02	M+Na	ESI+
245	14,39	277,22	alpha-Linolenic acid	Lipid	C18H30O2	-3,10	82,44	1E-06	M-H	ESI-
246	1,70	137,05	Hypoxanthine	Nucleotid	C5H4N4O	1,17	93,14	7E-04	M+H	ESI+
247	3,47	490,17	Demethylalangiside	Alkaloid	C24H29NO10	-2,04	88,99	2E-06	M-H	ESI-
248	3,01	457,13	Enzyme N6-(dihydrolipoyl)lysine	Carbohydrate	C8H16NOS2	3,14	87,38	2E-06	2M+FA-H	ESI-
249	3,98	314,10	Hippeastrine	Alkaloid	C17H17NO5	-2,52	82,56	1E-05	M-H	ESI-
250	3,68	316,12	S-Hercyn-2-yl-L-cysteine S-oxide	Amino acid	C12H21N4O5S	-2,55	93,24	9E-06	M+H-H2O, M+K	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

251	4,04	462,18	Morphine-3-glucuronide	Alkaloid	C23H27NO9	-1,31	94,16	3E-05	M+H, M+Na	ESI+
252	4,41	454,04	3-Oxalomalate	Carbohydrate	C6H6O8	-4,06	88,92	1E-04	2M+ACN+H	ESI+
253	4,67	592,12	Cyanidin 3-6-p-caffeoyl glucoside	Flavonoid	C30H27O14+	0,91	71,84	9E-03	M-H2O-H	ESI-
254	4,63	308,15	N-Succinyl-LL-2-diaminoheptanedioate	Amino acid	C11H18N2O7	1,84	88,57	1E-04	M+NH4, 2M+H	ESI+
255	2,16	305,16	Feruloylagmatine	Phenylpropanoid	C15H22N4O3	-3,30	86,28	9E-06	M-H	ESI-
256	4,63	597,21	Pelargonidin 3-O-rutinoside	Flavonoid	C27H31O14	3,03	96,50	2E-06	M+NH4	ESI+
257	0,57	423,06	3-2-Carboxyethenyl-cis cis-muconate	Phenylpropanoid	C9H8O6	2,06	91,77	4E-03	2M-H	ESI-
258	3,61	430,09	Cyanidin 5-O-glucoside	Flavonoid	C21H21O11+	3,21	78,04	1E-08	M-H2O-H	ESI-
259	0,51	88,04	L-alanine	Amino acid	C3H7NO2	-4,67	95,94	7E-04	M-H	ESI-
260	3,20	437,20	L-Glutamine	Amino acid	C5H10N2O3	3,85	92,71	4E-06	3M-H	ESI-
261	13,05	399,35	Dodecanoic acid	Lipid	C12H24O2	-2,82	87,92	2E-02	2M-H	ESI-
262	3,92	504,19	Alangiside	Alkaloid	C25H31NO10	-1,99	86,78	1E-05	M-H	ESI-
263	3,91	342,13	Sinapoyltyramine	Amino acid	C19H21NO5	-3,33	83,17	3E-05	M-H	ESI-
264	3,61	367,15	gibberellin A37	Terpenoid	C20H26O5	-1,25	79,45	3E-04	M+Na-2H	ESI-
265	3,47	328,12	Melicopicine	Alkaloid	C18H19NO5	-3,11	85,86	9E-06	M-H	ESI-
266	3,84	474,18	Codeine-6-glucuronide	Alkaloid	C24H29NO9	-1,46	95,55	1E-06	M-H	ESI-
267	3,20	490,17	Demethylisoalangiside	Alkaloid	C24H29NO10	-2,09	91,02	5E-08	M-H	ESI-
268	5,39	532,22	Copal-8-ol diphosphate	Terpenoid	C20H38O8P2	-3,54	91,38	3E-02	M+ACN+Na	ESI+
269	6,64	263,16	1-3 4-Dihydroxyphenyl-5-hydroxy-3-decanone	Phenylpropanoid	C16H24O4	-3,14	94,96	8E-03	M+H-H2O	ESI+
270	9,26	328,20	sarpagine	Alkaloid	C19H22N2O2	0,46	85,89	4E-05	M+NH4	ESI+
271	9,17	233,15	Germacrene A acid	Terpenoid	C15H22O2	-3,53	84,48	3E-03	M-H	ESI-
272	9,47	277,18	6-Gingerol	Phenylpropanoid	C17H26O4	-1,49	89,13	1E-07	M+H-H2O	ESI+
273	2,77	898,62	Thermozeaxanthin	Terpenoid	C54H80O8	-3,38	54,36	3E-04	M+ACN+H	ESI+
274	3,53	558,14	Flavonol 3-O-beta-D-glucosyl-1->2-beta-D-glucoside	Flavonoid	C27H25O13	-1,06	82,02	2E-04	M+H	ESI+
275	3,33	417,16	loganate	Terpenoid	C16H23O10	4,42	96,04	5E-04	M+ACN+H	ESI+
276	6,28	884,07	Oxalyl-CoA	Carbohydrate	C23H36N7O19P3S	3,48	87,41	1E-03	M+2Na-H	ESI+
277	6,81	318,30	Phytosphingosine	Lipid	C18H39NO3	-4,12	99,33	6E-05	M+H-H2O, M+H	ESI+

278	5,07	382,11	indolylmethyl desulfoglucosinolate	Amino acid	C16H20N2O6S	-2,17	79,84	6E-03	2M+3H2O+2H	ESI+
279	9,87	383,26	Decanoate	Lipid	C10H20O2	1,87	94,93	1E-04	2M+K	ESI+
280	6,38	181,12	Anethole	Phenylpropanoid	C10H12O	-1,15	98,38	1E-04	M+CH3OH+H	ESI+
281	9,60	313,27	Linoleate	Lipid	C18H32O2	-4,78	92,76	2E-02	M+CH3OH+H	ESI+
282	6,43	671,39	Lobelanine	Alkaloid	C22H25NO2	4,65	78,05	4E-03	2M+H	ESI+
283	5,88	281,13	Dihydrobiopterin	Folate	C9H13N5O3	-2,81	97,97	6E-04	M+ACN+H	ESI+
284	0,49	406,92	3-Phosphohydroxypyruvate	Carbohydrate	C3H5O7P	-2,27	81,90	4E-03	2M+K	ESI+
285	4,64	775,70	Tetracosanoic acid	Lipid	C24H48O2	4,22	76,47	2E-05	2M+K	ESI+
286	9,51	421,23	ecgonine methyl ester	Alkaloid	C10H17NO3	0,40	94,16	4E-02	2M+Na	ESI+
287	3,55	488,16	7 8-Dihydrofolate	Folate	C19H21N7O6	4,11	87,50	7E-03	M+FA-H	ESI-
288	3,69	468,16	THF	Carbohydrate	C19H23N7O6	3,22	86,15	2E-04	M+Na	ESI+
289	6,51	339,25	aphidicolin	Terpenoid	C20H34O4	-3,23	94,40	2E-03	M+H	ESI+
290	1,27	604,07	GDP-L-gulose	Carbohydrate	C16H25N5O16P2	-1,80	79,29	4E-07	M-H	ESI-
291	4,65	282,11	N-Phenylacetylphenylalanine	Phenylpropanoid	C17H17NO3	-3,04	87,21	3E-05	M-H	ESI-
292	5,03	282,11	Morphinone	Alkaloid	C17H17NO3	-3,01	85,76	3E-05	M-H	ESI-
293	0,89	180,07	L-Tyrosine	Terpenoid	C9H11NO3	-3,82	89,74	4E-02	M-H	ESI-
294	1,26	565,05	UDP-glucose	Carbohydrate	C15H24N2O17P2	-0,93	94,09	7E-08	M-H	ESI-
295	4,63	465,29	Terpendole G	Terpenoid	C28H37NO4	3,04	82,60	2E-04	2M+3H2O+2H	ESI+
296	4,47	812,36	Crinine	Alkaloid	C16H17NO3	4,02	91,86	5E-05	3M-H	ESI-
297	5,32	483,22	Zeatin	Terpenoid	C10H13N5O	0,08	87,88	2E-03	2M+FA-H	ESI-
298	1,33	549,05	UDP-Rhamnose	Carbohydrate	C15H24N2O16P2	-1,78	81,04	2E-05	M-H	ESI-
299	5,42	743,09	Unsaturated digalacturonate	Carbohydrate	C12H16O12	0,88	67,39	6E-05	2M+K	ESI+
300	1,83	203,14	Pseudoecgonine	Alkaloid	C9H15NO3	-2,89	98,60	5E-04	M+H, M+NH4	ESI+
301	2,02	249,12	6-hydroxymelatonin	Amino acid	C13H16N2O3	2,72	83,35	4E-05	M+H	ESI+
302	0,50	393,00	Inosine diphosphate	Nucleotid	C10H14N4O11P2	0,84	66,79	5E-03	M+H-2H2O	ESI+
303	2,77	295,14	R-mevalonic acid	Terpenoid	C6H12O4	-4,15	93,01	8E-03	2M-H	ESI-
304	4,19	342,13	Codeinone	Alkaloid	C18H19NO3	-4,07	81,33	3E-02	M+FA-H	ESI-
305	4,25	504,19	Isoalangiside	Alkaloid	C25H31NO10	-1,84	76,44	3E-03	M-H	ESI-

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

306	3,22	788,18	Delphinidin 3-glucoside 5-caffoyl-glucoside	Flavonoid	C36H37O20+	0,70	69,83	2E-03	M-H	ESI-
307	11,94	599,41	Capsorubin	Terpenoid	C40H56O4	-1,86	67,90	7E-05	M-H	ESI-
308	5,88	629,26	Sinapyl alcohol	Phenylpropanoid	C11H14O4	-0,03	83,87	4E-06	3M-H	ESI-
309	6,51	864,18	Monodemalonylsalvianin	Flavonoid	C39H39O21	3,63	79,54	1E-02	M+Na-2H	ESI-
310	11,35	400,32	13Z 16Z-Docosadienoic acid	Lipid	C22H40O2	3,06	93,16	4E-02	M+ACN+Na	ESI+
311	4,98	617,26	Hordatine B-like compounds	Amino acid	C29H40N8O5	-0,45	93,75	4E-12	M+K-2H	ESI-
312	11,63	423,29	Volicitin	Lipid	C23H38N2O5	0,98	90,42	1E-02	M+H	ESI+
313	5,43	632,04	GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose ent-7alpha-Hydroxykaur-16-en-19-oic acid	Carbohydrate	C16H23N5O15P2	-0,63	86,29	4E-04	M+2Na-H	ESI+
314	6,70	675,41		Terpenoid	C20H30O3	4,52	95,26	4E-02	2M+K	ESI+
315	3,31	359,13	Hippurate	Amino acid	C9H9NO3	4,89	81,86	4E-05	2M+H	ESI+
316	4,41	577,16	Naringenin 5 7-di-O-glucoside N-5-phosphonato-β-D-ribosylanthranilate	Flavonoid	C27H32O15	-1,93	86,98	4E-03	M-H2O-H	ESI-
317	0,87	391,03		Amino acid	C12H13NO9P	1,96	91,31	5E-02	M+FA-H	ESI-
318	5,35	330,13	Longifolonine	Alkaloid	C17H15NO4	-4,96	96,26	4E-03	M+CH3OH+H	ESI+
319	4,61	568,22	Aclacinomycin T	Terpenoid	C30H35NO10	-2,44	74,99	5E-02	M-H	ESI-
320	4,17	601,28	Atractyloside G 2-O-i <sup>2</sup> -D-glucopyranoside	Terpenoid	C27H46O13	-4,75	82,29	1E-05	M+Na	ESI+
321	3,28	326,10	Terrestriamide	Phenylpropanoid	C18H17NO5	-3,28	84,77	9E-05	M-H	ESI-
322	2,75	443,19	Dihydrophaseic acid 4-O-β-D-glucoside	Terpenoid	C21H32O10	-2,39	85,02	6E-03	M-H	ESI-
323	6,54	591,35	Cucurbitacin B	Terpenoid	C32H46O8	-3,95	83,11	3E-02	M+CH3OH+H	ESI+
324	4,16	312,12	N-feruloyltyramine	Phenylpropanoid	C18H19NO4	-3,27	81,14	2E-03	M-H	ESI-
325	5,42	713,08	2 3-Cyclic GMP	Nucleotid	C10H12N5O7P	-1,66	96,72	3E-04	2M+Na	ESI+
326	11,77	376,32	Arachidic acid	Lipid	C20H40O2	-1,98	96,33	1E-02	M+ACN+Na	ESI+
327	3,96	724,19	Cyanidin 5-O-beta-D-glucoside 3-O-beta-D-sambubioside	Flavonoid	C32H39O20	0,93	87,78	3E-02	M-H2O-H	ESI+
328	6,21	617,22	Bisdemethoxycurcumin	Phenylpropanoid	C19H16O4	2,82	98,36	3E-04	2M+H	ESI+
329	8,87	369,24	Taxa-420 1112-dien-5alpha-acetoxy-10beta-ol	Terpenoid	C22H34O3	0,18	95,55	4E-02	M+Na	ESI+

330	9,97	194,12	Tryptophol	Amino acid	C10H11NO	-3,97	93,43	5E-03	M+CH3OH+H	ESI+
331	9,11	347,22	swainsonine	Alkaloid	C8H15NO3	0,86	94,26	6E-05	2M+H	ESI+
332	0,55	247,14	D-Octopine	Amino acid	C9H18N4O4	-3,97	96,52	1E-06	M+H	ESI+
333	3,08	336,19	Octadecenoyl-acp	Lipid	C18H33OS	4,79	93,75	2E-09	M+K	ESI+
334	3,16	278,07	5 6 7 8-Tetrahydrobiopterin	Folate	C9H15N5O3	-0,56	88,41	0E+00	M+K-2H	ESI-
335	7,95	215,16	Butyraldehyde	Carbohydrate	C4H8O	-1,55	96,47	1E-14	3M-H	ESI-
336	2,49	307,09	S-Succinylidihydroliipoamide-E	Carbohydrate	C12H20NO4S2	-0,69	78,01	0E+00	M+H	ESI+
337	4,49	600,33	all-trans-hexaprenyl diphosphate	Folate	C30H52O7P2	3,23	89,84	2E-10	2M+3H2O+2H	ESI+
338	0,55	539,14	Cellodextrin	Carbohydrate	C18H32O16	-2,36	88,75	4E-07	M+Cl	ESI-
339	0,54	867,24	Pelargonidin 3-glucoside	Flavonoid	C21H21O10	1,14	89,94	7E-12	2M+H	ESI+
340	1,08	153,04	Xanthine	Alkaloid	C5H4N4O2	-3,06	85,12	6E-12	M+H	ESI+
341	2,49	294,06	Dihydroneopterin	Folate	C9H13N5O4	-0,13	97,49	1E-10	M+K	ESI+
342	8,89	294,24	Stearidonic acid	Lipid	C18H28O2	-3,27	74,30	7E-03	M+NH4	ESI+
343	1,91	253,13	8-propyloxycaffeine	Phenylpropanoi d	C11H16N4O3	-1,63	67,85	4E-05	M+H	ESI+
344	8,95	403,33	4 4-Diaponeurosporene	Terpenoid	C30H42	-3,31	84,72	1E-03	M+H	ESI+
345	9,06	495,34	Capsidiol	Terpenoid	C15H24O2	-2,60	84,46	7E-04	2M+Na	ESI+
346	12,81	140,07	L-Valine	Amino acid	C5H11NO2	0,28	93,87	2E-02	M+Na	ESI+
347	5,27	697,07	3 5-Cyclic AMP	Nucleotid	C10H12N5O6P	-4,21	90,21	7E-06	2M+K	ESI+
348	5,38	528,04	UDP-L-Ara4FN	Carbohydrate	C15H23N3O16P2	1,29	86,38	2E-03	M+H-2H2O	ESI+
349	4,37	187,10	Z-3-Hexen-1-ol acetate	Lipid	C8H14O2	-4,78	91,20	1E-08	M+FA-H	ESI-
350	4,86	577,15	Flavonol 3-O-D-xylosylglucoside	Flavonoid	C26H28O12	-2,52	73,20	1E-04	M+FA-H	ESI-
351	13,17	465,37	24-Hydroxy-beta-amyrin	Terpenoid	C30H50O2	-3,65	91,52	7E-03	M+Na	ESI+
352	6,12	639,20	Salidroside	Amino acid	C14H20O7	-2,44	87,67	6E-03	2M+K	ESI+
353	6,89	663,24	PR-toxin	Terpenoid	C17H20O6	-1,49	81,91	2E-03	2M+Na	ESI+
354	2,83	429,18	Indole-3-butyric acid	Hormone	C12H13NO2	-0,91	96,68	2E-03	2M+Na	ESI+
355	5,42	833,41	vincalokoblastine	Alkaloid	C46H58N4O9	3,55	83,50	2E-03	M+Na	ESI+
356	6,19	613,27	Galanthamine	Alkaloid	C17H21NO3	-1,28	94,31	4E-06	2M+K	ESI+
357	3,44	173,01	Citrate	Carbohydrate	C6H8O7	-3,71	92,38	1E-02	M-H2O-H	ESI-
358	3,97	123,08	Phenylethyl alcohol	Amino acid	C8H10O	-0,83	91,45	4E-02	M+H	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

359	5,23	747,34	4 21-dehydrogeissoschizine	Alkaloid	C21H23N2O3	2,27	85,47	4E-04	2M+FA-H	ESI-
360	4,86	516,12	2-Hydroxypropyl-ThPP	Carbohydrate	C15H25N4O8P2S	1,03	88,18	4E-03	M+CH3OH+H	ESI+
361	5,13	747,34	4 21-Dehydrocorynantheine aldehyde	Alkaloid	C21H23N2O3	3,38	94,08	5E-05	2M+FA-H	ESI-
362	11,17	525,37	Sphingomyelin	Lipid	C24H49N2O6P	2,04	59,70	7E-03	M+CH3OH+H	ESI+
363	4,98	279,11	Indole	Amino acid	C8H7N	-4,78	91,35	6E-06	2M+FA-H	ESI-
364	4,97	297,12	Phosphoguanidinoacetate	Amino acid	C10H18N4O5	2,34	91,31	5E-08	M+H-2H2O, M+Na	ESI+
365	4,98	677,40	Gibberellin A12 aldehyde	Terpenoid	C20H28O3	-1,87	79,81	4E-07	2M+FA-H	ESI-
366	5,18	649,29	N1 N5 N10-Tricaffeoyl spermidine	Phenylpropanoi d	C34H37N3O9	-1,01	92,64	2E-09	M+NH4	ESI+
367	0,51	161,06	1-3 4-Dihydroxyphenyl-1-decene-3 5-dione	Phenylpropanoi d	C16H20O4	-4,19	90,87	1E-04	M+2Na	ESI+
368	4,97	293,13	2-Phenylacetamide	Amino acid	C8H9NO	-2,56	98,51	5E-03	2M+Na	ESI+
369	3,04	490,28	trans-Dodec-2-enoyl-acp	Lipid	C12H21OS	3,61	90,75	2E-02	2M+ACN+Na	ESI+
370	4,47	794,34	Aclacinomycin N	Terpenoid	C42H55NO15	-1,59	75,94	3E-03	M-H2O-H	ESI-
371	3,08	300,11	trans-Hex-2-enoyl-acp	Lipid	C6H9OS	4,57	55,05	3E-03	2M+ACN+H M+H-2H2O,	ESI+
372	4,19	287,05	Leucodelphinidin	Flavonoid	C15H14O8	-2,11	98,81	2E-02	M+NH4	ESI+
373	4,46	415,34	Phylloquinone	Terpenoid	C31H46O2	4,69	81,42	2E-06	M+H-2H2O	ESI+



**Supplemental Table S2. Exact position of the 224 metabolites of Bintje genotype represented by the heatmap (Fig. S2). Read from top to bottom.**

*Each metabolite is described by retention time, metabolic unit (m/z), identification, class, chemical formula, error ppm ( $\pm 5$ ), isotope similarity, p-value ( $< 0.05$ ) and ionization.*

Position on heatmap	Retention time	m/z	Metabolite	Class	Chemical formula	Error ppm	Isotope Similarity	Adducts	p-value	Ionization
1	3,14	490,17	7-Aminomethyl-7-carbaguanine	Folate	C7H9N5O	0,01	90,78	2M+FA-H	0,00	ESI-
2	5,25	615,35	Astaxanthin diester	Terpenoid	C42H50O6	0,32	80,62	M+H-2H2O	0,02	ESI+
3	1,91	253,13	8-propyloxycaffeine	Phenylpropanoid	C11H16N4O3	-1,63	67,85	M+H	0,01	ESI+
4	9,97	194,12	Tryptophol	Amino acid	C10H11NO	-3,97	93,43	M+CH3OH+H	0,00	ESI+
5	9,83	301,14	L-Histidinal	Amino acid	C6H9N3O	4,36	96,28	2M+Na	0,00	ESI+
6	8,89	294,24	Stearidonic acid	Lipid	C18H28O2	-3,27	74,30	M+NH4	0,03	ESI+
7	2,30	384,11	Traumatinal	Lipid	C5H8N2O4	2,07	93,50	2M+ACN+Na	0,00	ESI+
8	12,81	140,07	L-Valine	Amino acid	C5H11NO2	0,28	93,87	M+Na	0,00	ESI+
9	4,96	737,36	Veratridine	Alkaloid	C36H51NO11	-0,93	65,62	M+ACN+Na	0,02	ESI+
10	2,30	252,07	N-Formimino-L-aspartate	Amino acid	C3H5O4	4,57	97,58	2M+ACN+H	0,00	ESI+
11	1,08	153,04	Xanthine	Alkaloid	C5H4N4O2	-3,06	85,12	M+H	0,00	ESI+
12	0,55	247,14	D-Octopine	Amino acid	C9H18N4O4	-3,97	96,52	M+H	0,00	ESI+
13	4,49	600,33	all-trans-hexaprenyl diphosphate	Terpenoid	C30H52O7P2	3,23	89,84	2M+3H2O+2H	0,00	ESI+
14	3,08	336,19	Octadecenoyl-[acp]	Lipid	C18H33OS	4,79	93,75	M+K	0,00	ESI+
15	0,54	867,24	Pelargonidin 3-glucoside	Flavonoid	C21H21O10	1,14	89,94	2M+H	0,00	ESI+
16	3,16	278,07	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin	Folate	C9H15N5O3	-0,56	88,41	M+K-2H	0,00	ESI-
17	7,95	215,16	Butyraldehyde	Carbohydrate	C4H8O	-1,55	96,47	3M-H	0,00	ESI-

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

18	2,49	307,09	S-Succinyldihydrolipoamide-E	Carbohydrate	C12H20NO4S2	-0,69	78,01	M+H	0,00	ESI+
19	0,55	539,14	Cellodextrin	Carbohydrate	C18H32O16	-2,36	88,75	M+Cl	0,00	ESI-
20	5,43	632,04	GDP-4-dehydro-D-rhamnose	Carbohydrate	C16H23N5O15P2	-0,63	86,29	M+2Na-H	0,00	ESI+
21	2,83	429,18	Indole-3-butyric acid	Hormone	C12H13NO2	-0,91	96,68	2M+Na	0,00	ESI+
22	2,49	294,06	Dihydroneopterin	Folate	C9H13N5O4	-0,13	97,49	M+K	0,01	ESI+
23	8,95	403,33	4',4-Diaponeurosporene	Terpenoid	C30H42	-3,31	84,72	M+H	0,00	ESI+
24	5,86	531,15	L-Arginine phosphate	Amino acid	C6H15N4O5P	1,21	66,56	2M+Na	0,01	ESI+
25	9,16	235,17	Germacrene A acid	Terpenoid	C15H22O2	-2,22	89,57	M+H	0,00	ESI+
26	4,37	187,10	(Z)-3-Hexen-1-ol acetate	Lipid	C8H14O2	4,78	91,20	M+FA-H	0,00	ESI-
27	6,28	884,07	Oxalyl-CoA	Carbohydrate	C23H36N7O19P3 S	3,48	87,41	M+2Na-H	0,01	ESI+
28	1,70	137,05	Hypoxanthine	Alkaloid	C5H4N4O	1,17	93,14	M+H	0,01	ESI+
29	5,85	378,01	1-5-Phospho-D-ribosyl-5-amino-4-imidazolecarboxylate	Nucleotid	C9H14N3O9P	-2,78	93,75	M+NH4,M+K,2M+K	0,01	ESI+
30	5,85	777,10	Calcitrol	Terpenoid	C22H35N7O17P3 S	-4,37	83,63	M+H-H2O	0,03	ESI+
31	8,87	369,24	10beta-Hydroxytaxa-420 11-dien-5alpha-yl acetate	Terpenoid	C22H34O3	0,18	95,55	M+Na	0,02	ESI+
32	6,70	675,41	ent-7-hydroxykaur-16-en-19-oic acid	Terpenoid	C20H30O3	4,52	95,26	2M+K	0,03	ESI+
33	6,43	671,39	Lobelanine	Alkaloid	C22H25NO2	4,65	78,05	2M+H	0,02	ESI+
34	5,61	569,04	D-Xylonate	Carbohydrate	C5H9O6	-3,70	95,44	2M+K	0,02	ESI+
35	5,18	649,29	N1,N5,N10-Tricaffeoyl spermidine	Phenylpropanoid	C34H37N3O9	-1,01	92,64	M+NH4	0,00	ESI+
36	4,84	561,29	Atractyloside D	Alkaloid	C27H46O12	-2,20	72,27	M-H	0,00	ESI-
37	4,97	297,12	N2-Succinyl-L-arginine	Amino acid	C10H18N4O5	2,34	91,31	M+H-2H2O, M+Na	0,00	ESI+

38	0,51	161,06	1-3,4-Dihydroxyphenyl-1-decene-3,5-dione	Phenylpropanoid	C16H20O4	-4,19	90,87	M+2Na	0,00	ESI+
39	4,97	293,13	2-Phenylacetamide	Amino acid	C8H9NO	-2,56	98,51	2M+Na	0,00	ESI+
40	5,88	629,26	Sinapyl alcohol	Phenylpropanoid	C11H14O4	-0,03	83,87	3M-H	0,00	ESI-
41	4,98	585,23	Baccatin III	Terpenoid	C31H38O11	0,41	88,38	M-H	0,00	ESI-
42	4,98	279,11	Indole	Amino acid	C8H7N	-4,78	91,35	2M+FA-H	0,00	ESI-
43	4,98	617,26	Hordatine B-like compounds	Amino acid	C36H40N2O6	-4,63	88,66	M+Na-2H	0,00	ESI-
44	3,20	734,32	Scopolin	Phenylpropanoid	C40H47NO12	4,04	79,44	M+H	0,00	ESI+
45	4,98	677,40	Gibberellin A12 aldehyde	Hormone	C20H28O3	-1,87	79,81	2M+FA-H	0,00	ESI-
46	0,50	329,09	L-methionine S-oxide	Amino acid	C5H11NO3S	3,64	88,92	2M-H	0,00	ESI-
47	3,92	504,19	Alangiside	Alkaloid	C25H31NO10	-1,99	86,78	M-H	0,00	ESI-
48	4,64	775,70	Tetracosanoic acid	Lipid	C24H48O2	4,22	76,47	2M+K	0,01	ESI+
49	6,21	617,22	Bisdemethoxycurcumin	Phenylpropanoid	C19H16O4	2,82	98,36	2M+H	0,00	ESI+
50	3,47	328,12	Melicopicine	Alkaloid	C18H19NO5	-3,11	85,86	M-H	0,00	ESI-
51	1,83	203,14	Pseudoecgonine	Alkaloid	C9H15NO3	-2,89	98,60	M+H, M+NH4	0,00	ESI+
52	3,35	490,17	Demethylalangiside	Alkaloid	C24H29NO10	-2,43	82,08	M-H	0,00	ESI-
53	6,27	778,18	Cyanidin 3-O-beta-D-sambubioside	Flavonoid	C36H37O18	3,78	80,24	M+Na-2H	0,00	ESI-
54	2,64	160,08	indol-3-ylacetaldehyde	Amino acid	C10H9NO	-1,87	89,20	M+H	0,03	ESI+
55	2,16	173,01	Citrate	Carbohydrate	C6H8O7	-3,51	92,09	M-H2O-H	0,01	ESI-
56	13,29	399,35	Dodecanoic acid	Lipid	C12H24O2	-2,89	88,18	2M-H	0,01	ESI-
57	9,47	277,18	6-Gingerol	Phenylpropanoid	C17H26O4	-1,49	89,13	M+H-H2O	0,00	ESI+
58	5,38	528,04	UDP-L-Ara4FN	Carbohydrate	C15H23N3O16P2	1,29	86,38	M+H-2H2O	0,02	ESI+
59	4,63	597,21	Pelargonidin 3-O-rutinoside	Flavonoid	C27H31O14	3,03	96,50	M+NH4	0,01	ESI+
60	4,64	299,11	THF-L-glutamate	Folate	C24H30N8O9	4,69	91,91	M+H+Na	0,00	ESI+
61	5,17	797,28	S-adenosyl-L-methionine	Amino acid	C15H23N6O5S	2,24	92,32	2M-H	0,00	ESI-
62	1,74	399,17	Isopentenyl adenosine	Terpenoid	C15H21N5O4	-2,12	87,09	M+ACN+Na	0,04	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

63	3,31	368,02	2,3-Cyclic AMP	Nucleotid	C10H12N5O6P	4,64	95,52	M+K	0,03	ESI+
64	3,28	326,10	Terrestriamide	Phenylpropanoid	C18H19NO6	-3,00	84,55	M-H2O-H	0,00	ESI-
65	6,15	617,22	Ophthalmate	Amino acid	C11H19N3O6	2,28	93,57	2M+K	0,00	ESI+
66	12,54	619,42	9(S)-HpOTrE	Lipid	C18H30O4	-2,38	85,10	2M-H	0,00	ESI-
67	3,14	490,17	Demethylisoalangsine	Alkaloid	C24H29NO10	-2,20	94,76	M-H	0,00	ESI-
68	3,84	474,18	Codeine-6-glucuronide	Alkaloid	C24H29NO9	-1,46	95,55	M-H	0,00	ESI-
69	4,04	462,18	Morphine-3-glucuronide	Alkaloid	C23H27NO9	-1,31	94,16	M+H, M+Na	0,00	ESI+
70	4,47	812,36	Crinine	Alkaloid	C16H17NO3	4,02	91,86	3M-H	0,00	ESI-
71	4,16	312,12	N-feruloyltyramine	Phenylpropanoid	C18H19NO4	-3,27	81,14	M-H	0,00	ESI-
72	4,41	360,11	Dehypoxanthine futasine	Terpenoid	C14H16O7	3,36	94,32	M+ACN+Na	0,00	ESI+
73	5,70	742,31	Gibberellin A8-catabolite	Terpenoid	C19H22O7	-1,39	86,28	2M+NH4	0,01	ESI+
74	4,42	314,10	Hippeastrine	Alkaloid	C17H17NO5	-2,97	90,57	M-H	0,00	ESI-
75	6,27	778,18	Pelargonidin 3-O-rutinoside 5-O-beta-D-glucoside	Flavonoid	C33H41O19	3,68	82,63	M+K-2H	0,00	ESI-
76	4,02	598,21	Naringin	Flavonoid	C27H32O14	-4,15	74,37	M+NH4	0,00	ESI+
77	6,61	661,09	GDP-D-mannuronate	Carbohydrate	C16H23N5O17P2	-2,58	85,45	M+ACN+H	0,00	ESI+
78	6,27	824,18	Monodemalonylsalvianin	Flavonoid	C39H39O21	0,57	62,19	M-H2O-H	0,00	ESI-
79	5,23	747,34	4,21-dehydrogeissoschizine	Alkaloid	C21H23N2O3	2,27	85,47	2M+FA-H	0,00	ESI-
80	4,41	577,16	Flavonol 3-O-D-xylosylglucoside	Flavonoid	C26H28O12	-2,24	88,60	M+FA-H	0,00	ESI-
81	5,23	747,34	4,21-Dehydrocorynantheine aldehyde	Alkaloid	C21H23N2O3	2,27	85,47	2M+FA-H	0,00	ESI-
82	5,42	833,41	Vincalukoblastine	Alkaloid	C46H58N4O9	3,55	83,50	M+Na	0,00	ESI+
83	5,35	330,13	Longifolonine	Alkaloid	C17H15NO4	-4,96	96,26	M+CH3OH+H	0,00	ESI+
84	4,41	577,16	Naringenin 5,7-di-O-glucoside	Flavonoid	C27H32O15	-1,93	86,98	M-H2O-H	0,00	ESI-
85	3,88	792,32	Gibberellin A8	Terpenoid	C19H24O7	-3,44	75,31	2M+ACN+Na	0,02	ESI+
86	5,27	745,33	Cathenamine	Alkaloid	C21H22N2O3	3,83	84,22	2M+FA-H	0,00	ESI-

87	4,67	328,12	3-Epimacronine	Alkaloid	C18H19NO5	-3,13	89,44	M-H	0,00	ESI-
88	12,01	415,30	4',4-Diaponeurosporenic acid	Terpenoid	C30H40O2	-3,58	86,56	M+H-H2O	0,00	ESI+
89	2,22	289,16	Feruloylagmatine	Amino acid	C15H22N4O3	-4,90	97,76	M+H-H2O	0,00	ESI+
90	4,83	760,21	Delphinidin 5-O-beta-D-glucoside 3-O-beta-D-sambubioside	Flavonoid	C32H39O21	2,85	62,29	M+H	0,00	ESI+
91	4,32	399,12	Xanthohumol	Flavonoid	C21H22O5	-0,52	89,48	M+2Na-H	0,00	ESI+
92	5,86	758,19	Digalacturonate	Carbohydrate	C12H18O13	3,91	58,88	2M+NH4	0,00	ESI+
93	5,28	649,29	UDP-N-acetylbacillosamine	Carbohydrate	C17H23NO4	-1,13	94,33	2M+K	0,00	ESI+
94	4,62	387,16	Caffeine	Phenylpropanoid	C8H10N4O2	3,87	89,93	2M-H	0,00	ESI-
95	11,67	708,47	1-Hydroxy-gamma-carotene glucoside ester	Terpenoid	C47H67O7	-0,12	70,68	M+H-2H2O	0,00	ESI+
96	6,10	671,23	3-hydroxy-L-kynurenine	Amino acid	C10H12N2O4	3,32	96,81	3M-H	0,00	ESI-
97	4,56	721,27	3-Methoxytyramine-beta-xanthin	Amino acid	C18H20N2O6	-2,75	84,09	2M+H	0,00	ESI+
98	3,00	229,10	Formyl-N-acetyl-5- methoxykynurenamine	Amino acid	C13H16N2O4	-1,73	93,54	M+H-2H2O	0,00	ESI+
99	4,90	678,11	Myricetin	Flavonoid	C15H10O8	4,25	83,39	2M+ACN+H	0,02	ESI+
100	5,37	795,24	Kaempferol 3-sophorotrioside	Flavonoid	C33H40O21	-2,32	86,43	M+NH4	0,00	ESI+
101	0,86	346,05	N-Acetyl-D-glucosamine6- phosphate	Carbohydrate	C10H14N5O7P	-3,89	86,57	M-H	0,01	ESI-
102	12,32	465,30	Costunolide	Terpenoid	C15H20O2	1,33	94,53	2M+H	0,00	ESI+
103	1,27	604,07	GDP-L-gulose	Carbohydrate	C16H25N5O16P2	-1,80	79,29	M-H	0,00	ESI-
104	13,67	565,40	Canthaxanthin	Terpenodi	C40H52O2	-2,16	86,39	M+H	0,02	ESI+
105	1,80	168,07	Phenylglyoxylate	Amino acid	C8H6O3	-2,48	91,63	M+NH4	0,00	ESI+
106	5,32	671,20	Sinapic acid	Phenylpropanoid	C11H12O5	0,95	94,17	3M-H	0,01	ESI-
107	5,06	583,14	Arbutin	Carbohydrate	C12H16O7	-2,76	94,30	2M+K	0,04	ESI+
108	5,28	608,13	6S-6-hydroxyhyoscyamine	Alkaloid	C17H28N4O15P2	-4,80	78,89	M+NH4	0,03	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

109	13,60	806,53	2S-Deoxymyxol 2-2,4-di-O-methyl-alpha-L-fucoside	Terpenoid	C48H70O6	-2,18	96,98	M+ACN+Na	0,00	ESI+
110	2,01	137,02	3,4-Dihydroxybenzaldehyde	Phenylpropanoid	C7H6O3	-2,28	92,06	M-H	0,00	ESI-
111	2,00	299,08	Salicylate beta-D-glucose ester	Phenylpropanoid	C13H16O8	-2,76	85,38	M-H	0,00	ESI-
112	4,91	760,22	Quercetin 3-2G-xylosylrutinoside	Flavonoid	C32H38O20	-4,83	65,76	M+H-H2O, M+NH4	0,00	ESI+
113	1,06	276,99	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclic diphosphate	Terpenoid	C5H12O9P2	-3,68	92,60	M-H	0,00	ESI-
114	4,26	207,14	Methyl jasmonate	Lipid	C13H20O3	-1,56	89,53	M+H-H2O	0,02	ESI+
115	4,99	387,14	2-Descarboxy-betanidin	Amino acid	C17H17N2O6	2,12	96,26	M+ACN+H	0,00	ESI+
116	11,87	559,31	3-Oxotetradecanoyl-[acp]	Lipid	C14H25O2S	-3,50	83,81	2M+FA-H	0,01	ESI-
117	5,24	777,28	Allocriptopine	Alkaloid	C21H23NO5	-4,37	94,91	2M+K	0,00	ESI+
118	4,24	587,17	S-Indolylmethylthiohydroximoyl-L-cysteine	Amino acid	C13H15N3O3S	-3,46	83,77	2M+H	0,02	ESI+
119	6,15	617,35	Glycosyl-4',4-diaponeurosporenoate	Terpenoid	C36H50O7	4,36	76,18	M+Na	0,00	ESI+
120	3,95	189,07	4-Guanidinobutanamide	Amino acid	C5H12N4O	1,36	96,89	M+2Na-H	0,00	ESI+
121	0,56	244,09	Coniferyl alcohol	Phenylpropanoid	C10H12O3	-1,70	94,21	M+ACN+Na	0,00	ESI+
122	10,49	703,40	Isonuatigenin 3-rhamnosyl-1-2-glucoside	Terpenoid	C39H62O13	-0,96	96,67	M+H-2H2O	0,00	ESI+
123	5,23	383,33	Calcidiol	Terpenoid	C27H44O2	-4,09	94,23	M+H-2H2O, M+H-H2O, M+H	0,00	ESI+
124	3,61	672,19	Raloxifene-6-glucuronide	Flavonoid	C34H35NO10S	1,17	78,99	M+Na, M+K	0,00	ESI+
125	4,20	850,49	Solamargine	Alkaloid	C45H73NO15	-0,67	99,19	M+H-H2O	0,00	ESI+
126	4,65	513,10	(-)-Maackiain-3-O-glucosyl-6-O-malonate	Flavonoid	C23H24O12	2,17	85,98	M+Na-2H	0,01	ESI-
127	5,48	383,33	7-Dehydrodesmosterol	Terpenoid	C27H42O	-4,66	92,11	M+H-H2O, M+H	0,00	ESI+

128	5,34	381,31	Secaliferol	Terpenoid	C27H44O3	-4,67	95,36	M+H-2H2O	0,00	ESI+
129	4,31	603,20	Syringaresinol-O-beta-D-glucoside	Phenylpropanoid	C28H36O13	-3,06	93,56	M+Na, M+K	0,00	ESI+
130	3,21	729,16	Kaempferide 3-rhamnoside-7-(6-succinylglucoside)	Flavonoid	C32H36O18	-4,34	74,81	M+Na-2H	0,01	ESI-
131	3,42	339,11	2-Isopropylmaleate	Amino acid	C7H10O4	0,93	88,63	2M+Na	0,00	ESI+
132	2,98	313,07	3,7-Di-O-methylquercetin	Flavonoid	C17H14O7	-0,17	94,22	M+H-H2O	0,01	ESI+
133	3,35	575,17	cyclo-Dopa-glucuronylglucoside	Amino acid	C21H27NO15	1,57	79,79	M+ACN+H	0,00	ESI+
134	4,01	412,32	Cyclopamine	Alkaloid	C27H41NO2	-1,48	98,87	M+H	0,00	ESI+
135	3,26	337,09	Gentiopicrin	Terpenoid	C16H18O8	-2,87	93,21	M-H	0,00	ESI-
136	3,44	337,09	4-p-Coumaroylquinic acid	Phenylpropanoid	C16H18O8	-2,82	97,55	M-H	0,00	ESI-
137	6,22	747,39	Autumnaline	Alkaloid	C21H27NO5	4,86	90,93	2M+H	0,00	ESI+
138	5,50	397,31	6-Geranylgeranyl-2-methylbenzene-1,4-diol	Terpenoid	C27H40O2	-4,66	74,11	M+H	0,00	ESI+
139	5,08	559,14	Rhoifolin	Flavonoid	C27H30O14	-1,41	92,99	M-H2O-H	0,01	ESI-
140	5,05	530,38	6alpha-Hydroxy-castasterone	Terpenoid	C28H50O5	2,33	90,44	M+ACN+Na	0,03	ESI+
141	0,54	355,09	D-glucono-1,5-lactone	Carbohydrate	C6H10O6	-3,93	96,66	2M-H	0,00	ESI-
142	3,93	188,09	Ethane-1,2-diol	Carbohydrate	C2H6O2	-2,48	82,35	2M+ACN+Na	0,00	ESI+
143	3,44	337,09	p-Coumaroyl quinic acid	Phenylpropanoid	C16H18O8	-2,82	97,55	M-H	0,00	ESI-
144	8,28	529,28	Abscisate	Terpenoid	C15H20O4	-4,58	96,57	2M+H	0,00	ESI+
145	2,87	539,14	2-Methyl-1-hydroxypropyl-ThPP	Amino acid	C16H27N4O8P2 S	-1,28	88,65	M+ACN+H	0,01	ESI+
146	0,76	341,11	Cellobiose	Carbohydrate	C12H22O11	-2,91	85,39	M-H	0,00	ESI-
147	2,90	833,23	Daidzin	Flavonoid	C21H20O9	0,55	95,46	2M+H	0,03	ESI+
148	5,78	780,42	Corydaline	Alkaloid	C22H27NO4	4,26	93,88	2M+ACN+H	0,00	ESI+
149	3,60	866,16	2-Methylacetoacetyl-CoA	Amino acid	C26H42N7O18P3 S	-2,92	66,65	M+H	0,04	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

150	4,46	415,34	Phylloquinone	Terpenoid	C31H46O2	4,69	81,42	M+H-2H2O	0,01	ESI+
151	4,65	191,06	L-Quinate	Amino acid	C7H12O6	-4,66	91,28	M-H	0,00	ESI-
152	5,19	690,45	3-Oxo-octadecanoyl-[acp]	Lipid	C18H33O2S	-3,97	91,58	2M+ACN+Na	0,00	ESI+
153	5,85	415,32	Acyl-CoA	Lipid	C27H44O4	-4,81	93,43	M+H-H2O	0,00	ESI+
154	4,58	414,34	Solasodine	Alkaloid	C27H43NO2	-2,77	97,31	M+H	0,00	ESI+
155	3,33	297,11	p-Coumaraldehyde	Phenylpropanoid	C9H8O2	-3,62	90,29	2M+H	0,01	ESI+
156	3,21	353,14	Gibberellin A4	Hormone	C19H24O5	1,76	80,33	M+Na-2H	0,01	ESI-
157	5,01	515,12	1,3-Dicaffeoylquinic acid	Phenylpropanoid	C25H24O12	-1,95	85,93	M-H	0,00	ESI-
158	3,55	898,48	Paspalicine	Terpenoid	C27H31NO3	0,86	85,54	2M+ACN+Na	0,00	ESI+
159	5,49	885,48	Deltonin	Terpenoid	C45H72O17	-3,89	89,82	M+H	0,00	ESI+
160	3,48	135,04	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde	Alkaloid	C8H8O3	-0,48	91,06	M+H-H2O	0,00	ESI+
161	3,73	391,10	5-O-Feruloylquinic acid	Phenylpropanoid	C17H20O9	-4,09		M+H, M+Na, M+K	0,00	ESI+
162	5,08	559,14	Vitexin 2-O-beta-L-rhamnoside	Flavonoid	C27H30O14	-1,41	92,9898585	M-H2O-H	0,01	ESI-
163	4,98	412,36	5,7,22,24,28-Ergostatetraenol	Terpenoid	C28H42O	-3,98	98,9199766	M+NH4	0,01	ESI+
164	3,20	377,08	3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol	Terpenoid	C16H18O9	-3,50	96,6789117	M+Na, M+K, 2M+Na	0,00	ESI+
165	11,33	311,16	Gibberellin A24	Terpenoid	C20H26O5	-3,19	82,7811466	M+H-2H2O	0,02	ESI+
166	7,55	772,49	Hydroxychlorobactene glucoside ester	Terpenoid	C47H63O7	4,77	89,8783189	M+CH3OH+H	0,00	ESI+
167	3,82	499,24	Dehydrodolichol diphosphate	Terpenoid	C25H44O7P2	0,46	77,3586943	M-H2O-H	0,00	ESI-
168	6,23	493,23	Atractyloside A	Alkaloid	C21H36O10	-1,76	80,2067507	M+FA-H	0,00	ESI-
169	9,29	469,28	p-Coumaroylputrescine	Amino acid	C13H18N2O2	-4,31	93,710528	2M+H	0,00	ESI+
170	2,30	254,17	D-glycerate	Carbohydrate	C12H20O3	-3,75	94,5108717	M+ACN+H	0,00	ESI+
171	14,23	841,56	Staphyloxanthin	Terpenoid	C51H78O8	2,68	84,2670979	M+NH4, M+Na, M+K	0,00	ESI+
172	8,63	769,15	N-Acetylmuramate alpha-1-phosphate	Carbohydrate	C11H20NO11P	1,93	96,360374	2M+Na	0,00	ESI+
173	13,02	311,29	Icosenoic acid	Lipid	C20H38O2	-4,52	90,2419481	M+H	0,00	ESI+



174	12,16	828,01	Quercetin 3-sulfate	Flavonoid	C15H10O10S	-2,88	78,7702435	2M+ACN+Na	0,00	ESI+
175	8,28	696,93	Guanosine 3-diphosphate 5-triphosphate	Nucleotid	C10H18N5O20P5	-4,72	55,7285884	2M+3H2O+2H	0,00	ESI+
176	11,83	710,50	6beta,7beta-Dihydroxykaurenoic acid	Terpenoid	C20H30O4	-4,07	85,3782657	M+H-2H2O, 2M+ACN+H	0,00	ESI+
177	9,00	651,37	Ruscopine	Alkaloid	C16H26N4O2	0,07	70,5041409	2M+K	0,00	ESI+
178	14,66	898,09	Malonyl-CoA	Lipid	C24H38N7O19P3 S	4,16	86,6181118	M+2Na-H	0,00	ESI+
179	10,70	587,33	4-Coumaroyl-3-hydroxyagmatine	Phenylpropanoid	C14H21N4O3	1,23	86,8319729	2M+H	0,00	ESI+
180	8,63	800,15	CoA	Lipid	C21H36N7O16P3 S	-1,84	72,3970034	M+CH3OH+H	0,00	ESI+
181	7,55	401,21	Dihydrozeatin-O-glucoside	Terpenoid	C16H25N5O6	-3,06	88,4199816	M+NH4	0,00	ESI+
182	9,94	389,25	2-Amino-3-methylvalerate	Amino acid	C6H12NO2-	-3,36	97,1468942	3M-H	0,00	ESI-
183	0,56	351,10	N-Acetyl-L-aspartate	Amino acid	C6H9NO5	-0,64	98,0746831	2M+H	0,00	ESI+
184	2,50	287,04	5-hydroxy-N-formylkynurenine	Amino acid	C11H12N2O5	-3,27	87,018189	M+Cl	0,00	ESI-
185	10,72	882,05	Bis5-guanosyl tetraphosphate	Nucleotid	C20H28N10O21P 4	1,57	63,6375231	2M+3H2O+2H	0,00	ESI+
186	9,97	570,03	CDP-4-dehydro-3,6-dideoxy-D-glucose epimer	Carbohydrate	C15H23N3O14P2	-4,55	81,2022078	M+K	0,00	ESI+
187	4,55	725,35	Gibberellin A36	Terpenoid	C20H26O6	1,21	96,8293175	2M+H	0,00	ESI+
188	0,57	395,13	Syringin	Phenylpropanoid	C17H24O9	-3,48	91,1884644	M+Na	0,00	ESI+
189	11,78	489,29	Tubulosine	Alkaloid	C29H37N3O3	-3,70	87,7945257	2M+3H2O+2H	0,00	ESI+
190	9,41	651,38	Lactosylceramide	Lipid	C31H56NO13	-4,91	86,3457078	M+H	0,00	ESI+
191	9,69	860,56	Terpendole B	Terpenoid	C27H35NO3	4,91	74,1291182	2M+NH4	0,01	ESI+
193	11,76	679,42	Karavilosides II	Terpenoid	C37H62O8	4,42	90,7499152	M+2Na-H	0,00	ESI+
194	11,00	397,26	Hercynine	Amino acid	C9H16N3O2	-0,74	95,1301935	2M+H	0,00	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

195	9,65	829,44	17-O-deacetylvindoline	Alkaloid	C23H30N2O5	4,09	84,8990751	2M+H	0,00	ESI+
196	12,83	884,58	1-octadecyl-2-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z- eicosapentaenoyl-glycero-3- phospho-1-myoinositol	Lipid	C47H83O12P	2,53	67,2178334	2M+3H2O+2H	0,00	ESI+
197	9,69	609,31	Presqualene diphosphate	Terpenoid	C30H52O7P2	-0,40	72,6815754	M+Na	0,00	ESI+
198	11,68	542,39	Isorenieratene	Terpenoid	C40H48	3,50	81,994927	2M+3H2O+2H	0,00	ESI+
199	9,93	633,39	Capsaicin	Amino acid	C18H27NO3	-3,68	80,5350696	2M+Na	0,00	ESI+
200	12,75	514,86	Undecaprenyl phosphate alpha-L- Ara4FN	Carbohydrate	C61H100NO8P	-3,29	86,7727777	M+H+Na	0,00	ESI+
201	10,63	594,41	Phoenicoxanthin	Terpenoid	C40H52O3	3,12	74,717014	2M+3H2O+2H	0,00	ESI+
202	4,51	300,12	N-caffeoyltyramine	Alkaloid	C17H17NO4	-4,23	77,4694614	M+H	0,00	ESI+
203	4,16	769,37	O-Methylandrocybine	Alkaloid	C21H25NO4	-2,54	94,2640177	2M+Hac-H	0,01	ESI-
204	3,10	332,15	7,8-Dihydropteroate	Folate	C14H14N6O3	-1,04	65,2281821	M+NH4	0,00	ESI+
205	2,17	393,13	S-N-Methylcanadine	Alkaloid	C21H24NO4+	2,78	83,6127459	M+K	0,02	ESI+
206	2,93	302,14	S-6-O-Methylnorlaudanosoline	Alkaloid	C17H19NO4	-1,98	93,2441115	M+H	0,00	ESI+
207	3,28	387,09	Caffeic acid-3-glucoside	Phenylpropanoid	C15H18O9	-1,68	83,5736934	M+FA-H	0,00	ESI-
208	3,22	788,18	Delphinidin 3-glucoside-5-caffoyl- glucoside	Flavonoid	C36H37O20+	0,70	69,8260237	M-H	0,00	ESI-
209	6,76	839,20	5,3,5-Trihydroxy-3,6,7,8,4- pentamethoxyflavone	Flavonoid	C20H20O10	-0,09	93,9415596	2M-H	0,00	ESI-
210	4,65	282,11	N-Phenylacetylphenylalanine	Phenylpropanoid	C17H17NO3	-3,04	87,2133752	M-H	0,00	ESI-
211	3,55	488,16	7,8-Dihydrofolate	Folate	C19H21N7O6	4,11	87,5022597	M+FA-H	0,01	ESI-
212	4,67	328,12	Morphinone	Alkaloid	C17H17NO3	-3,64	90,8619366	M+FA-H	0,00	ESI-
213	4,63	330,13	N-feruloyloctopamine	Phenylpropanoid	C18H19NO5	-4,01	97,2177938	M+H	0,02	ESI+
214	3,47	328,12	P-Coumaroyltyramine	Phenylpropanoid	C18H19NO5	-3,11	85,8581486	M-H	0,00	ESI-
215	5,26	344,15	Phaseic acid	Terpenoid	C15H20O5	2,34	93,7985431	M+ACN+Na	0,00	ESI+

216	6,50	527,29	Feruloylputrescine	Amino acid	C14H20N2O3	-4,20	90,6311661	2M-H	0,01	ESI-
217	14,99	677,96	3-Iodo-L-tyrosine	Amino acid	C9H10INO3	4,90	94,9828246	2M+ACN+Na	0,00	ESI+
218	8,45	696,42	all-trans-heptaprenyl diphosphate	Terpenoid	C35H60O7P2	1,99	73,4608648	M+ACN+H	0,00	ESI+
219	0,55	344,03	Glutathione	Amino acid	C10H17N3O6S	-3,85	85,1167285	M+K-2H	0,00	ESI-
220	6,51	339,25	aphidicolin	Terpenoid	C20H34O4	-3,23	94,3962452	M+H	0,00	ESI+
221	3,35	479,15	Resveratrol	Phenylpropanoid	C14H12O3	1,53	95,9790786	2M+Na	0,04	ESI+
222	12,58	463,38	22R,23R-22,23-Dihydroxy- campest-4-en-3-one	Terpenoid	C28H46O3	-0,75	87,0206283	M+CH3OH+H	0,00	ESI+
223	5,62	161,10	Methyleugenol	Phenylpropanoid	C11H14O2	-0,43	88,3256681	M+H-H2O	0,00	ESI+
224	4,03	391,15	serotonin	Amino acid	C10H12N2O	-4,60	96,9671935	2M+K	0,01	ESI+

**Supplemental Table S3. Regulation of metabolites of alkaloid, phenylpropanoid and flavonoid pathways by the three elicitors.**

The table present a selection of metabolites located in CCF/BABA or Ulva extract/control clusters. Each metabolite is described by pathway, identification, reaction by each elicitor (+ = up-regulation and - = down-regulation), chemical formula, retention time, m/z, error ppm ( $\pm 5$ ), isotope similarity, p-value ( $< 0.05$ ) and ionization obtained by ProgenesisQI. The variation of the regulation is validated by a Tuckey test ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ).

Pathway	Identification	Control	CCF	BABA	Ulva extract	Chemical formula	Retention time	m/z	Error ppm	Isotope Similarity	p-value	Ionization
<b>Alkaloid</b>	Melicopicine	-	+	+	-	C18H19NO5	3.47	328.12	3.11	85.86	8.99E-06	ESI-
	Demethylisoalangsideside	-	+	+	-	C24H29NO10	3.20	490.17	2.09	91.02	9.61E-08	ESI-
	Demethylalangsideside	-	+	+	-	C24H29NO10	3.47	490.17	2.04	88.99	5.15E-07	ESI-
	Hippeastrine	-	+	+	-	C17H17NO5	3.98	314.10	2.52	82.56	1.94E-06	ESI-
	Codeine-6-glucuronide	-	+	+	-	C24H29NO9	3.84	474.18	1.46	95.55	1.20E-06	ESI-
	Morphine-3-glucuronide	-	+	+	-	C23H27NO9	4.04	462.18	1.31	94.16	2.36E-05	ESI+
<b>Phenylpropanoid</b>	Scopoletin	+	-	-	+	C10H8O4	3.62	175.04	1.06	95.46	1.32E-04	ESI+
	Chlorogenic acid	+	-	-	+	C16H18O9	3.49	389.06	3.42	85.05	1.79E-06	ESI-
	Caffeoyl alcohol	+	-	-	+	C9H10O3	4.45	165.05	4.89	96.4	1.83E-05	ESI-
	5-O-Caffeoylshikimic acid	+	-	-	+	C16H16O8	2.98	357.06	4.92	86.05	1.11E-05	ESI-
<b>Flavonoid</b>	Baimeside	+	-	-	+	C27H30O17	3.68	625.14	0.69	96.04	1.21E-05	ESI-
	Rutin	+	-	-	+	C27H30O16	4.03	609.15	0.15	98.36	4.70E-05	ESI-
	Kaempferol 3-sophorotrioside	+	-	-	+	C33H40O21	3.52	771.20	1.12	97.00	2.73E-06	ESI-



**Supplemental Table S4. Specific up-regulation of metabolites to one elicitor.**

The table presents a selection of up-regulated metabolites located into sub-clusters associated to one elicitor (red region). A Tukey test ( $p$ -value $\leq 0.05$ ) confirmed the specificity of the metabolite. Each metabolite is described by retention time, metabolic unit (m/z), identification, class, chemical formula, error ppm ( $\pm 5$ ), isotope similarity, p-value ( $< 0.05$ ) and ionization. Highlight metabolites were cited on the results.

CCF treatment								
Retention time	m/z	Identification	Class	Chemical formula	Error ppm	Isotope Similarity (%)	p-value	Ionization
9.11	347.22	<b>Swainsonine</b>	Alkaloid	C8H15NO3	0.86	94.26	3.09E-04	ESI+
5.35	330.13	Longifolonine		C17H15NO4	4.96	96.26	1.58E-04	ESI+
9.26	328.20	Sarpagine		C19H22N2O2	0.46	85.89	1.83E-05	ESI+
6.12	639.20	Salidroside	Amino acid	C14H20O7	2.44	87.67	3.10E-03	ESI+
3.31	359.13	Hippurate		C9H9NO3	4.89	81.86	1.34E-06	ESI+
9.97	194.12	Tryptophol		C10H11NO	3.97	93.43	2.02E-04	ESI+
0.55	247.14	D-Octopine		C9H18N4O4	3.97	96.52	4.74E-13	ESI+
4.98	617.26	Hordatine B-like compounds		C29H40N8O5	0.45	93.75	9.14E-12	ESI-
5.43	632.04	GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose	Carbohydrate	C16H23N5O15P2	0.63	86.29	9.90E-05	ESI+
5.38	528.04	UDP-L-Ara4FN		C15H23N3O16P2	1.29	86.38	4.74E-03	ESI+
2.49	307.09	S-Succinyldihydrolipoamide-E		C12H20N4O4S2	0.69	78.01	6.08E-12	ESI+
0.55	539.14	<b>Cellodextrin</b>		C18H32O16	2.36	88.75	4.29E-07	ESI-
7.95	215.16	Butyraldehyde		C4H8O	1.55	96.47	2.01E-07	ESI-
0.54	867.24	Pelargonidin 3-glucoside	Flavonoid	C21H21O10	1.14	89.94	3.52E-15	ESI+
4.86	577.15	Flavonol 3-O-D-xylosylglucoside		C26H28O12	2.52	73.20	8.12E-04	ESI-
3.53	558.14	Flavonol 3-O-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucoside		C27H25O13	1.06	82.02	5.85E-06	ESI+
4.17	601.28	Atractyloside G 2-O-β-D-glucopyranoside		C27H46O13	4.75	82.29	2.53E-06	ESI+
4.49	600.33	all-trans-hexaprenyl diphosphate	Folate	C30H52O7P2	3.23	89.84	3.02E-08	ESI+
3.16	278.07	<b>5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin</b>		C9H15N5O3	0.56	88.41	1.37E-10	ESI-
3.08	336.19	Octadecenoyl-[acp]	Lipid	C18H33OS	4.79	93.75	6.75E-08	ESI+
8.89	294.24	Stearidonic acid		C18H28O2	3.27	74.30	5.34E-04	ESI+
4.37	187.10	(Z)-3-Hexen-1-ol acetate		C8H14O2	4.78	91.20	4.87E-11	ESI-

1.08	153.04	<b>Xanthine</b>		C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	3.06	85.12	3.28E-12	ESI+
5.42	713.08	<b>2',3'-Cyclic GMP</b>	Nucleotid	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	1.66	96.72	1.45E-04	ESI+
5.27	697.07	<b>3',5'-Cyclic AMP</b>		C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	4.21	90.21	1.17E-09	ESI+
1.91	253.13	8-propyloxycaffeine	Phenylpropanoid	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1.63	67.85	1.03E-06	ESI+
13.17	465.37	24-Hydroxy-beta-amyrin		C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	3.65	91.52	5.81E-05	ESI+
9.06	495.34	<b>Capsidiol</b>		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	2.60	84.46	7.75E-11	ESI+
8.95	403.33	4,4'-Diaponeurosporene	Terpenoid	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub>	3.31	84.72	1.05E-05	ESI+
6.89	663.24	PR-toxin		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	1.49	81.91	2.85E-04	ESI+
2.75	443.19	Dihydrophaseic acid 4-O-β-D-glucoside		C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	2.39	85.02	4.66E-04	ESI-
2.49	294.06	Dihydroneopterin		C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	0.13	97.49	8.66E-08	ESI+

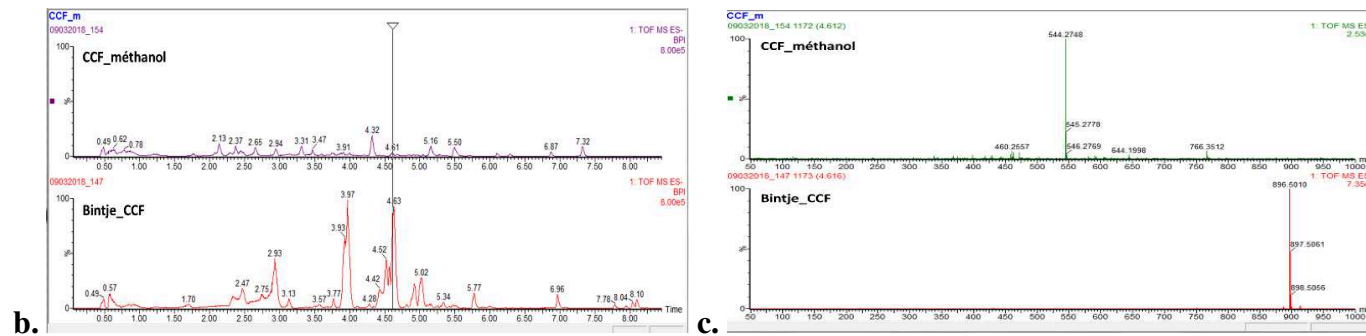
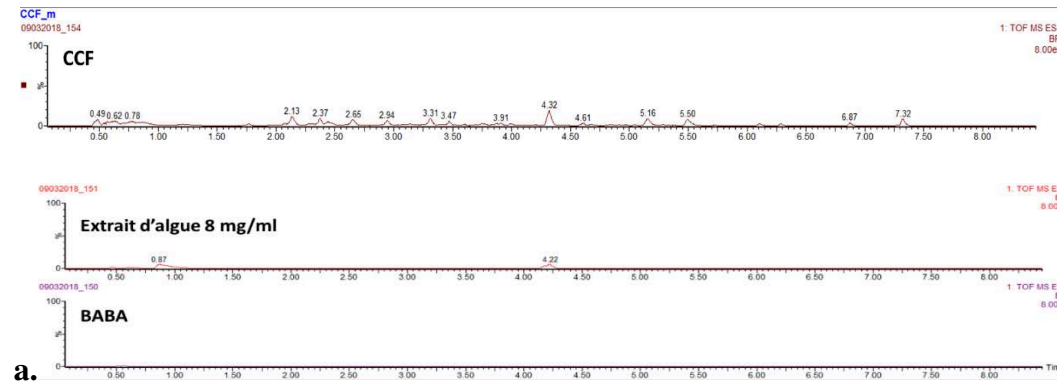
<b>BABA treatment</b>								
<b>Retention time</b>	<b>m/z</b>	<b>Identification</b>	<b>Classe</b>	<b>Chemical formula</b>	<b>Error ppm</b>	<b>Isotope Similarity (%)</b>	<b>p-value</b>	<b>Ionisation</b>
1.83	203.14	Pseudoecgonine	Alkaloid	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-2.89	98.60	1.92E-04	ESI+
9.93	633.39	Capsaicin	Amino acid	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-3.68	80.54	1.37E-10	ESI+
3.69	468.16	THF		C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	3.22	86.15	2.61E-05	ESI+
0.49	406.92	3-Phosphohydroxypyruvate		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	-2.27	81.90	4.74E-04	ESI+
1.33	549.05	<b>UDP-Rhamnose</b>	Carbohydrate	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>16</sub> P <sub>2</sub>	-1.78	81.04	4.60E-07	ESI-
1.27	604.07	<b>GDP-L-gulose</b>		C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>16</sub> P <sub>2</sub>	-1.80	79.29	5.72E-08	ESI-
1.26	565.05	<b>UDP-glucose</b>		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub>	-0.93	94.09	7.66E-09	ESI-
3.55	488.16	<b>7,8-Dihydrofolate</b>	Folate	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	4.11	87.50	3.22E-03	ESI-
4.64	775.70	Tetracosanoic acid	Lipid	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	4.22	76.47	2.08E-03	ESI+

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

<i>Ulva</i> extract treatment								
Retention time	m/z	Identification	Classe	Chemical formula	Error ppm	Isotope Similarity (%)	p-value	Ionisation
11.12	797.44	Deacetoxyvindoline	Alkaloid	C23H30N2O4	-4.59	83.05	4.45E-05	ESI+
8.87	398.34	<b>Solanidine</b>		C27H43NO	-3.81	90.26	6.90E-07	ESI+
5.28	649.29	(6S)-6-hydroxyhyoscyamine		C17H23NO4	-1.13	94.33	6.65E-04	ESI+
5.24	777.28	Allocryptopine		C21H23NO5	-4.37	94.91	1.15E-04	ESI+
0.08	137.02	3,4-dihydroxybenzaldehyde		C7H6O3	0.96	92.06	1.01E-07	ESI-
4.99	387.14	2-Descarboxy-betanidin	Amino acid	C17H17N2O6	2.12	96.26	1.42E-04	ESI+
4.65	191.06	<b>L-quinat</b>		C7H12O6	-4.66	91.28	4.21E-04	ESI-
3.42	339.11	2-Isopropylmaleate		C7H10O4	0.93	88.63	5.45E-07	ESI+
3.00	215.06	Caffeine		C8H10N4O2	1.34	93.40	5.00E-07	ESI-
0.54	355.09	D-glucono-1,5-lactone	Carbohydrate	C6H10O6	-3.93	96.66	3.14E-10	ESI-
0.54	341.11	Cellobiose		C12H22O11	-2.84	96.64	4.26E-08	ESI-
5.39	559.14	<b>Rhoifolin</b>	Flavonoid	C27H30O14	-1.62	75.17	9.36E-06	ESI-
3.61	672.19	Raloxifene-6-glucuronide		C34H35NO10S	1.17	78.99	1.05E-08	ESI+
2.90	833.23	<b>Daidzin</b>		C21H20O9	0.55	95.46	5.96E-08	ESI+
4.36	433.11	<b>Prunin</b>		C21H22O10	-2.28	89.65	2.57E-06	ESI-
3.25	343.08	<b>Ayarin</b>		C18H16O7	-3.13	83.98	3.25E-07	ESI-
3.00	513.10	<b>Malonylglycitin</b>		C25H24O13	-2.33	75.47	9.76E-10	ESI-
3.17	261.17	Traumatic acid	Lipid	C12H20O4	3.09	96.81	8.78E-07	ESI+
11.87	559.31	3-Oxotetradecanoyl-[acp]		C14H25O2S	-3.50	83.81	5.21E-06	ESI-
0.56	244.09	<b>Coniferyl alcohol</b>	Phenylpropanoid	C10H12O3	-1.70	94.21	3.03E-04	ESI+
2.00	299.08	Salicylate beta-D-glucose ester		C13H16O8	-2.76	85.38	9.90E-09	ESI-
3.21	291.17	<b>Scopolin</b>		C16H19NO3	-3.33	91.08	5.21E-07	ESI+
3.68	707.18	<b>Caffeoyl quinic acid</b>		C16H18O9	-4.68	86.27	6.41E-08	ESI-
4.64	515.12	1,3-Dicaffeoylquinic acid		C25H24O12	-1.05	95.01	2.31E-06	ESI-



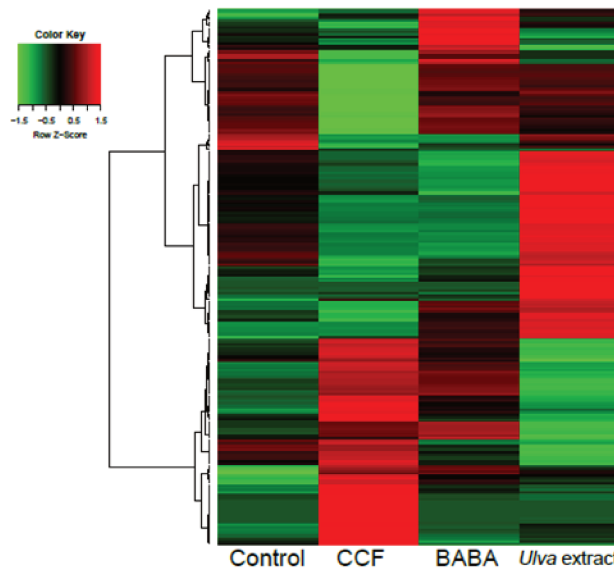
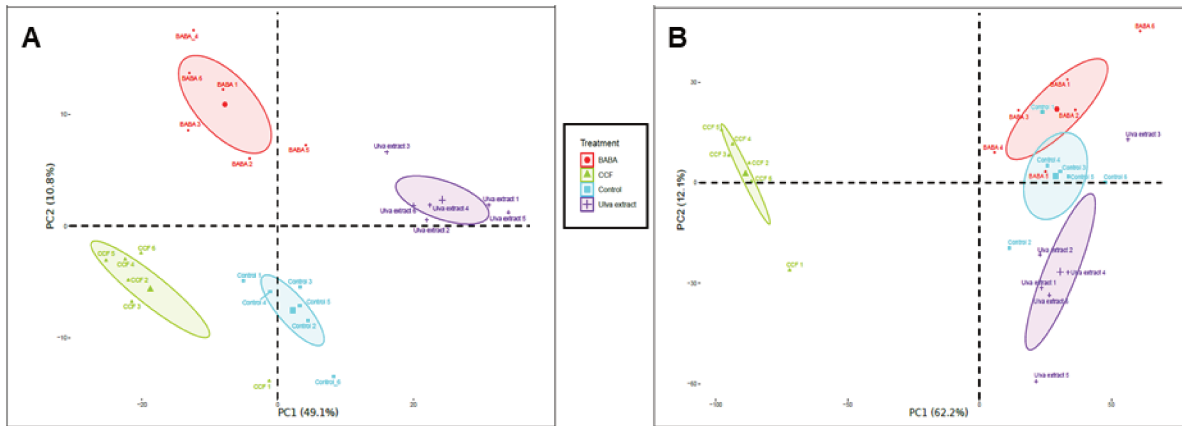
3.44	337.09	<b>p-Coumaroyl quinic acid</b>		C16H18O8	-2.91	97.55	4.59E-08	ESI-
3.26	337.09	<b>4-p-Coumaroylquinic acid</b>		C16H18O8	-2.96	93.21	2.69E-08	ESI-
3.02	179.03	<b>3-(3,5-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid</b>		C9H8O4	-3.47	96.73	4.49E-08	ESI-
12.37	589.47	Phytoene	Terpenoid	C40H64	2.82	80.38	1.22E-04	ESI+
11.74	401.21	10-beta,14-beta-Dihydroxytaxa-4(20),11-dien-5alpha-yl acetate		C22H34O4	1.65	91.99	1.07E-03	ESI+
10.50	745.41	Yamogenin 3-O-neohesperidoside		C39H62O12	-1.42	90.31	4.08E-03	ESI+
10.49	703.40	Isonuatigenin 3-[rhamnosyl-(1->2)-glucoside]		C39H62O13	-0.96	96.67	2.75E-04	ESI+
10.32	461.32	26-hydroxybrassinolide		C28H48O7	-3.34	92.61	3.23E-03	ESI+
10.27	579.39	Torulene		C40H54	-4.84	88.38	1.73E-03	ESI+
11.67	708.47	1'-Hydroxy-gamma-carotene glucoside ester		C47H67O7	-0.12	70.68	2.37E-05	ESI+
3.21	353.14	Gibberellin A4		C19H24O5	1.76	80.33	5.89E-07	ESI-
3.39	337.09	Gentiopiricin		C16H20O9	-2.70	94.22	4.93E-09	ESI-
1.06	276.99	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclic diphosphate		C5H12O9P2	-3.68	92.60	4.46E-09	ESI-



**Supplemental Figure S3. Elicitor solutions analysis in UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup> at ESI-**

(a) The spectrum of elicitor solution. These elicitor samples were analysed as the plant samples with the same extraction protocol and UPLC parameters at ESI- mode.

(b-c) The elicitor peaks with retention time closely to plant peaks were verified and no correspondence was found (eg. Fig S3c).



**Figure 5. Profil métabolique du génotype Bintje sur ESI- et ESI+**

(A-B) Les ACPs montrent tous les pics trouvés par UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. Dans ESI- (A) et ESI+ (B). Les premier et deuxième composés principaux (PC1 et PC2) représentent 59,9% de la variabilité des données dans ESI- et 74,3% dans ESI+. Chaque point représente une plante et chaque couleur est associée à un traitement : le témoin (bleu), le CCF (vert), le BABA (rouge) et l'extrait d'algue (violet). Les ellipses colorées représentent les régions de confiance à 95 % pour chaque traitement.

(C) La heatmap représente l'abondance normalisée des 224 métabolites identifiés d'après la base de données « maison ». Chaque rangée représente un métabolite et les colonnes représentent l'abondance moyenne par traitement. Associé aux lignes, le groupement hiérarchique regroupe les métabolites par la distance basée sur la corrélation calculée avec le coefficient de corrélation de Pearson et la liaison Ward. Les clusters permettent d'identifier visuellement les profils métaboliques spécifiques à chaque traitement en montrant l'effet de régulation positive (rouge), neutre (noir) et négative (vert) des traitements.

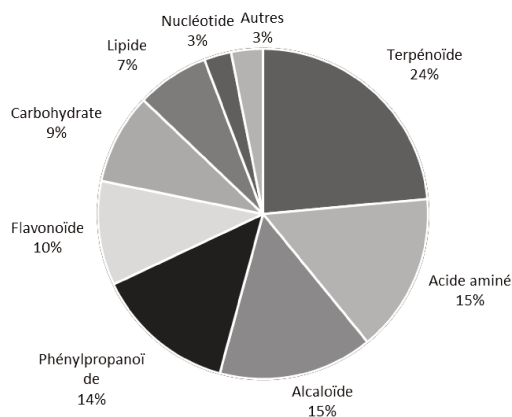
### 2.1 Complément de résultats : L'effet éliciteur est confirmé sur le génotype Bintje

Dans l'article précédent nous avons mis en évidence que la reprogrammation du métabolome du génotype Désirée était éliciteur-dépendante. Comme nous avons mis en évidence un effet génotype fort, il nous a paru intéressant d'étudier l'effet éliciteur dans le génotype Bintje plus sensible à *P. infestans* que Désirée. Un protocole similaire a donc été appliqué au génotype Bintje. Après traitement avec le CCF, le BABA et l'extrait d'*Ulva* à 8mg/ml, les folioles des plantes de Bintje ont été échantillonnées et analysées dans les mêmes conditions expérimentales que celles réalisées pour les plantes de Désirée.

#### *Récapitulatif des résultats obtenus chez Bintje :*

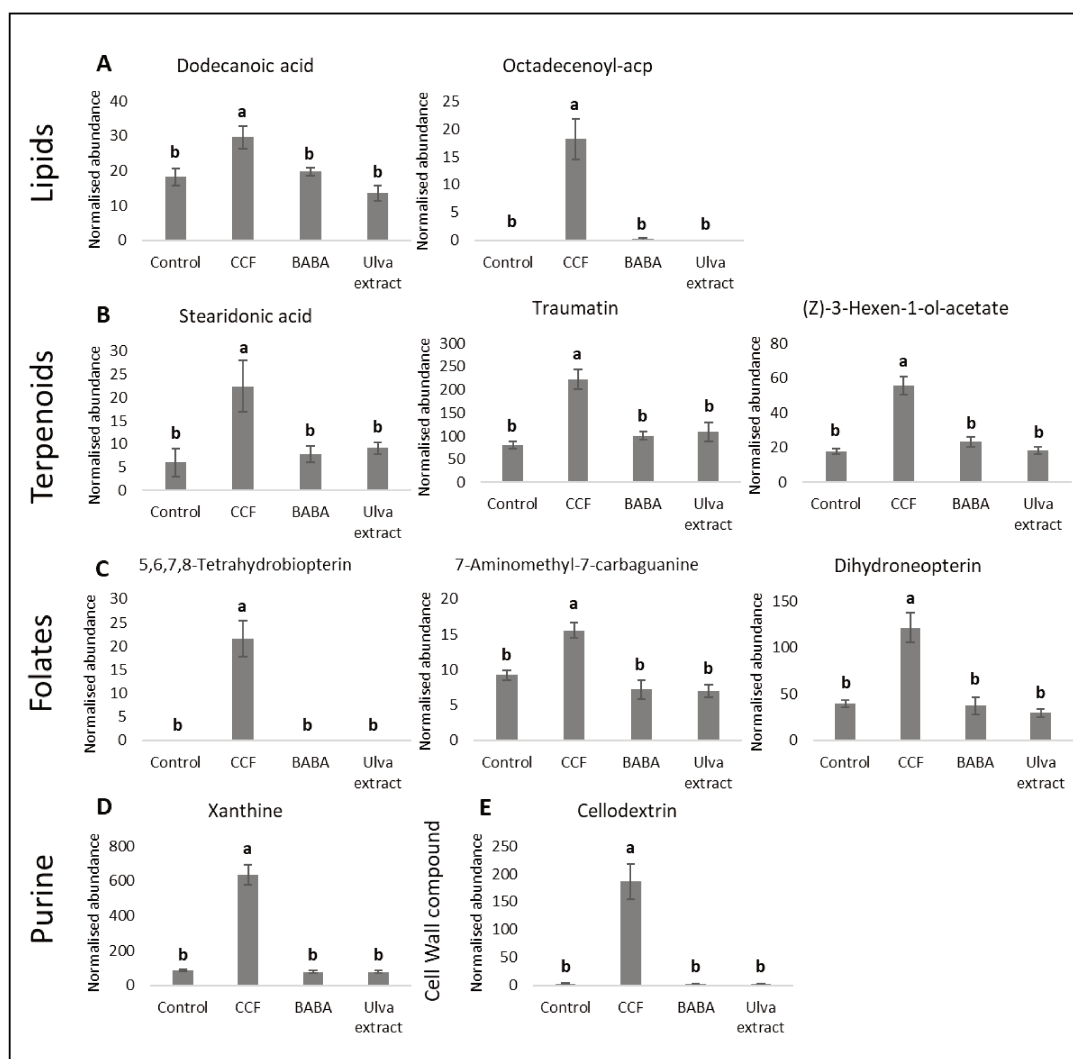
594 pics ont été observées en ESI- et 4484 en ESI+ en utilisant l'UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup> après filtrage par les tests ANOVA ( $\leq 0.05$ ), fold change ( $\geq 2$ ) et q-value ( $< 0.05$ ). Comme pour le génotype Désirée, quatre groupes ont été séparés en ACP, ce qui explique 59,1% en ESI- et 74,3% en ESI+ de la variabilité totale des données (Figure 5A et 5B). À partir de notre base de données, 224 métabolites ont pu être identifiés (Tableau supplémentaire S2 de Martin et al 2019). Ils ont été représentés sous forme d'une heatmap (Figure 5C). Après identification putative des métabolites, chaque éliciteur a induit un profil métabolique spécifique et différent du contrôle. Le traitement par le CCF a conduit à un profil très distinct de celui obtenu avec l'extrait d'*Ulva*. Majoritairement, le groupe de métabolites induit par le CCF est réprimé par l'extrait d'*Ulva* et vice-versa. Le BABA induit un profil intermédiaire plus proche de celui du CCF mais aussi avec des groupes de métabolites régulés en commun avec l'extrait d'*Ulva*. Comme pour Désirée, l'extrait d'*Ulva* présente un profil avec des groupes de métabolites similaires au contrôle, mais aussi des groupes de métabolites qu'il induit spécifiquement (Figure 5C).

Parmi les familles de métabolites identifiés, celles appartenant au métabolisme secondaire sont les plus représentées. Ce sont les terpénoïdes (24%), les alcaloïdes (15%), les phénylpropanoïdes (14%) et les flavonoïdes (10%). Associés au métabolisme primaire sont retrouvés les acides aminés (15%), les carbohydrates (9%), les lipides (7%), les nucléotides et autres métabolites (3% chaque) (Figure 6). Il est intéressant de noter que les résultats obtenus avec le génotype Bintje étaient relativement similaires à ceux obtenus après analyse de l'ensemble de données générées avec le génotype Désirée.



**Figure 6. Familles des 224 métabolites identifiés chez Bintje.**

Le camembert représente les différents pourcentages des métabolites identifiés par famille.



**Figure 7. Métabolites régulés spécifiquement par le CCF**

Les métabolites sont représentés par des histogrammes de l'abondance normalisée. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le test de Tukey HSD ( $p$ -value < 0,05). Les barres représentent l'erreur standard ( $n=6$ ).

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

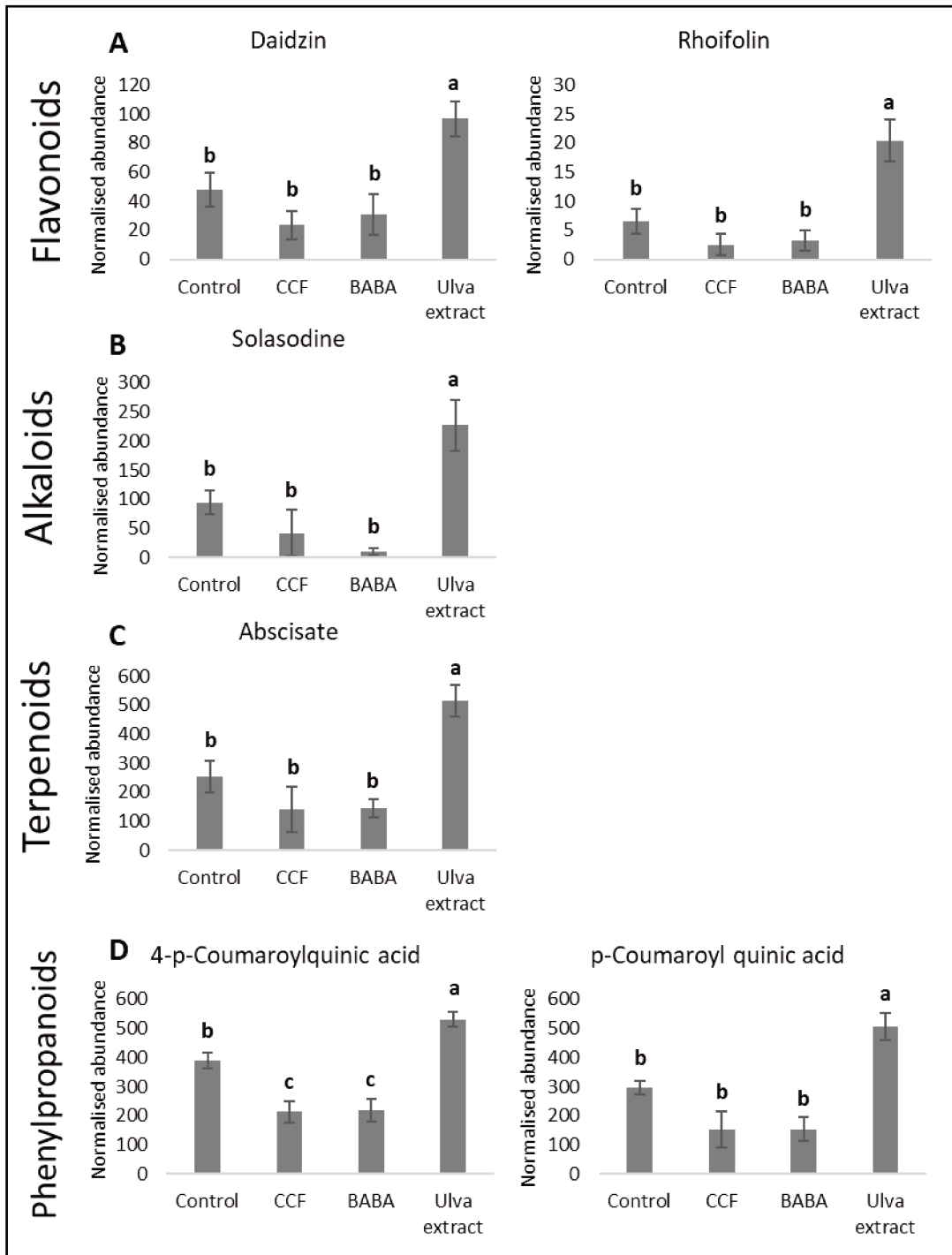
- *Métabolites spécifiques à chaque éliciteur chez Bintje.*

Parmi les 224 métabolites identifiés chez le génotype Bintje après application des éliciteurs, nous avons sélectionné les métabolites spécifiques à chaque traitement avec un test d'ANOVA et Tukey ( $\leq 0,05$ ). L'extrait d'*Ulva* a induit spécifiquement, 32 métabolites, le CCF 28 métabolites et le BABA seulement 4 métabolites.

**Après traitement par le CCF**, la majorité des métabolites spécifiques appartient au métabolisme primaire, comme les acides aminés, les lipides, les folates et les carbohydrates. Concernant les lipides, deux voies ont été identifiées : celle de la biosynthèse des acides gras *via* l'acide dodecanoïque et l'acide octadecenoïl-acp (Figure 7A) et celle du métabolisme de l'acide linoléique *via* l'acide stearidonique, la traumatin et le (Z)-3-Hexen-1-ol acetate (Figure 7B). Le traitement CCF a également induit spécifiquement la voie de biosynthèse des folates dont la production est représentée par : le dihydroneoptérine, le 5,6,7,8-tetrahydromonapterine et le 7-aminométhyl-7-carbaguanine (Figure 7C). En plus, il induit la xanthine du métabolisme de la purine liée à la voie des folates (Figure 7D).

Concernant les carbohydrates, la cellodextrine a été identifiée après traitement par le CCF (Figure 7E). Ce métabolite est considéré comme un DAMPs chez la vigne (Gust *et al.*, 2017).

**Dans le cas du traitement par l'extrait d'*Ulva***, c'est le métabolisme secondaire qui a été le plus induit : Pour les flavonoïdes, 6 métabolites sont spécifiquement induits dont le daidzine et le rhoifoline qui ont été identifiés (Figure 8A). Pour, les alcaloïdes 6 métabolites ont également été induits en particulier, la solasodine, un stérol alcaloïde exclusif de la pomme de terre a été plus accumulé après le traitement par cet éliciteur (Figure 8B). Pour les terpénoïdes, 5 métabolites ont été identifiés dont l'ABA, hormone liée au stress abiotique, qui fait partie de la voie des terpénoïdes et dont la biosynthèse vient des métabolites des caroténoïdes (Figure 8C). Pour les phénylpropanoïdes, 3 métabolites sont plus spécifiquement induits dont les isomères, acide 4-p-coumaroylquinique et acide coumaroylquinique (Figure 8D).



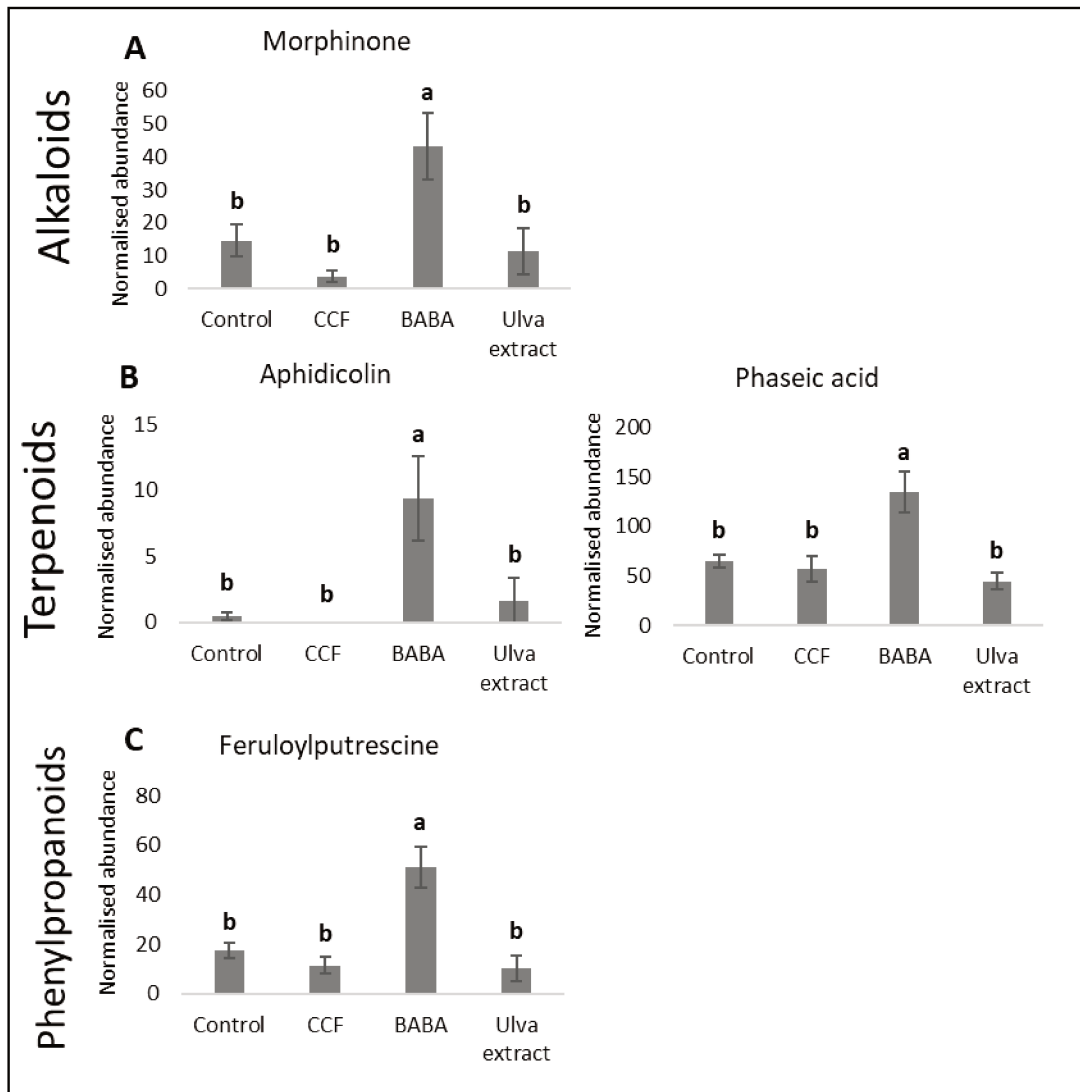
**Figure 8. Métabolites régulés spécifiquement par l'extrait d'Ulva**

L'abondance normalisée des métabolites est représentée par des barres. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le test de Tukey HSD ( $p$ -value < 0,05). Les barres représentent l'erreur standard ( $n=6$ ).

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

**Le traitement par le BABA** a induit spécifiquement 4 métabolites : la morphinone, l'acide phaséique, la feruloylputrescine et l'aphidicoline (Figure 9). La morphinone est un précurseur d'autres métabolites aussi identifiés chez Bintje comme la codeine-6-glucuronide et le morphine-3-glucuronide, mais seule la morphinone est régulée positivement après traitement avec le BABA (Figure 9A). Les autres métabolites de la voie ne sont pas différents du contrôle. Les deux autres métabolites sont l'aphidicolin et l'acide phaséique appartenant à la famille des terpénoïdes. Par exemple, l'acide phaséique appartient à la voie de biosynthèse de l'ABA (Figure 9B). Donc, ces inductions par le traitement BABA sont identifiées de façon isolée indépendamment d'une voie de biosynthèse.





**Figure 9. Métabolites régulés spécifiquement par le BABA**

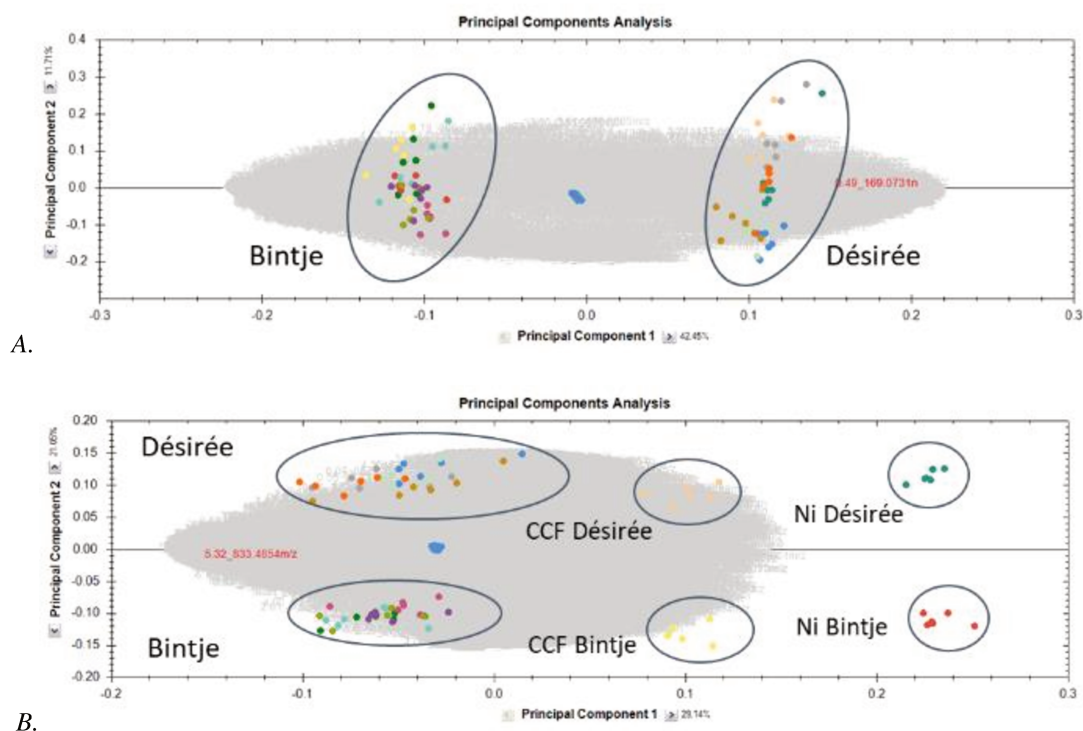
Les métabolites sont illustrés par des histogrammes de l'abondance normalisée. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le test de Tukey HSD ( $p$ -value < 0,05). Les barres représentent l'erreur standard ( $n=6$ ).

### 3. Effet génotype

#### 3.1 L'étude globale de l'interaction entre génotypes et éliciteurs met en évidence un effet fort du génotype

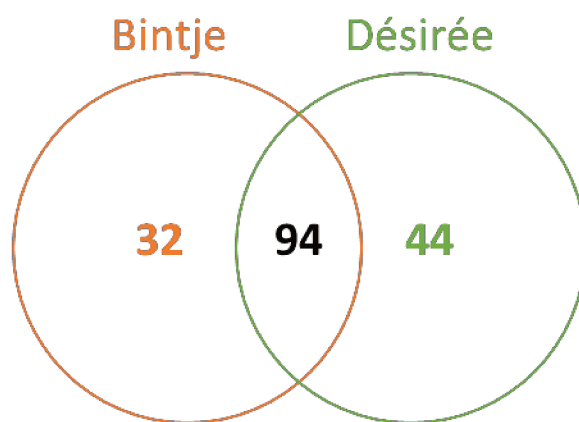
Bien que les deux essais indépendants aient présenté la même tendance nous avons choisi de présenter, ci-dessous, les résultats du deuxième essai. En effet, il a été constaté un effet matrice suite à l'analyse du premier essai ce qui a impacté le nombre final des métabolites filtrés par les tests statistiques. Les échantillons des deux génotypes ont été analysés ensemble sur la colonne pour avoir le même temps de rétention pour les métabolites et éviter des calculs supplémentaires de normalisation. Toutes les modalités ont été analysées, y compris la modalité Ni, afin de comparer la distribution des données.

Les analyses descriptives de l'essai sont représentées par modes d'ionisation, positive et négative sous forme d'ACP pour chaque génotype (Figure 10). En ESI-, 4432 ions ont été trouvés et en ESI+, 13673 ions. Ces ions sont passés par des filtres statistiques ANOVA ( $\leq 0,05$ ), « fold change » ( $>2$ ) et q-value ( $<0,05$ ) pour éliminer le bruit de fond et garder les ions différentiels entre les modalités. Un contrôle qualité (QC) composé par l'ensemble des extraits des échantillons a été utilisé (point bleu au centre des ACPs – Figure 10). Après les étapes de filtration, sur les deux ionisations, un effet génotype est fortement observé. En ESI-, l'ensemble des modalités est regroupé dans un seul cluster par génotype. 54,16 % de la variabilité des données est expliquée, dont 42,45 % par la première composante principale. La séparation des groupes « éliciteurs » au sein du génotype n'est pas assez marquée et probablement masquée par le fort effet génotype (Figure 10A). Par contre, en ESI+, les modalités CCF et Ni se détachent de l'ensemble des traitements. 50,2 % de la variabilité des données est expliquée, les composantes principales 1 et 2 ont des variabilités assez équivalentes (Figure 10B).



**Figure 10.** Ions trouvés sur les deux génotypes *Désirée* et *Bintje* représentés avec les ACPs en mode (A) ESI- et (B) ESI+ avec les descriptions des groupes formés.

Les points représentent des extractions des plantes pomme de terre (*Bintje* et *Désirée*) traitées ou non par des éliciteurs. Les extractions des plantes de *Désirée* sont représentées par les couleurs : **vert pétrole**-plantes non-induites, **jaune foncé**-plantes traitées avec eau+Tween20, **beige**-CCF+Tween20, **grise**-BABA+Tween20, **vert claire**-extrait d'algue à 3 mg/ml+Tween20, **bleu foncé**- extrait d'algue à 8 mg/ml+Tween20 et **orange**- extrait d'algue formulé à 3 mg/ml+Tween20. Les extractions des plantes de *Bintje* sont représentées par les couleurs : **rouge** -plantes non-induites, **violet**-plantes traitées avec eau+Tween20, **jaune claire**-CCF+Tween20, **vert très foncé**-BABA+Tween20, **vert foncé**-extrait d'algue à 3 mg/ml+Tween20, **rose foncé**- extrait d'algue à 8 mg/ml+Tween20 et **bleu claire**- extrait d'algue formulé à 3 mg/ml+Tween20. L'ensemble des points en bleu au centre des graphiques représente les contrôles qualité injectés régulièrement pendant l'analyse. Les données ont été analysées avec le logiciel ProgenesisQ1 - Waters.



**Figure 11.** Répartitions des 170 métabolites identifiés chez les génotypes *Bintje* et *Désirée* non induits.

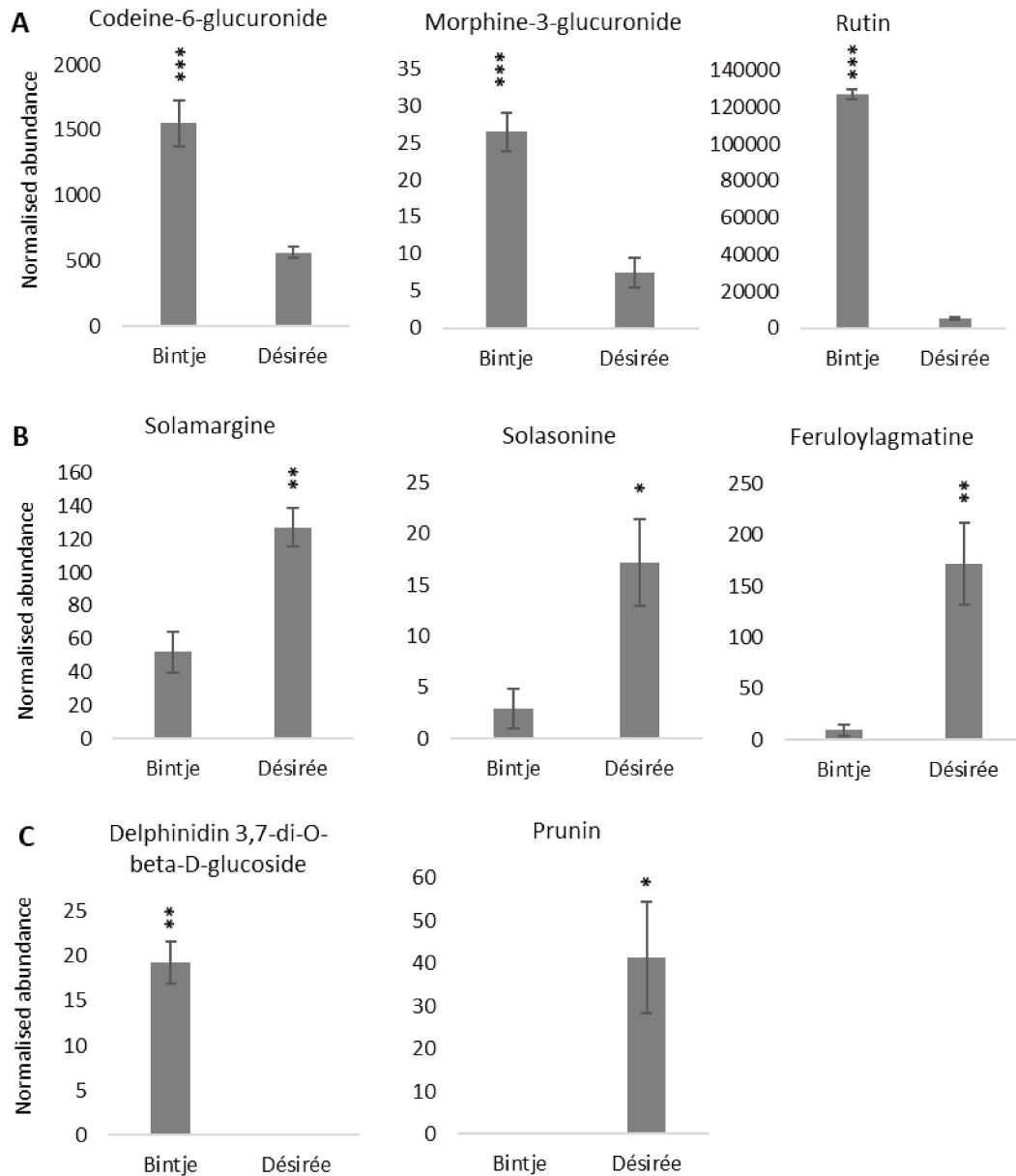
### 3.2 Les plantes non traitées présentent une différence dans l'abondance des métabolites

Un effet génotype prédominant ayant été observé suite aux analyses, la modalité non-induite (Ni) correspondant à l'état basal de la plante, a été utilisée pour comprendre les différences observées entre les métabolomes des deux génotypes. Les comparaisons focalisent sur ESI- où les métabolites secondaires sont plus représentés.

Les échantillons, Désirée Ni et Bintje Ni, ont été traités par les filtres statistiques (ANOVA, fold change et q-value) comme pour l'analyse globale. Les différences entre les génotypes ont été affinées avec l'identification des métabolites. Cette identification a été réalisée à l'aide de la base de données créée au laboratoire à partir des bases de données online : KEGG, PubChem, ChEBI et des publications sur le métabolome des Solanaceae, comme la pomme de terre (Yogendra *et al.*, 2014a) et la tomate (Sade *et al.*, 2015). Les identifications sont putatives ou de « Niveau 2 » d'après le projet COSMOS (Coordination of Standards in Metabolomics – <http://cosmos-fp7.eu/msi.html>).

En considérant les modalités Ni de Désirée et de Bintje, 170 métabolites ont été identifiés putativement. Dans cette analyse, il est observé que 94 des 170 métabolites sont communs aux deux génotypes mais présentent des variations d'abondance. 44 métabolites sont présents uniquement chez Désirée et 32 uniquement chez Bintje (Figure 11 et Annexe II). Parmi les familles identifiées, les flavonoïdes sont les plus représentés, mais aucune famille n'est spécifique à un seul génotype.

Parmi les métabolites identifiés, certains sont liés aux réponses de défenses et sont présents à l'état de base de la plante avec des abondances différentes. Par exemple, la morphine-3-glucuronide et la codeïne-6-glucuronide, sont proches dans la voie de biosynthèse des



**Figure 12. Régulation différentielle des métabolites entre les deux génotypes étudiés, Bintje et Désirée.**

(A) Métabolites plus abondants chez Bintje : Codeine-6-glucuronide, morphine-3-glucuronide et rutin ; et (B) chez Désirée : solamargine, solasonine et feruloylagmatine. (C) Delphinidin 3, 7-di-O-beta-D-glucoside et prunin, métabolites présents seulement sur un génotype. Les histogrammes illustrent l'abondance normalisée des métabolites. Les résultats des comparaisons des moyennes (ANOVA) sont présentés sur les graphiques, p-values : 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), et 0,001 (\*\*\*). Les barres représentent l'erreur-standard (n=6).

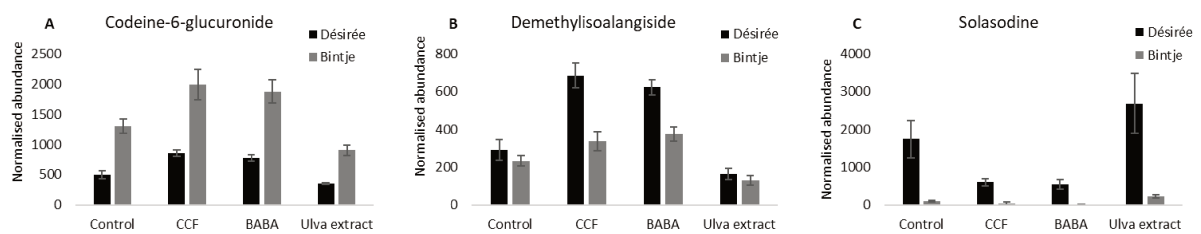
## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

alcaloïdes et sont liés au renforcement de la paroi végétale (Yogendra *et al.*, 2017). La rutine, un flavonoïde, est un composé antimicrobien déjà étudié dans notre laboratoire qui a un effet *in vitro* contre *P. atrosepticum* et *P. infestans* (Kröner *et al.*, 2012). Ces trois métabolites sont présents chez les deux génotypes, mais significativement plus abondants chez Bintje (Figure 12A). Par contre, chez Désirée, le feruloylagmatine, le phénylpropanoïde, la solamargine et la solanine, sont des glycoalcaloïdes, plus abondants chez Désirée que chez Bintje (Figure 12B). Ces derniers métabolites sont les précurseurs de la chaconine, métabolite spécifique de la pomme de terre et toxique pour les humains et animaux (Friedman, 2006). Parmi les flavonoïdes, la delphinidine 3,7-di-O-beta-D-glucoside est naturellement présente chez Bintje et la prunine chez Désirée (Figure 12C).

### 3.3 Quel que soit le génotype, le comportement des éliciteurs est le même

Dans l'ensemble, les résultats ont mis en évidence que chaque éliciteur modulait spécifiquement les profils métaboliques dans les deux génotypes de pomme de terre. Cependant, le nombre des métabolites modulés et leur abondance respective étaient différents entre les génotypes Désirée et Bintje. Ainsi, le nombre total de métabolites était de 224 chez Bintje et de 373 chez Désirée. Parmi ces métabolites, 150 métabolites (33,6 % des identifications) étaient communs aux deux génotypes, 223 étaient spécifiques à Désirée et 74 au génotype Bintje. Pour les métabolites communs entre les génotypes, leur abondance différait entre les deux génotypes. Par exemple, la codéine-6-glucuronide est significativement ( $p\text{-value} \leq 0.05 - 1.782\text{E-}08$ ) plus abondante dans les plantes de Bintje (Figure 13A), alors que la déméthylisoalangiside et la solasodine sont nettement plus abondantes dans les plantes Désirée ( $p\text{-value} 0.054$  et  $4.586\text{e-}05$ - Figure 13B-C).

Ces résultats suggèrent donc une influence importante du fond génétique pour l'induction des métabolites par un éliciteur donné. Ils sont également à mettre en lien avec le contenu basal en métabolites de chaque génotype caractérisé précédemment avec les plantes non induites.



**Figure 13. Différence d'abondance normalisée entre les métabolites présents chez les deux génotypes étudiés.**

(A) Codeine-6-glucuronide,  $p\text{-value}=1.782e-08$  ; (B) demethylisoalngiside,  $p\text{-value}=0.05422$  ; et (C) solasodine,  $p\text{-value}= 4.586e-05$ . Métabolites de la voie des alcaloïdes. Les barres représentent l'erreur-standard ( $n=6$ ).

### III. Discussion

Ce chapitre avait pour objectif de tester l'hypothèse que la production des métabolites dépendait à la fois du génotype de pomme de terre et de l'origine des éliciteurs. Nous avons montré (i) que le génotype a une forte influence dans la production des métabolites et (ii) que dans nos conditions expérimentales, après 48h de traitement la reprogrammation du métabolome des deux génotypes était dépendante de l'éliciteur appliqué.

#### 1. Influence du génotype sur le métabolome de la pomme de terre

Dans notre étude, l'effet génotype a été observé à la fois chez les plantes non-traitées et chez les plantes traitées par les éliciteurs. Il est intéressant de noter que le génotype Désirée, moyennement résistant à *P. infestans*, présente plus de métabolites à l'état de basal que le génotype Bintje, sensible à cet agent pathogène. Les métabolites spécifiques à chaque génotype contribuent bien à cet effet marqué du génotype. Mais ils ne sont pas les seuls à expliquer l'effet observé. En effet, les métabolites communs aux deux génotypes peuvent aussi par leur différence d'abondance expliquer voire renforcer cet effet génotype. C'est le cas pour la codéine-6-glucuronide, le déméthylisoalangiside et la solasodine.

L'effet du génotype est déjà bien connu et la différence de contenus en certains métabolites a été déjà décrite. Ainsi, de faibles concentrations de rutine ont été observées chez les génotypes de pomme de terre, Ackersegen et Otavio, résistants à *P. infestans* (Bengtsson *et al.*, 2014a; Kröner *et al.*, 2012) alors que chez Bintje, ces concentrations étaient élevées (Bengtsson *et al.*, 2014a; Kröner *et al.*, 2012), comme celles que nous avons observées dans nos résultats. Cependant, chez Bintje, la rutine considérée comme un antimicrobien n'a pas montré d'effet direct contre *P. infestans* dans les tests *in vivo*, mais elle inhibe la croissance de la bactérie *P. atrosepticum* pour laquelle ce génotype est considéré comme moyennement résistant (Kröner *et al.*, 2012).

Chez des génotypes de tomate résistant et sensible au virus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), la différence d'abondance des métabolites a été aussi observée. Ainsi, les polyamines, les acides aminés, les phénols et indols, sont plus abondants chez le génotype résistant. Ces métabolites conduisent à la synthèse de métabolites de défense, comme ceux de la voie des phénylpropanoïdes, l'acide chlorogénique, l'acide sinapique et le 5-hydroxyferuloyl hexose également plus abondants chez le génotype résistant (Sade *et al.*, 2015).





La voie des phénylpropanoïdes conduit à des métabolites antimicrobiens, comme l'acide chlorogénique (Kostyn *et al.*, 2012), mais également à des métabolites qui jouent aussi un rôle dans le renforcement de la paroi végétale, c'est le cas des HCAA et des lignines (Dixon, 2001). Dans notre étude, nous avons également montré que les HCAA et le feruloylagmatine, étaient plus abondants chez les plantes de Désirée suggérant leur rôle potentiel dans la résistance de ce génotype. La présence et l'abondance de certains métabolites peut donc contribuer à la résistance d'un génotype contre un agent pathogène soulignant encore le rôle déterminant du fond génétique dans la défense contre les agents pathogènes.

### **2. Reprogrammation du métabolome de la pomme de terre par les éliciteurs de différente origine chez Désirée et Bintje**

Outre l'effet génotype, cette étude met en évidence un effet éliciteur fort dans la reprogrammation du métabolome et ce, quel que soit le génotype ciblé. Les comparaisons entre le contrôle et les éliciteurs ont montré que chaque modalité présentait un profil métabolique spécifique. L'identification d'un certain nombre de métabolites a permis de comprendre une partie de cette différence. En résumé, chez Désirée et Bintje, le PAMPs de *P. infestans*, le CCF, tend à induire des métabolites primaires comme ceux impliqués dans la voie de la purine et des folates qui pourrait indiquer la présence des ROS à des temps de cinétique plus précoces. En effet, des réactions de défense au niveau de la paroi végétale ont été déjà démontrées après inoculation de *P. infestans*. Plus précisément le renforcement de la paroi avec des dépôts de callose, a été déjà observé chez le génotype Ackersegen, résistant à cet agent pathogène (Saubeau, 2014). L'induction par le CCF de la cellodextrine irait également dans ce sens car cette molécule endogène à la plante fait partie de sa paroi végétale (Gust *et al.*, 2017). Le détachement de la cellodextrine est perçu par des récepteurs de la cellule et il sert comme signalisation d'un danger (Bacete *et al.*, 2018).

Le BABA a aussi présenté une production de métabolites spécifiques appartenant au métabolisme primaire. Contrairement au traitement avec le CCF, le BABA a induit très peu de métabolites spécifiques. Le BABA est connu pour induire une résistance de la pomme de terre contre *P. infestans* grâce à un ensemble de réactions de défense, incluant la production de ROS ( $H_2O_2$ ) et les dépôts de callose (Bengtsson *et al.*, 2014a). Chez la salade (*Lactuca sativa*), les réactions au niveau de la paroi végétale après application du BABA ont stoppé le développement de l'oomycète *Bremia lactucae* (Cohen *et al.*, 2010). Cependant, les résultats cités dans la littérature font toujours suite à l'infection par des agents pathogènes.



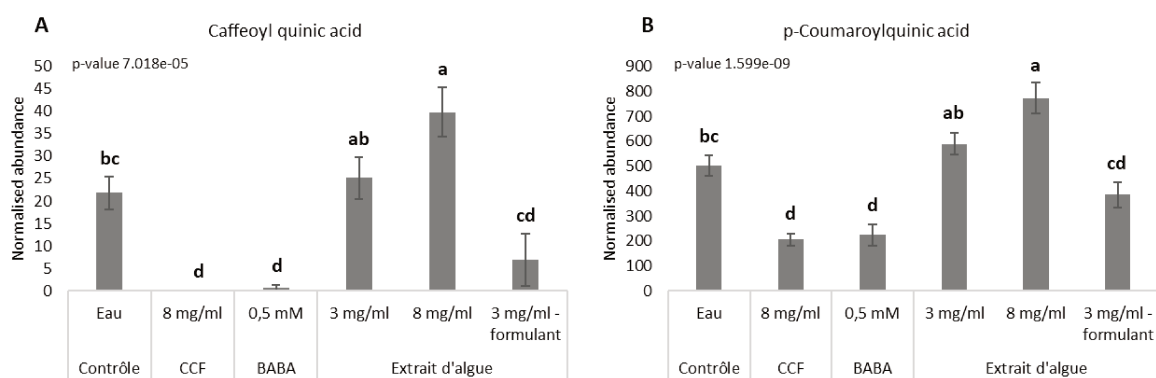
## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

Dans la revue bibliographique de Baccelli et Mauch-Mani (2016), les auteurs considèrent que le BABA est un potentialisateur de la défense donc il prépare la plante à augmenter ses réactions de défenses après infection par des agents pathogènes. En absence du pathogène, d'autres auteurs ont aussi observé préférentiellement l'induction du métabolisme primaire après application du BABA (Pastor *et al.*, 2014) ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans cette étude.

L'extrait d'*Ulva* (8 mg/ml), induit plutôt des composés antimicrobiens issus des voies des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes. L'activation des phénylpropanoïdes par des extraits d'algue a déjà été rapportée chez la tomate par El Modafar *et al.* (2012). L'extrait d'*Ulva* a également induit spécifiquement des précurseurs de la chaconine et de la solanine. Ces métabolites sont spécifiques à la pomme de terre et ils sont liés à la résistance de la plante aux bioagresseurs (agents pathogènes et insectes) (Friedman, 2006).

Dans notre étude, les trois éliciteurs appliqués ont produit des profils métaboliques différents chez la pomme de terre. L'ensemble des résultats amène à l'hypothèse que chaque éliciteur est perçu d'une façon particulière. Des études sur les récepteurs montrent qu'ils sont spécifiques aux molécules, comme les LRR-RKs FLS2 qui reconnaissent la flg22 et LRR-RKs EFR, le EF-Tu chez *Arabidopsis* (Zipfel, 2009). Sachant que les éliciteurs CCF et extrait d'*Ulva* sont un complexe de différentes molécules, il est probable que plusieurs récepteurs vont participer à la perception, comme l'ELR, récepteurs des elicines (CCF) chez la pomme de terre (Du *et al.*, 2015). En revanche, pour le BABA, une molécule pure, un récepteur cytoplasmique a été identifié aussi chez *Arabidopsis* (Luna *et al.*, 2014).

**En conclusion, dans ce chapitre nous avons confirmé l'hypothèse que 48h après traitement, les réponses de défense dépendent de l'origine des éliciteurs et du génotype utilisé. Par la suite, nous avons voulu comprendre quels mécanismes permettaient d'aboutir à la différenciation des profils métaboliques observés. Ces résultats seront présentés dans le chapitre suivant.**



**Annexe I - figure 1. Régulation différentielle de (A) l'acide caffeoyl quinique ; et (B) de l'acide p-coumaroyl quinique.**

Les histogrammes illustrent l'abondance normalisée des métabolites. Les résultats des comparaisons des moyennes (ANOVA ou Kruskal-Wallis) sont présentés sur les graphiques. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le test de Tukey HSD ( $p$ -value < 0,05). Les barres représentent l'erreur-standard ( $n=6$ ).

### Annexe I : Extraits d'*Ulva* - Effets dose et formulant

Les extraits d'*Ulva* spp. ont été appliqués pour la première fois sur des plantes de pomme de terre. Il est donc important de comprendre comment ils agissent dans le système de cette plante. Compte tenu des résultats différentiels obtenus après l'analyse globale entre les extraits aux différentes doses, formulés ou non, l'exploitation des données métabolomiques obtenues après induction par ces extraits a fait l'objet d'un projet spécifique réalisé par l'ingénieur d'étude Pauline Clin.

Effet dose : Entre les deux extraits d'*Ulva* à 3 et 8 mg/ml sans formulant, des différences d'abondance des métabolites ont été observées (Figure 1). Ainsi, l'extrait d'*Ulva* à 3 mg/ml a induit des réponses proches de celles induites par le contrôle. C'est le cas, par exemple, chez Désirée, pour les phénylpropanoïdes comme le caffeoyle quinic acid et le p-coumaroylquinic acid, qui ne sont pas significativement différents du contrôle. A l'inverse l'extrait d'*Ulva* à 8 mg/ml induit significativement ces deux métabolites par rapport au contrôle suggérant un effet dose de l'extrait (Figure 1A et B). Globalement l'extrait d'*Ulva* à 3 mg/ml a donc peu d'effet sur le métabolome de la pomme de terre.

Effet formulant : Sur ces deux mêmes exemples, l'extrait d'*Ulva* formulé à 3 mg/ml n'est pas différent du contrôle, mais cette modalité est significativement différente de l'extrait pur à 3 mg/ml. L'analyse des résultats a également montré que l'extrait d'*Ulva* formulé a induit quelques métabolites spécifiquement par rapport au même extrait non formulé (Figure 4-page 66). Ces métabolites ont été sélectionnés d'après le test ANOVA sur l'abondance normalisée et le test de Tukey où l'extrait d'*Ulva* formulé est différent significativement (p-value <0,05) des autres traitements. Ainsi l'extrait d'*Ulva* formulé a induit uniquement chez Désirée : l'isoleucine (acide aminé), la caféine (purine alcaloïde), l'acide icosanoïque (lipide), le malonyl-CoA (lipide) et uniquement chez Bintje, la tyramine (acide aminé). Il a induit chez les deux génotypes l'emetine, le farnesyl diphosphate (terpénoïde). Le manque de connaissance sur la composition du formulant ne permet pas de conclure sur ces résultats, par contre quelques questions sont soulevées. Est-il possible que le formulant interagisse avec le Tween 20 et perturbe l'activation des molécules de l'extrait d'*Ulva* ? ou le formulant a-t-il un effet d'accélérateur de la perception de l'algue qui pourrait alors induire des réactions de plus précoces?



Annexe II : Bintje et Désirée - Effet du génotype

Tableau 1. Métabolites identifiés chez les génotypes Bintje et Désirée

Métabolites - Ni Bintje et Désirée		
Seulement chez Bintje	Métabolites en commun	Seulement chez Désirée
32	94	44
Rhoifolin	Baimaside	Delphinidin 3-glucoside 5-caffoyl-glucoside
Isovitexin 2''-O-beta-D-glucoside	Scolymoside	Naringin
Delphinidin 3,7-di-O-beta-D-glucoside	Quercetin 3-(2G-xylosylrutinoside)	Leucodelphinidin
Cyanidin 3-O-beta-D-sambubioside	Rutin	Cyanidin 5-O-beta-D-glucoside 3-O-beta-D-sambubioside
Cyanidin 3-O-(6-O-malonyl-beta-D-glucoside)	Delphinidin 3-(6-p-coumaroyl)glucoside	2',3,4,4',6'-Peptahydroxychalcone 4'-O-glucoside
Vitexin	Cyanidin 3-(6-p-caffeoyl)glucoside	Quercetin 3-sophorotrioside
Medicarpin 3-O-glucoside	Monodemalonylsalvianin	Formononetin 7-O-glucoside
Cyanidin 3-O-sophoroside	Pelargonidin 3-O-rutinoside 5-O-beta-D-glucoside	Iristectorigenin A 7-O-glucoside
Luteolin 7-glucoside-4'-(Z-2-methyl 1-2-butenate)	Myricetin	Prunin
Syringetin 3-rhamnoside	Syringetin	Pelargonidin 5-O-beta-D-glucoside 3-O-beta-D-sambubioside
(-)-Maackiain-3-O-glucosyl-6''-O-malonate	Flavonol 3-O-D-xylosylglucoside	Dihydroquercetin
Dalpaniculine	Naringenin 5,7-di-O-glucoside	Butein 3,2'-diglucoside
N-feruloyltyramine	7,4'-Dihydroxyflavone 7-rutinoside	Kaempferol 3-sophorotrioside
Fraxin	1-O-Vanilloyl-beta-D-glucose	Irigenin 7-O-glucoside
Benzyl alcohol beta-D-xylopyranosyl(1?6)-beta-D-glucopyranoside	Delphinidin 5-O-beta-D-glucoside 3-O-beta-D-sambubioside	Pelargonidin 3-O-3'',6''-O-dimalonylglucoside
Sinapoyl malate	Petunidin 3-glucoside	Quercetin 3-O-[beta-D-xylosyl-(1->2)-beta-D-glucoside]
N-feruloyloctopamine	5,3',5'-Trihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone	N-caffeoylputrescine
5-O-Feruloylquinic acid	Medicarpin 3-O-glucoside-6'-malonate	Salicylic acid
Columbamine	Luteolin 7,3?-dimethyl ether 5-glucoside	Sinapic acid
(S)-cis-N-Methylstylopine	p-Coumaroylagmatine	Coniferaldehyde
Cathenamine	Feruloylagmatine	5-Hydroxyferulic acid methyl ester
Thiobinupharidine	Sinapyl alcohol	Isoalanside
Janthitrem C	Ferulic acid	Hippeastrine
2-Ketospirilloxanthin	Caffeic acid 3-glucoside	L-tryptophan
Atractyloside A	Cannabisin D	Veratridine
Gossypol	4-Coumaroylshikimate	Codeinone
Traumatic acid	Pipericyclobutanamide B	Candimine
S-methyl-5-thio-D-ribofuranose	Beta-D-Glucosyl-2-coumarinate	Asperuloside
IMP	1,3-Dicaffeoylquinic acid	Abscisic aldehyde
Melatonin	beta-D-Glucosyl-2-coumarate	Paspalicine



Portulacaxanthin II	4,21-Dehydrocorynantheine aldehyde	Zeatin
2-(1-hydroxyethyl)thiamine diphosphate	3-Epimacronine	Atractyloside G 2-O-β-D-glucopyranoside
	Crinine	PR-toxin
	O-Methylandrocybine	Phosphatidylcholine
Flavonoïde	Solasonine	Crotonoyl-CoA
Phénylpropanoïde	Morphine-3-glucuronide	(R)-3-Hydroxyhexanoyl-[acp]
Alcaloïde	Melicopicine	2-Aminomuconate semialdehyde
Terpénoïde	Alangiside	5-(3'-carboxy-3'-oxopropenyl)-4,6-dihydroxypicolinic acid
Lidipes	Codeine-6-glucuronide	3,4-Dihydroxybenzoate
Nucléotide	Serpentine	5-Methoxytryptamine
Acide aminé	Vellosimine	Sedoheptulose 7-phosphate
Carbohyrate	Solamargine	(S)-Ureidoglycine
Autres	4,21-dehydrogeissoschizine	Enzyme N6-(dihydrolipoyl)lysine
	13-Desoxypaxilline	Citrate
	Pericampylinone A	
	2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate	
	Cyclic dehydropoxanthine fufalosine	
	Dihydrozeatin	
	Yamogenin 3-O-neohesperidoside	
	Deltonin	
	Fufalosine	
	100-1	
	Bruceoside A	
	Terpendole G	
	10-deacetyl-2-debenzoylbaccatin III	
	gibberellin A12 aldehyde	
	Dihydrophaseic acid	
	Isopentenyl-ATP	
	Dehydrodolichol diphosphate	
	Isonuatigenin 3-[rhamnosyl-(1->2)-glucoside]	
	Aconitine	
	Methyl 9,12,13,15-bisepidioxy-16-hydroperoxy-10-octadecenoate	
	(R)-3-Hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier protein]	
	Octanoic acid	
	12-Hydroxyjasmonic acid 12-O-D-glucoside	
	Linoleic acid	
	9(S)-HpOTrE	
	S-adenosyl-L-methionine	
	Adenine	
	D-ribose 1,5-bisphosphate	
	SAICAR	
	ADP-ribose	
	Formyl-N-acetyl-5-methoxykynurenamine	

## Chapitre I - Analyse comparative du métabolome

XMP
2-Descarboxy-betanidin
3-dehydroshikimate
prephenate
3-hydroxy-L-kynurenine
N-(5-phosphonato-?-D-ribose)anthranilate
L-dopaquinone
Phenethyl rutinoside
Succinate semialdehyde
S-(Indolymethylthiohydroximoyl)-L-cysteine
Leucodopachrome
Indole
L-Glutamine
UDP-galactose
Enzyme N6-(lipoyl)lysine
UDP-4-keto-rhamnose
D-glycerate
pyruvate
5-Ureido-4-imidazole carboxylate
5,6,7,8-Tetrahydrofolate
7-Aminomethyl-7-carbaguanine



**CHAPITRE II**  
**Mécanismes d'activation de la défense par le CCF, le**  
**BABA et l'extrait d'*Ulva*. Réponses ciblées : hormones,**  
**gènes et métabolites**



### I. Introduction

L'immunité des plantes se traduit par un ensemble de réaction des défenses pour lutter en particulier contre les stress biotiques. Dans le chapitre précédent, nous avons étudié plus précisément, parmi les produits finaux de ces réactions, les métabolites, régulés après traitement avec les éliciteurs. Notre résultat majeur est qu'après 48h de traitement des deux génotypes de pomme de terre, Désirée et Bintje, chaque éliciteur dépendamment de son origine est capable d'induire un profil métabolique différent. Le CCF induit préférentiellement des métabolites primaires indiquant la possible présence de ROS. Le BABA induit aussi des métabolites primaires mais en plus faible quantité ce qui pourrait être attribué à un effet potentialisateur de la défense. L'extrait d'*Ulva*, par contre, régule plus spécifiquement des métabolites secondaires, comme les composés phénoliques, les phénylpropanoïdes et les flavonoïdes.

1- Pour comprendre comment l'origine des éliciteurs pouvait conditionner le métabolome de défense de la pomme de terre nous avons choisi d'approfondir la régulation des voies impliquées identifiées précédemment. Notre objectif était de répondre à la question suivante : **Est-ce qu'une régulation différentielle des phytohormones et des transcrits conditionne les profils métaboliques spécifiques obtenus après traitement par les éliciteurs ?** Pour y répondre nous avons focalisé (i) sur la signalisation hormonale par le dosage de SA, JA et Et et (ii) sur les transcrits de gènes régulés après traitement avec les éliciteurs et impliqués dans les principales voies du métabolisme secondaire : les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les terpénoïdes. Pour compléter cette étude des métabolites ciblés ont été quantifiés et leur effet sur la croissance et la sporulation de *P. infestans* a été testé.

2- Nos travaux ayant aussi conduit à l'identification putative de métabolites liés à la production de ROS et au renforcement de la paroi végétale, nous avons engagé des travaux en collaboration avec l'équipe Glycomev de l'Université de Rouen, *via* un coencadrement de stage de Master 2 réalisé par Yuna Launay (Launay, 2019) visant à répondre à la question suivante : **Est-ce que les éliciteurs induisent des ROS et des modifications de la paroi végétale ?**

**Tableau 1. Couples d'amorces utilisés pour les analyses transcriptomiques**

Les amorces ont été désignées par Guillaume Saubeau (2014) et Pauline Le Boulch (2018).

Correspondance of metabolic pathway	Gene name	NCBI's GenBank number	Gene function
<b>PR proteins</b>	<i>PR1</i>	AJ250136	Pathogenesis-related protein 1
	<i>PR2</i>	U01901	Pathogenesis-related protein 2 ( $\beta$ -glucanase)
	<i>PR4</i>	AM908515.1	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)
	<i>PR5a</i>	XM_006364057.2	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin like)
<b>Phenylpropanoid pathway</b>	<i>PAL</i>	XM_006367472	Phenylalanine ammonia-lyase 1
	<i>C4H</i>	XM_006350825	Trans-cinnamate 4-monooxygenase
	<i>4CL</i>	M62755	4-coumarate-CoA ligase
	<i>C3H</i>	BQ513122	P-coumarate 3-hydroxylase
<b>Flavonoid pathway</b>	<i>CHS2</i>	NM_001288367.1	Chalcone synthase
<b>Alkaloid and Terpenoid pathways</b>	<i>HMGR2</i>	AB041031	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase 2
	<i>SQS</i>	JF202610	Squalene synthase
	<i>SGT1</i>	NM_001318679.1	Scopoletin glucosyltransferase-like
	<i>SGT2</i>	JN695006	UDP-glucose:solanidine glucosyltransferase
	<i>SGT3</i>	HM188447	rhamnose:beta-solanine/beta-chaconine rhamnosyltransferase
<b>Modification pariétale</b>	<i>CalS2</i>	TA45471_4113	Callose synthase
<b>Système antioxydant</b>	<i>POX</i>	AM231411	Peroxidase (putative peroxidase)
	<i>APX</i>	AB041343	Ascorbate peroxidase
<b>JA pathway</b>	<i>OPR3</i>		12-oxophytodiene reductase 3
	<i>MeJA</i>	AY615276	Methyl jasmonate esterase
<b>Facteur de transcription</b>	<i>WRKY1</i>	AJ278507	WRKY transcription factor 1
<b>Reference genes</b>	<i>L2</i>	39816659	Ribosomal protein L2
	<i>GAPDH</i>	U170005	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	<i><math>\beta</math>-tubuline</i>	609267	$\beta$ -tubulin
	<i>Actine</i>	DQ252512.1	Actin 7

### 1. Question 1 : Est-ce qu'une régulation différentielle des phytohormones et des transcrits conditionne les profils métaboliques spécifiques obtenus après traitement par les éliciteurs ?

#### 1.1 Stratégie - Matériel et Méthode

##### 1.1.1 Stratégie

La stratégie pour tester cette hypothèse a été de cibler les gènes de défense préalablement « désignés » pour l'extension à la pomme de terre de la puce « qPFD » (Puce à Faible densité Quantitative : RT-PCR quantitative en microplaque) développé pendant la thèse de Guillaume Saubeau (2014). Cette gamme des gènes a été complétée par Pauline Le Boulch (stagiaire de M2) (Le Boulch, 2018). Au final 20 gènes de défense représentatifs des différentes voies métaboliques ont été sélectionnés, plus 4 gènes de ménage (Tableau 1). Au niveau de la signalisation hormonale, nous avons ciblé 6 hormones : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'acide 12-oxophytodienoïque (OPDA), le jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), l'acide dihydrojasmonique (DHJA) et l'acide 1-1-aminocyclopropane carboxylique (ACC) et ces phytohormones ont été analysées par la méthodologie développée par Adrian Schwarzenberg (com. pers). Trois métabolites, rutine,  $\alpha$ -chaconine et acide caffeoyl quinique, ont été quantifiés pour valider l'activation des voies étudiées et testés sur *P. infestans*.

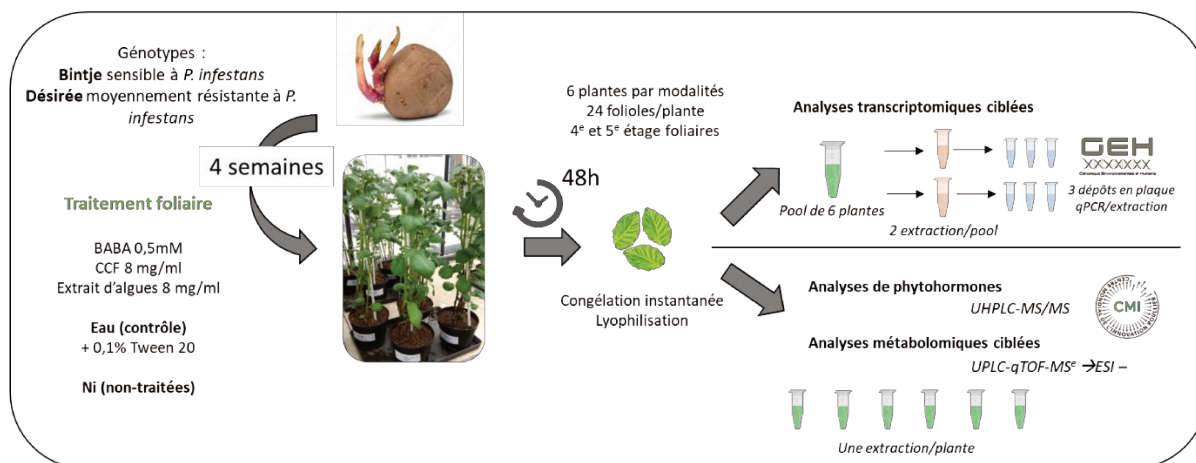
##### 1.1.2 Mise en œuvre expérimentale

Les analyses ont été réalisées sur les mêmes échantillons que ceux présentés au chapitre I. Deux génotypes, Désirée et Bintje, ont été cultivés 4 semaines en serre et traités avec le CCF à 8 mg/ml, le BABA à 0,5 mM et l'extrait d'*Ulva* à 8 mg/ml. Les éliciteurs sont dilués dans de l'eau distillée stérile avec 0,1% de Tween 20 et la modalité contrôle est l'eau distillée stérile avec Tween 20 à 0,1%. Une modalité des plantes non-traitées (Ni) est aussi étudiée dans ce chapitre. Six plantes par modalité ont reçu un traitement foliaire jusqu'à ruissèlement. Après 48h, 24 folioles par plante du 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> étage foliaire (à partir de l'apex) ont été récoltées, congelées et lyophilisées (Figure 1). Deux expérimentations indépendantes ont été utilisées pour l'étude.

Trois techniques ont été utilisées pour analyser ces échantillons :

**a) Analyse des transcrits** : les folioles des 6 plantes ont été mélangées, broyées et lyophilisées. Deux aliquots de chacun de ces échantillons ont été utilisés pour extraire les





**Figure 1. Design expérimental d'essais génotype x éliciteurs (2017)**

Trois éliciteurs (BABA, CCF et extraits d'Ulva 8 mg/ml) + le contrôle ont été appliqués sur deux génotypes de pomme de terre (Bintje et Désirée) âgés de 4 semaines. Chaque modalité est composée de 6 plantes. 24 folioles ont été récoltées par plante après 48h de traitement. Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et ensuite lyophilisés. L'analyse des transcrits a été réalisée sur un « pool » 6 plantes. Deux extractions ont été faites à partir de ce pool et chaque solution d'extraction a été déposée trois fois dans la plaque de qPCR. Les transcrits ont été analysés à la plateforme de génomique, environnemental et humaine de Rennes. L'analyse des phytohormones et des métabolites ciblés a été réalisée sur des plantes individualisées à la plateforme de métabolomique du Groupe Roullier (CMI) à Saint Malo.

ARNs. Trois repliquats de chaque extrait ont été déposés sur une nanopuce de 5184 puits (SmartChip Wafergen Takara-plateforme Génomique, Environnemental et Humaine (GEH) de l'Université Rennes 1) (Figure 1). L'analyse de l'accumulation des transcrits en RT-qPCR, a porté sur les 20 gènes de défense ciblés ainsi que sur les 4 gènes de ménages utilisés (Tableau 1).

**b) Quantification des trois métabolites ciblés :** l'acide caffeoyl quinique, la rutine et l' $\alpha$ -chaconine. Les échantillons des 6 plantes ont tous été analysés après une extraction avec un solvant à base de méthanol (70%) suivant le même protocole d'analyse utilisé pour les métabolites non-ciblés (partie « Matériel et Méthode »). Une gamme d'étalonnage a été préparée avec les standards commerciaux des trois métabolites (11 points de gamme de 100 ppb à 50 ppm). L'analyse a été réalisée par l'UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup> et les données traitées par le logiciel « MassLynx » à la plateforme métabolomique du Groupe Roullier (Figure 1).

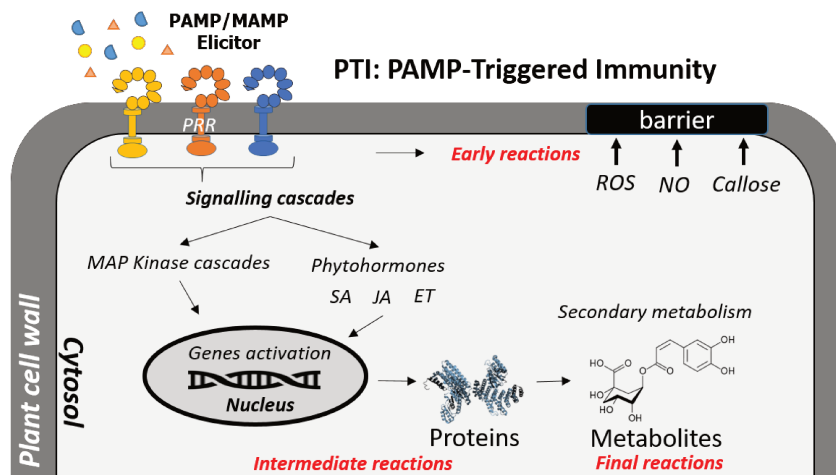
**c) Analyse de phytohormones :** la quantification des 6 phytohormones ciblées est liée au métabolisme secondaire. Comme pour l'étude sur les métabolites ciblés, les plantes ont été analysées avec le même solvant d'extraction à base de méthanol, mais les standards commerciaux de ces phytohormones ont été ajoutés dans cette solution. Les extraits des folioles ont été purifiés sur une colonne d'extraction en phase solide (Evolute ® Express ABN 30 mg/ml) et les composés d'intérêts retenus dans la colonne sont élués par une solution de méthanol. Les extraits ont été analysés par l'UHPLC-MS/MS également à la plateforme métabolomique du Groupe Roullier (Figure 1).

### 1.2 Résultats : Rôle du métabolisme secondaire dans les réponses de défense après élicitation

L'étude sur la régulation des défenses cible l'effet des éliciteurs pour un génotype donné. L'analyse des phytohormones et des transcrits des gènes de défense ont contribué à la compréhension de comment les plantes de pomme de terre ont pu produire des profils spécifiques à chaque traitement des éliciteurs.

#### 1.2.1 Cas du génotype Désirée

Les résultats obtenus pour le génotype Désirée ont fait l'objet de l'article intitulé : « *Hormonal signaling and induction of defence genes depends on the elicitor origin during the PTI* » soumis à « *Frontiers in Plant Sciences* » et présenté ci-dessous.



**Figure 1. Schematic representation of the responses induced during the PTI**

*PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns, MAMPs: Microbe Associated Molecular Patterns, PRR: Pattern Recognition Receptor, MAP: Mitogen-activated protein kinase, ROS: Reactive Oxygen Species, NO: Nitric Oxide, SA: Salicylic acid, JA: Jasmonic acid, ET: Ethylene acid.*

## Hormonal signaling and induction of defence genes depends on the elicitor origin during the PTI

Rafaela Lopes Martin<sup>1,2</sup>, Pauline Le Boulch<sup>1</sup>, Pauline Clin<sup>1</sup>, Adrián Schwarzenberg<sup>2</sup>,  
Jean-Claude Yvin<sup>2</sup>, Eric Nguema-Ona<sup>2</sup> and Florence Val<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>AGROCAMPUS-OUEST, INRA-UMR IGEPP 1349-Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, Rennes, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Nutrition Végétale, Centre Mondial de l'Innovation, Groupe Roullier, Saint-Malo, France

\*Correspondence: Florence Val - florence.val@agrocampus-ouest.fr

**Keywords:** potato (*Solanum tuberosum*), plant immunity, secondary metabolism, transcripts accumulation, phytohormones, PAMPs of *Phytophthora infestans*, BABA, *Ulva* extract.

### 1. Introduction

The pathogens induce continuous stress on plants, which have developed a sophisticated defence system to survive. These systems begin with the perception by specific receptors of structures from the pathogens/microbes called elicitors or pathogens/microbes-associated molecular pattern (PAMPs/MAMPs) (Henry *et al.*, 2012). The recognition of elicitors by the receptors induces different levels of early, intermediate and final reactions (Figure 1) (Boller and Felix, 2009). The early reactions are located in the plant cell wall to limit the entry of harmful organisms (Zipfel, 2009). The intermediate phases consist of a signalling cascade *via* the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Meng and Zhang, 2013) and phytohormones (Bari and Jones, 2008) leading to the induction of defence genes transcription. The phytohormones such as the salicylic acid (SA), the jasmonic acid (JA) and the ethylene (ET) mediate the defence response against the pathogens. However, others phytohormones, auxins, abscisic acid (ABA) and gibberellins (GA) could participate in this (Bari and Jones, 2008). The protein transduction is at the interface of intermediate and final reactions leading to the production of metabolites, final compounds of defence reactions (Kushalappa *et al.*, 2016). The secondary metabolism is mainly involved in defence reactions by producing antimicrobial compounds (Piasecka *et al.*, 2015). Together, these reactions are part of the PAMP-triggered immunity (PTI) (Bigéard *et al.*, 2015) (Figure 1).



## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

Some crops are particularly susceptible to pathogens. This is the case of potatoes which were, in the past, entirely destroyed by one of the worst pathogens ever found in Europe, *Phytophthora infestans*, causal agent of late blight disease (Fry, 2016). *P. infestans* caused the Irish potato famine in the middle of the 19<sup>th</sup> century. Currently, it is still considered a constant threat given the damage it causes, its dispersion and its capacity to adapt thanks to the evolution of its genome (Fisher *et al.*, 2012; Fry *et al.*, 2015). Potato breeding programs have also been developed and focused on the introduction of major resistance genes (R genes) to *P. infestans*. The first R genes (R1-R11) used against *P. infestans* were found in *Solanum demissum*, a wild species of *Solanum*, but they were quickly bypassed by the pathogen (Nowicki *et al.*, 2012). Currently, the management of *P. infestans* is therefore mainly based on chemical treatments. In Europe, 1 billion euros were spent on the chemical control of this disease (Haverkort *et al.*, 2008).

However, considering the environmental problems caused by pesticides, one of the current scientific challenges is to find alternative methods within crop management. The stimulation of natural plant defences or plant immunity could be an interesting alternative to the current control methods. On potato crops, the stimulation of defences by a PAMP of *P. infestans*, the elicitor INF1, has not been associated with disease control (Kamoun *et al.*, 1997). However, a concentrated culture filtrate (CCF), described as PAMPs set (INF1, INF4, INF5 and polysaccharide fraction) (Saubeau *et al.*, 2014), showed a reduction of *P. infestans* symptoms when it was applied on BF15 potato genotype (Thomas *et al.*, 2019). The most studied elicitor on potato crops is the  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA), a synthesized non-protein amino acid- (Altamiranda *et al.*, 2008; Liljeroth *et al.*, 2010; Bengtsson *et al.*, 2014b; Kuźnicki *et al.*, 2019). Many authors have showed the efficiency of BABA against *P. infestans* in laboratories (Bengtsson *et al.*, 2014a, 2014b) and in field conditions (Altamiranda *et al.*, 2008; Liljeroth *et al.*, 2010) with significantly reduction in symptoms. More recently in our laboratory, on potato plants, we tested an elicitor from *Ulva* spp, green algae, which induced the secondary metabolism. Its effectiveness against *P. infestans* has not yet been verified; however, on tomato crops, it reduces the *Fusarium oxysporum* symptoms (El Modafar *et al.*, 2012).

Previously, we showed with a non-target metabolomic analysis that the elicitors-specific reprogrammed the metabolome of potato. Indeed, the CCF, the BABA and the *Ulva* extract, were able to reprogramm mainly on the secondary metabolism pathways. Thus, the CCF and the BABA treatments mainly induced the alkaloid pathway such as codeine-6-glucuronide and



morphine-3-glucuronide. Whereas, the *Ulva* extract induced the phenylpropanoid and flavonoid pathways such as scopolin and rhoifolin (Martin *et al.*, 2019- submitted).

To understand the mechanisms of induction of these pathways, this study investigated potato genes defence responses and phytohormones. The hypothesis is that CCF, BABA and *Ulva* extract induce the metabolic pathways *via* a differential activation of defence genes and the hormonal signaling. The strategy was focused (i) on the transcript level of 19 defence-related genes implicated in these secondary metabolism pathways. Among those, the PR proteins genes, the precursor genes of phytohormones biosynthesis and cell wall reinforcement/ROS detoxification genes and (ii) on the phytohormone level linked to defence (SA, JA and ET).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cultivation and Treatment of Plants

The potato tubers of Désirée – moderate resistant to *P. infestans*, produced in 2016 from BrACySol team (UMR IGEPP in Ploudaniel-France) were used in this experiment. The tubers and plants were conducted according to the method described by Thomas *et al.*, (2019). After 4 weeks, 6 plants per treatment were treated with the CCF of *P. infestans* at 8 mg.ml<sup>-1</sup>, or with a green algae extract - *Ulva* spp. at 8 mg.ml<sup>-1</sup>, or with β-aminobutyric acid (BABA, 97% purity) at 0.5 mM, or with water+“Tween20” at 0.1%. This last treatment is used as a control because all elicitors are diluted in water+“Tween20” at 0.1%, which facilitates penetration into the tissues.

48h after treatment, 24 leaflets per plant were harvested from young leaves, on the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> leaf stage from the top. The samples were fast-frozen in liquid nitrogen, lyophilized and grinded as described by Martin *et al.* (2019- submitted). Then lyophilized material (LM) were stored at -80°C until performing the analysis. Two independently assays were performed with an interval of one week. The CCF was in-house produced from one strain of *P. infestans*' 14-P29-03R with Desender *et al.* (2006) adapted method by Thomas *et al.* (2019). The algae extract was produced by the Roullier Group's Plant Nutrition laboratory from a green algal *Ulva* spp. using a method described by Jaulneau *et al.* (2010). Then BABA purchased by Sigma-Aldrich France (CAS 541-48-0).



**Table 1. Gene's candidates and their primers sequencing for transcript analysis after the elicitors treatment on potato plants**

Correspondance of metabolic pathway	Gene name	NCBI's GenBank number	Gene function
PR proteins	PR1	AJ250136	Pathogenesis-related protein 1
	PR2	U01901	Pathogenesis-related protein 2 ( $\beta$ -glucanase)
	PR4	AM908515.1	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)
	PR5a	XM_006364057.2	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin like)
Phenylpropanoid pathway	PAL	XM_006367472	Phenylalanine ammonia-lyase 1
	C4H	XM_006350825	Trans-cinnamate 4-monooxygenase
	4CL	M62755	4-coumarate-CoA ligase
	C3H	BQ513122	P-coumarate 3-hydroxylase
Flavonoid pathway	CHS2	NM_001288367.1	Chalcone synthase
	HMGR2	AB041031	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase 2
Alkaloid and Terpenoid pathways	SS1	JF202610	Squalene synthase
	SGT1	NM_001318679.1	Scopoletin glucosyltransferase-like
	SGT2	JN695006	UDP-glucose:solanidine glucosyltransferase
	SGT3	HM188447	rhamnose:beta-solanine/beta-chaconine rhamnosyltransferase
Cell wall reinforcement	CalS2	TA45471_4113	Callose synthase
Système antioxydant	POX	AM231411	Peroxidase (putative peroxidase)
	APX	AB041343	Ascorbate peroxidase
JA pathway	OPR3		12-oxophytodienoate reductase 3
	MeJA	AY615276	Methyl jasmonate esterase
Facteur de transcription	WRKY1	AJ278507	WRKY transcription factor 1
Reference genes	GAPDH	U170005	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

### 2.2. Phytohormone determination

Ten phytohormones were analysed: salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), 12-oxophytodienoic acid (OPDA), jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile), dihydrojasmonic acid (DHJA) and 1-1-aminocyclopropane carboxylic acid (ACC). To quantify the phytohormones, 10 mg LM of each plant was extracted with an extraction buffer containing 1ml of 70% methanol, 29% H<sub>2</sub>O, 1% formic acid and internal standards of the phytohormones. A second extraction is carried out 0.5 ml of this same buffer. At each step, the samples were agitated and centrifuged to obtain the supernatants, as described Martin *et al.* (2019- submitted). The combined supernatants were evaporated (Turbovap LV, Biotage) and re-suspended in 2% formic acid solution, then purified using an SPE ABN express plate of 30 mg/1 ml (Biotage). The phytohormones were eluted with methanol, then evaporated and resuspended in 200 µL of 0.1% formic acid solution. Phytohormones were analysed by an UHPLC-MS/MS system according to the method described by Maillard *et al.* (2018). The separation and detection of phytohormones were achieved using a Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Japan) coupled to a QTrap 6500+mass spectrometer (Sciex, Canada) equipped with an IonDrive™ turbo V electrospray (ESI) source. 2 µl samples was inject into a Kinetex Evo C18 core-shell column (100 x 2.1 mm, 2.6 µm, Phenomenex, USA) at a flow rate of 0.7 ml.min<sup>-1</sup>, to phytohormones separation. The column temperature was maintained at 40°C. The mobile phases were composed of solvent A: Milli-Q water and solvent B: acetonitrile LCMS grade (Fisher Optima, UK), both containing 0.1% formic acid (LCMS grade, Fluka analytics, Germany). The analysis was done in scheduled MRM mode in positive, at 5 kV and negative, at -4.5 kV, mode simultaneously with a polarity switching of 5 ms. The data analysis was performed using MASSLYNX software (Waters).

### 2.3. Transcript Analysis

#### 2.3.1. Primer designs

The 20 defence genes targeted belongs to Pathogenesis-Related proteins (PR), phenylpropanoid, flavonoid, alkaloid/terpenoid, JA and SA pathways (Table 1). The primer designs were carried out using Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) on the potato genome. The sequences of each genes were obtained from NCBI's GenBank and aligned *via* Primer Blast. The selected primers must meet the criteria described by (Saubeau *et al.*, 2016): the hybridization temperature were between 58 and 62°C and the self-complementary index of the two primers in 5' or 3' not exceed 5 to avoid a non-specific



hybridization between the two primers by us and by Saubeau *et al.* (2016). A cDNA dilution range of both independently assays was used to evaluate the effectiveness of the primer pairs and followed two criteria: (i) one peak on melting peaks curves and (ii) qRT-PCR efficiencies from calibration curves ( $E = 10^{-1/\text{slope}}$ ) between 85% and 120%. A double validation was performed. Firstly, in a 384-well plate instrument, Lightcycler480 (Roche) under the following cycling PCR conditions 5 min at 95°C; 50 cycles of 5s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Melting curve analysis were obtained under 30s at 95°C and 30s at 60°C, as adapt method described by Saubeau *et al.* (2016). Finally, a second validation, for each primer, was performed by electrophoresis of PCR-products on 2% agarose gel with a 5x GoTaq buffer at 120V.

### 2.3.2. RNA isolation and cDNA synthesis

For transcript analysis, the 6 plants/treatment/assay were pooled into one unique sample. From this sample, twice 15mg LM were taken to RNA extraction. The entire method RNA isolation, RNA integrity until cDNA synthesis was described by Thomas *et al.* (2019). The samples were extracted with the the “SV Total Isolation System” from Promega®. RNA concentration was verified with the Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®) and RNA quality was determined by electrophoresis on 1% agarose gel. The “iScript cDNA Synthesis” from Biorad® were used to generate complementary DNA (cDNA) from an RNA samples, the reverse transcription (RT) by PCR programme with following conditions: (i) 5 min at 25°C; (ii) 30 min at 42°C; (iii) 5 min at 85°C. Then the cDNA quality was verified by electrophoresis on 1.5% agarose gel with the amplification of *PR2* gene. The cDNA samples were used to study the transcript accumulation by qRT-PCR.

### 2.3.3. High throughput quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) conditions

The analysis of gene expression was performed at the Platform for Human and Environmental Genomics, Rennes/France with a 5184-well chip. The WaferGen SmartChip Real-time PCR system (WaferGen Bio-systems and Takara Bio Inc. USA) was used in “24 assays x 216 samples” configuration that allowed a unique run to the whole genes and samples. Each cDNA samples was distributed in three-well that composed qPCR replicates per genes. Finally, six technic replicates were obtained. SmartChip Multisample Nanodispenser dispensed 100 nL qPCR mix composed with 1 ng.µL- cDNA sample, 1x 800-1200 nM primers mix,



1x LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics France), completed with sterile distilled water. A dilution range with all cDNA was also distributed on the chip in the same conditions. Amplifications were performed in SmartChip Cyler following the same cycling conditions of primer designs. The results were analysed by SmartChip qPCR Software (v. 2.8.6.1). Wells with faulty amplifications and multiple melting peak curves were excluded. The Pfaffl (2001) method of relative quantification was used to calculate transcript accumulation of genes. qRT-PCR efficiencies was calculated from dilution rate as to primer design and each primer rates was considered in normalization calculation. The genes out of the criteria was excluded of the analysis (e.g. *WRKY1*). Gene expressions were then normalized with the reference gene *GAPDH*.

### **2.4. Metabolite quantification: 4-O-caffeoylquinic acid, rutin and $\alpha$ -chaconine**

The metabolites from different defence pathways were chosen to a quantification analysis: 4-O caffeoylquinic acid (Sigma-Aldrich France - CAS: 905-99-7) as a phenylpropanoid, rutin (Sigma-Aldrich France-CAS: 207671-50-9) as a flavonoid and  $\alpha$ -chaconine (Carbosynth - Batch n°OC293251601) as a glycoalkaloid. These metabolites were analysed using an Ultra-High-performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer - Xevo G2-S QToF (UPLC-QTOF-MS<sup>e</sup> from Waters® – Milford/Massachusetts/USA) equipped with an electrospray ion source (ESI). The column used to separate the metabolites was a Kinetex EVO C18 column (150 x 2.1 mm – 2.6  $\mu$ m, 100Å, Phenomenex, USA). The negative mode (ESI-) was chosen to target these metabolites. Extraction methods and UPLC parameters were the same used by Martin *et al.* (2019-submitted) in non-target analysis. The standard curves range were made from 800 ppb to 50 ppm and the quantification of metabolites were analysed with the Masslynx software (Waters®).

### **2.5. Evaluation of the direct effects of rutin, 4-O caffeoyl quinic acid and $\alpha$ -chaconine on *P. infestans***

To analyse the biological effects on *P. infestans* of the targeted metabolites, the standards were diluted in distilled water to the highest concentration detected in lyophilized leaflets: 26 10<sup>3</sup> ng/ml for  $\alpha$ -chaconine, 24 10<sup>3</sup> ng/ml for 4-O caffeoyl quinic acid and 4.10<sup>3</sup> ng/ml for rutin.



## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

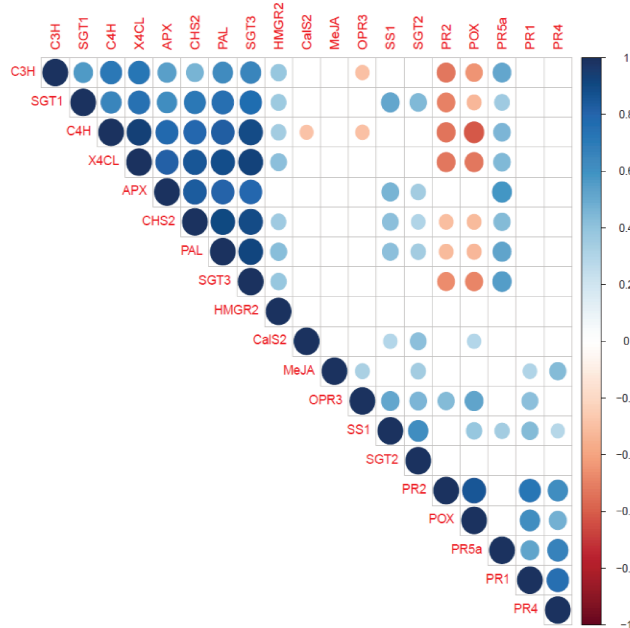
*Measurement of mycelium growth:* 500 µl of metabolite solutions or 500 µl of water (negative control) were spread on Petri dishes containing culture medium. The dishes were dried in a laminar flow hood. A 1 cm<sup>2</sup> explant of *P. infestans* was placed in the center of each box, in the dark at 15°C. Every day, the mycelial growth zone is highlighted with a marker. After 8 days, the Petri dishes were photographed. The mycelial growth was evaluated using the Image J software which converts the pixel data to 2 cm. 5 independent repetitions were performed by each treatment.

*Counting of sporangia:* Non-destructive measurements of mycelium growth made possible to maintain the Petri dishes in the dark at 15°C to promote the sporulation of *P. infestans*. After 3 weeks of culture, the sporangia from each dish were collected in 500 µl of water and then counted with a Malassez cell. Each box is counted twice.

### 2.6. Data analysis

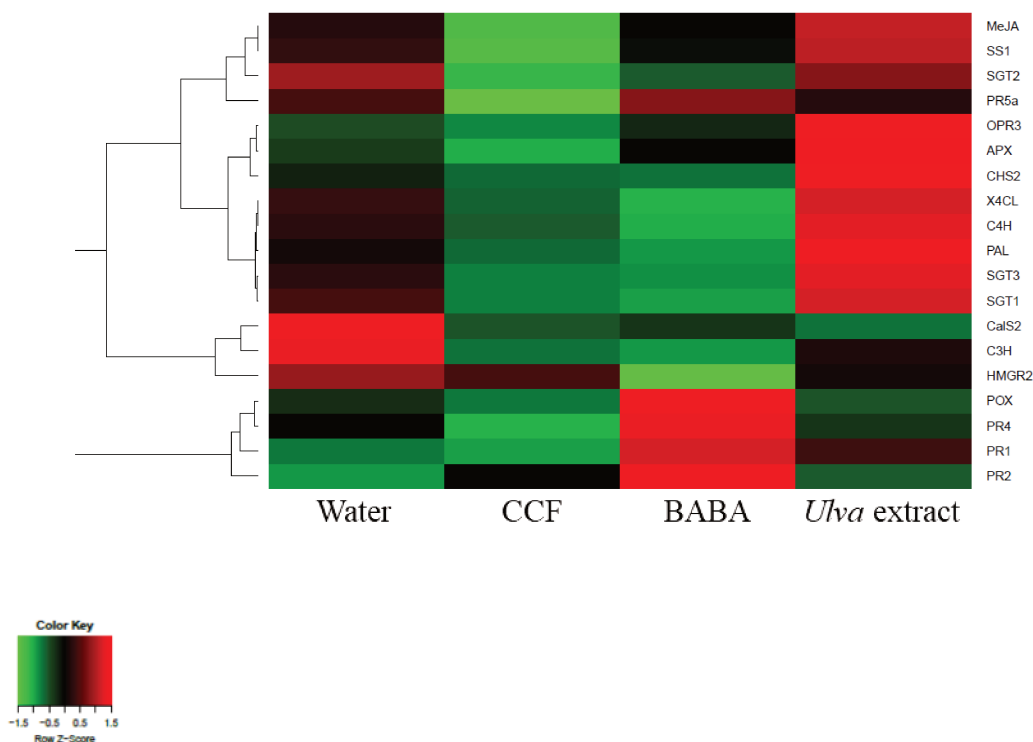
The transcriptomic data matrix was analysed with a correlation-based distance with Pearson correlation coefficients and Ward.D2 clustering. A heatmap represented these results and was performed by the “gplot” package in R software version 3.3.3. This software was used for all statistic analysis. A correlation matrix was also calculated with Pearson test. Then a linear mixed-effects model fit by maximum likelihood or restricted maximum likelihood (REML) was performed using with the “lme” package. The data was considered significant if the p value  $\leq 0.05$ . The phytohormones and the metabolites were also analysed with this test and represented by histogram charts. The different letters indicate significant differences based on same test. For the tests with *P. infestans*, ANOVA-one factor was performed followed by a Tuckey test (p-value  $< 0.05$ ) represented by the different letters.





**Figure 3. Correlation matrix between all target genes by all treatments**

Transcript accumulation – The matrix have the target transcripts of all treatment results. The correlation was calculated with Pearson correlation coefficient. The scale represented the positive (red) ou negative (blue) correlation ou absence of correlation. Each square indiqueted the correlation between two genes.



**Figure 4. Transcripts regulation by each treatment**

Transcript accumulation - each row represents one gene and the columns represent the average accumulation per treatment. Associated to the rows, the hierarchical clustering tree brings together the genes by the correlation-based distance calculated with Pearson correlation coefficient and Ward clustering. Clusters showed up-regulation (red), neutral effect (black) and down-regulation (green) by treatments.

### 3. Results

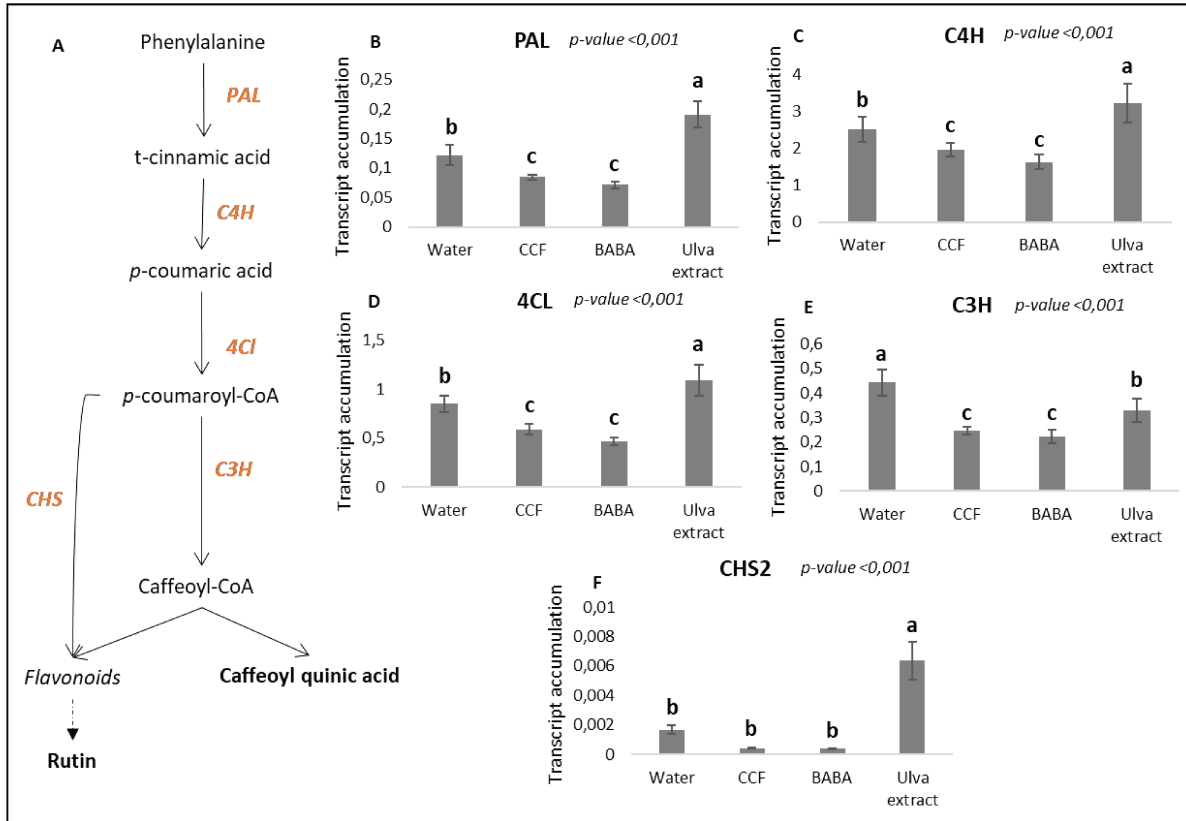
#### 3.1. The modulation of transcripts depends on the elicitor

Three elicitors (CCF, BABA and *Ulva* extract) were applied to Désirée genotype and the leaflets were harvested 48h after treatment. The regulation of genes involved in the defence pathways was analysed by the RT-qPCR. In order to understand the mechanisms of gene activation or repression by elicitors, a gene correlation analysis was performed with a correction matrix (Figure 3). Genes were collectively analysed with the results of all treatments. The activation of phenylpropanoid, flavonoid and steroid alkaloids genes (*SGT1-3*) were positively correlated. When these activations were implemented, the *PR2* and *POX* genes were down regulated due to the negative correlation. The *PR* genes (*PR1*, *PR2*, *PR4* and *PR5a*) were also positively correlated with each other (Figure 3).

Each treatment modulated a specific profile for all the studied genes. These results are illustrated by the heatmap chart (Figure 4) where the green color represents the down-regulated genes, the red color the up-regulated genes and the black color represents neutral reactions. The hierarchical clustering tree regrouped the correlation distance between the genes. Hence, it showed two majors groups: (i) the *PR2*, *PR1*, *PR4* and *POX* composed one group and then (ii) the remaining 15 genes composed the second group. The BABA mainly induced these *PRs* genes whereas *Ulva* extract induced the other targeted pathways. These results corresponded with the activation pattern of *Ulva* extract and BABA treatments as showed on figure 3. However, the CCF tended to repress all genes.

The transcripts regulation highlighted the differential genes profile by each elicitor. The following results showed the details of the regulation of each gene (Figure 5-8). They were analysed by linear mixed-effects model fit with p value of <0.05 as a threshold of significance.

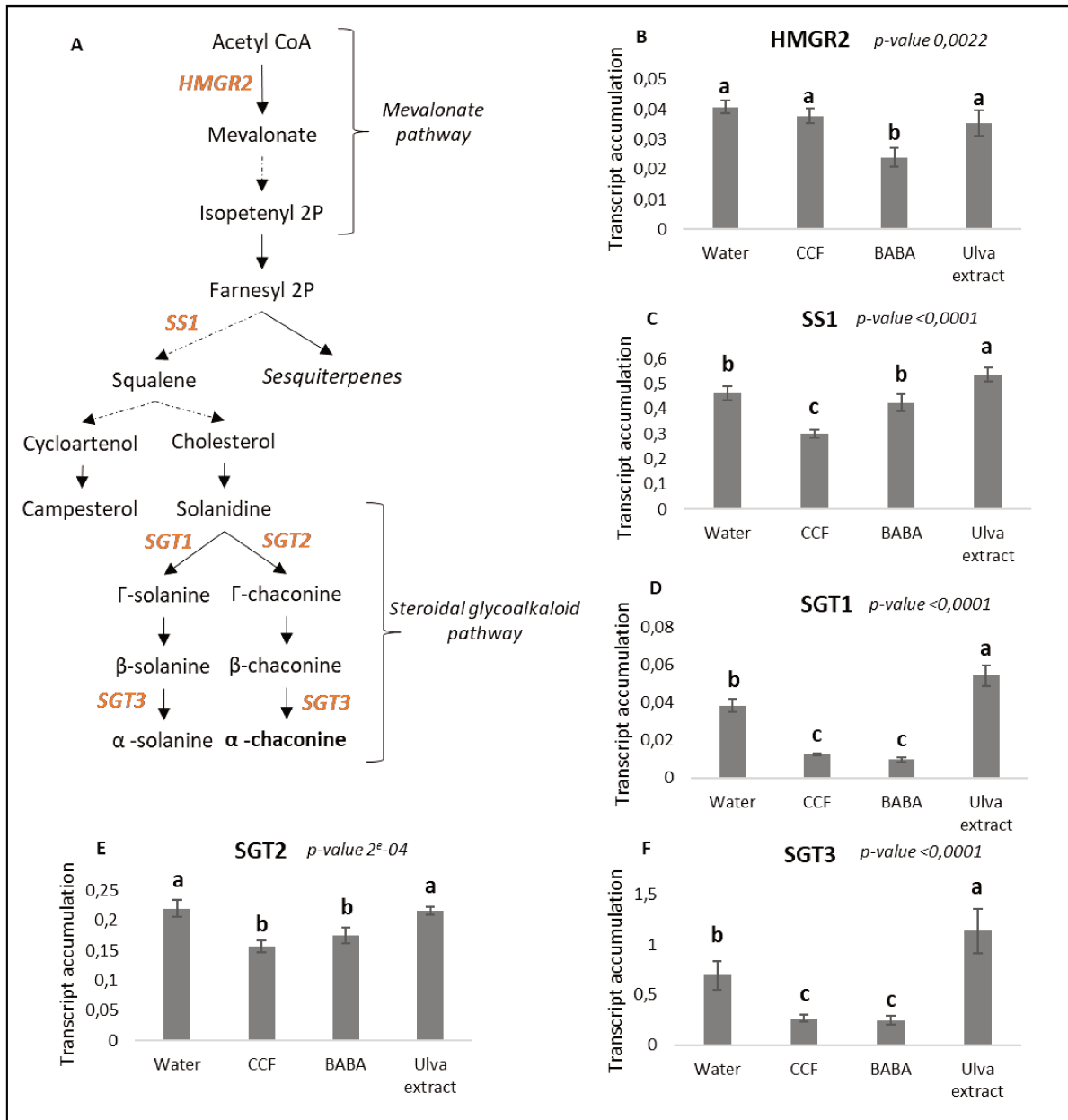
The BABA up regulated the *PR* genes (*PR1*, *PR2* and *PR4*) and *POX* compared to the control but it was the only treatment that down regulated *HMGR2*. The CCF treatment also up regulated *PR2* and *PR4* but it was the only treatment that down regulated *PR5a* and *SSI*. For the others genes, BABA and CCF followed the same trend. They also down regulated the phenylpropanoid (*PAL*, *C4H*, *4CL* and *C3H*), the steroidal glycoalkaloid (*STG1*, *SGT2* and *SGT3*) and *Cals2* genes. However, no differences were observed between the *CHS2*, *APX* and *OPR3* from the control.



**Figure 5. Phenylpropanoid and derivate pathways and the mainly genes involved in the biosynthesis of the metabolites**

A. Schematic representation of phenylpropanoid and flavonoid pathways based on KEGG maps. Orange bold genes were analysed by RT-qPCR. Black bold metabolites, rutin and caffeoyl quinic acid, quantified by UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. Solid arrows indicate a direct link between the metabolites and dotted arrows indicate non-direct link with the mentioned metabolite.

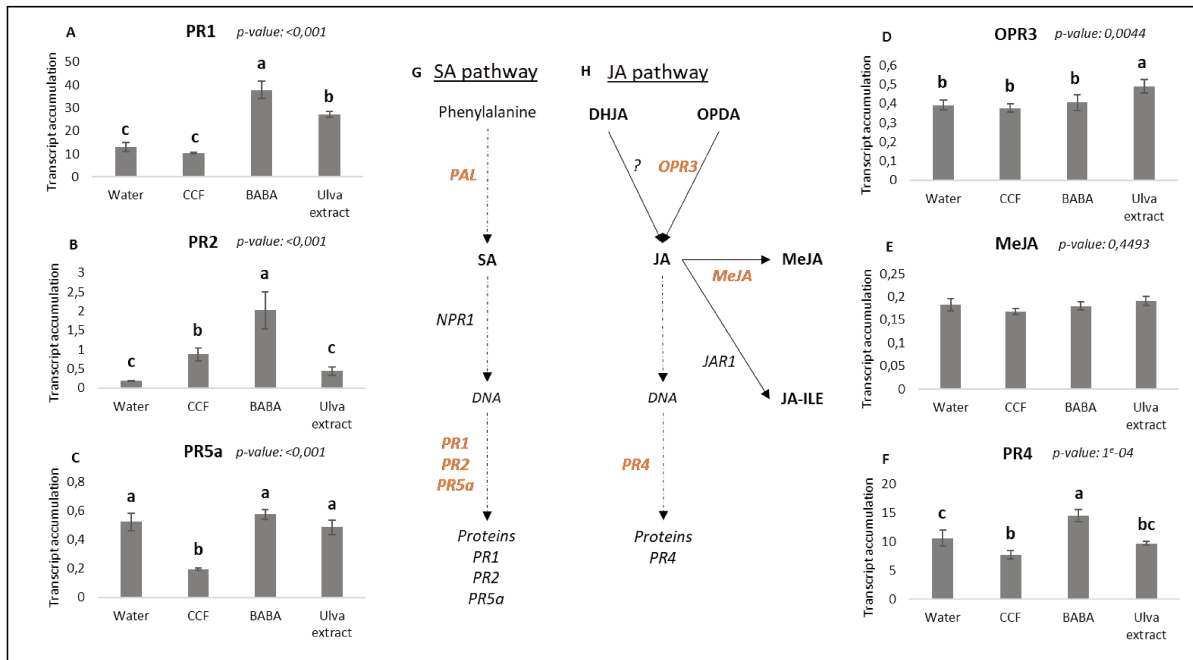
The target genes regulated by the elicitors were analysed by RT-qPCR. The transcript accumulation are illustrated by histograms. B. PAL, C. C4H, D. 4CL, E. C3H and F. CHS2. Bars represent standard error of two independent experiments with a pooled of six plants per treatment and six technical replicates. The dataset was analysed by linear mixed-effects model fit by REML. Different letters indicate significant differences based on same test ( $p$ -value < 0.05).



**Figure 6. Alkaloid pathway with the origin of terpenes' biosynthesis (mevalonate pathway) and the genes involved in the biosynthesis of the metabolites**

A. Schematic representation of terpenoid and alkaloid biosynthesis pathways with focus on steroidal glycoalkaloid pathway based on KEGG maps. Orange bold genes were analysed by RT-qPCR. Black bold metabolite,  $\alpha$ -chaconine, quantified by UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. Solid arrows indicate a direct link between the metabolites and dotted arrows indicate non-direct link with the mentioned metabolite.

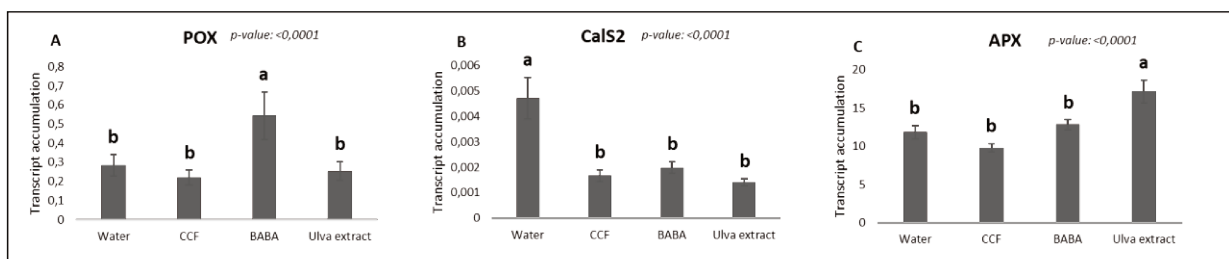
The target genes regulated by the elicitors were analysed by RT-qPCR. The transcript accumulation are illustrated by histograms. B. **HMGR2**, C. **SS1**, D. **SGT1**, E. **SGT2** and F. **SGT3**. Bars represent standard error of two independent experiments with a pooled of six plants per treatment and six technical replicates. The dataset was analysed by linear mixed-effects model fit by REML. Different letters indicate significant differences based on same test (*p* value <0.05).



**Figure 7. Phytohormones and PR proteins pathways and the main genes involved in their biosynthesis**

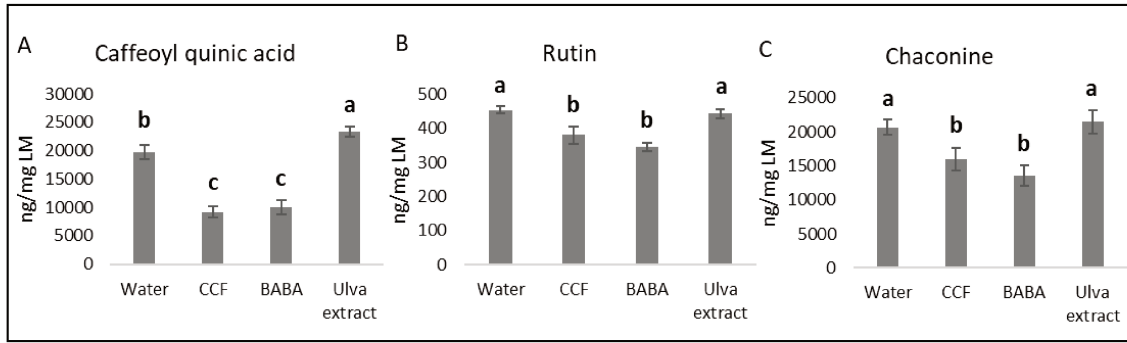
The target genes regulated by the elicitors were analysed by RT-qPCR. The transcript accumulation are illustrated by histograms. A. PR1, B. PR2, C. PR3, D. OPR3, E. MeJA and F. PR4. Bars represent standard error of two independent experiments with a pooled of six plants per treatment and six technical replicates. The dataset was analysed by linear mixed-effects model fit by REML. Different letters indicate significant differences based on same test ( $p$  value  $<0.05$ ).

Schematic representations of SA (G) and JA (H) pathways based on KEGG maps and Ali et al. (2018). Orange bold genes were analysed by RT-qPCR and black genes were not analysed. Black bold phytohormones, SA, DHJA, OPDA, JA, MeJA and JA-ILE were quantified by UHPLC-MS/MS. Solid arrows indicate a direct link between the metabolites and dotted arrows indicate non-direct link with the mentioned metabolite.



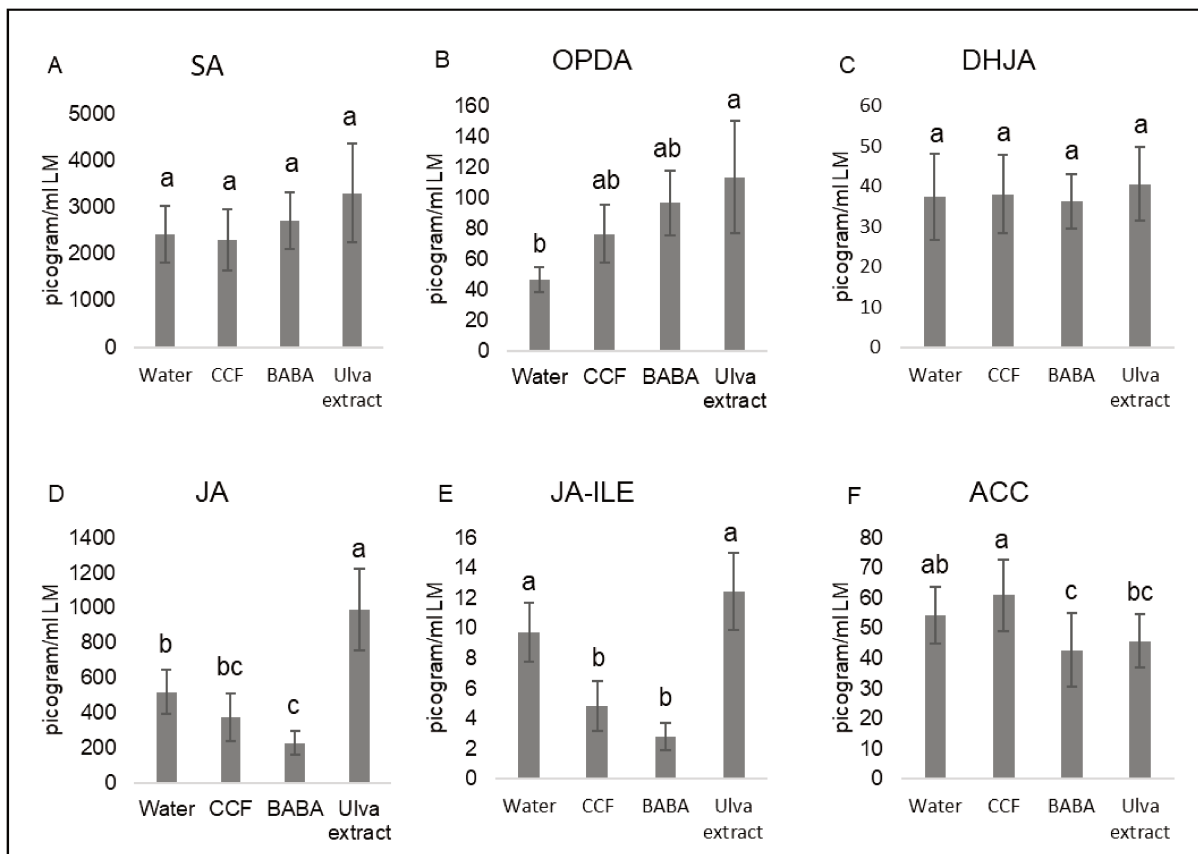
**Figure 8. Genes involved on defence response cell wall**

The target genes regulated by the elicitors were analysed by RT-qPCR. The transcript accumulation are illustrated by histograms. A. POX, B. CalS2 and C. APX. Bars represent standard error of two independent experiments with a pooled of six plants per treatment and six technical replicates. The dataset was analysed by linear mixed-effects model fit by REML. Different letters indicate significant differences based on same test ( $p$  value  $<0.05$ ).



**Figure 8. Quantification of antimicrobial metabolites from phenylpropanoid, flavonoid and alkaloid pathway**

A. caffeoyl quinic acid, B. rutin and C.  $\alpha$ -chaconine. The target metabolites regulated by the elicitors were analysed by UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup> in negative ionization. The concentration in ng/mg of lyophilized material (LM) are illustrated by histograms. Bars represent standard error of two independent experiments with a six plants per treatment analysed individually. The dataset was analysed by linear mixed-effects model fit by REML. Different letters indicate significant differences based on same test ( $p$ -value < 0.05).



**Figure 9. Quantification of phytohormones from secondary metabolisms**

A. SA, B. OPDA, C. DHJA, D. JA, E. JA-ILE and F. ACC. The target metabolites regulated by the elicitors were analysed by UHPLC-MS/MS. The concentration in ng/mg of lyophilized material (LM) are illustrated by histograms. Bars represent standard error of two independent experiments with a six plants per treatment analysed individually. The dataset was analysed by linear mixed-effects model fit by REML. Different letters indicate significant differences based on same test ( $p$ -value < 0.05).



On the other hand, the *Ulva* extract treatment regulated differentially from BABA and CCF. It up regulated only one *PR* gene (*PR1*), but the other families such as the phenylpropanoid genes (*PAL*, *C4H* and *4CL*) and the flavonoid gene (*CHS2*) were up regulated. The alkaloid gene (*SSI*) and specifically the steroidal glycoalkaloid genes were up regulated by this treatment (*SGT1* and *SGT3*). In addition, *Ulva* extract also up regulated the genes *APX* and *OPR3* from ROS detoxification and JA precursor, respectively (Figure 8C and 7D, respectively). All elicitors down regulated *CalS2* involved in cell wall reinforcement (Figure 8B). Only the *MeJA* gene fail to show significant differences (Figure 7E) (p value 0.44) between the treatments.

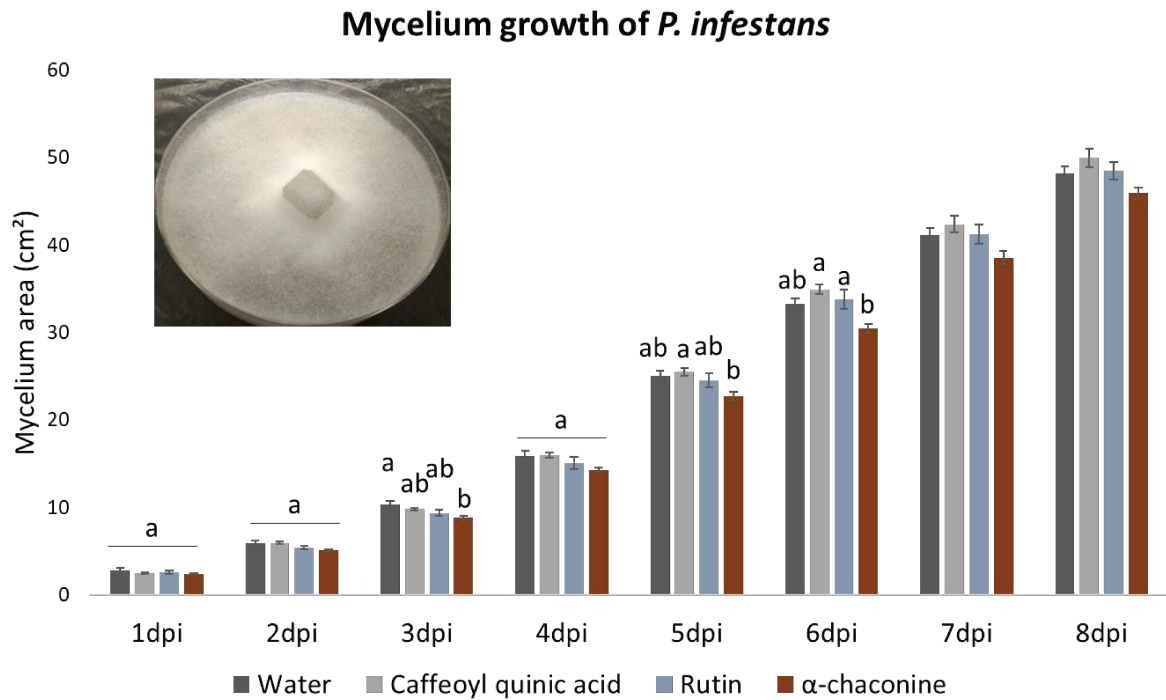
### **3.2. Target metabolites confirmed that both CCF and BABA used different pathways than those of *Ulva* extract**

Three metabolites were selected on the target pathways and were analysed by UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. The analysis was performed on each plant sample composed of 24 leaflets. The CCF and the BABA treatments significantly decreased the concentration of caffeoyl quinic acid, to 9.206 ng/mg of lyophilized material (LM) and 10.029 ng/mg LM, respectively, compared to the control of 19.692 ng/mg LM. In contrast, the treatment with *Ulva* extract increased the concentration of caffeoyl quinic acid to 23.382 ng/mg LM (Figure 8A). The rutin and the  $\alpha$ -chaconine were down regulated by CCF (rutin: 381 ng/mg LM; and  $\alpha$ -chaconine: 16.002 ng/mg LM) and BABA treatments (rutin: 345 ng/mg LM; and  $\alpha$ -chaconine: 13.579 ng/mg LM) compared to the control (rutin: 454 ng/mg LM and  $\alpha$ -chaconine: 20.648 ng/mg LM). However, the *Ulva* extract treatment did not differ from the control (rutin: 443 ng/mg LM; p value 0.6428; and  $\alpha$ -chaconine: 21.457 ng/mg LM; p value 0.5591) (Figure 8B-C).

### **3.3. The *Ulva* extract mobilizes the JA pathway and the CCF and BABA possibly mobilized the SA pathway**

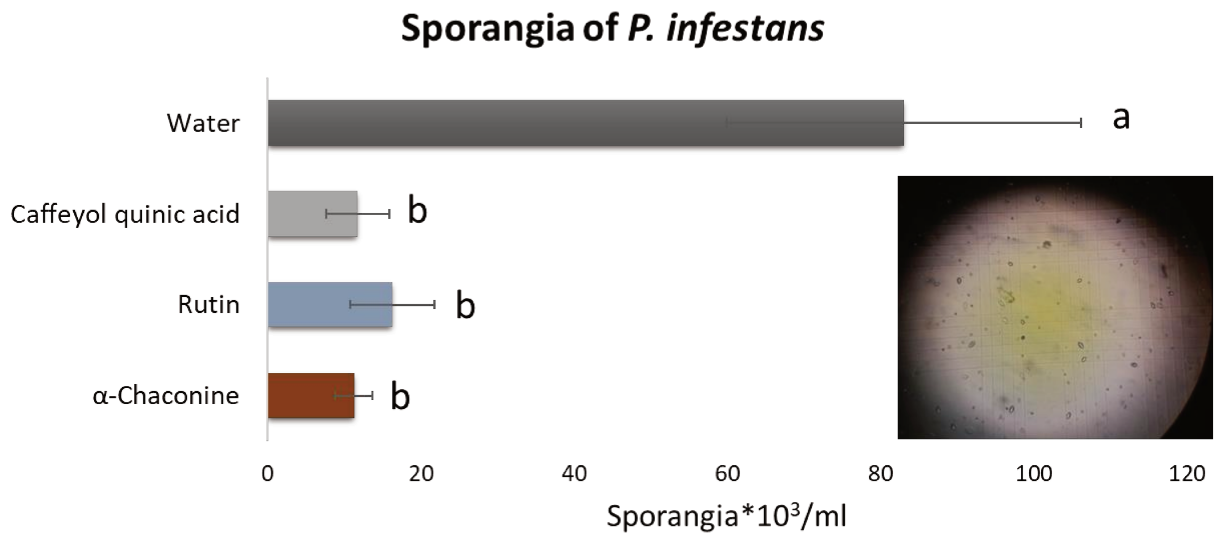
The phytohormones were analysed by UHPLC-MS/MS coupled to a QTrap 6500+mass spectrometer. The plant were analysed individually, as the previously analysis. SA and DHJA did not show significant differences between the treatments (p-value 0.3870, Figure 9A; and 0.9737, Figure 9C, respectively). *Ulva* extract significantly increased the production of JA and its precursor, the OPDA, compared to the control (Figure 9D and 9B, respectively). The JA-Ile, active form of JA, fail to increase after *Ulva* extract; however, it decreased with CCF and BABA (Figure 9E). The production of ACC, precursor of the ethylene, was also significant decreased by BABA compared to control (Figure 9F).





**Figure 10. Growth of *P. infestans* mycelium on culture medium with or without metabolites**

Mycelial growth was measured for 8 days after deposition of *Phytophthora infestans* on the culture medium containing the metabolites. Different letters indicate significant differences based Tuckey test ( $p$ -value  $<0.05$ ) ( $n=5$ ).



**Figure 11. Number of sporangia produced by *P. infestans* after 3 weeks**

Three metabolites were tested against the pathogen the α-chaconine, the rutin or the 4-O caffeoyl quinic acid. Different letters indicate significant differences based Tuckey test ( $p$ -value  $<0.05$ ) ( $n=5$ ).

**3.4. Antimicrobial effect of caffeoyl quinic acid, rutin and  $\alpha$ -chaconine against *P. infestans***

The effects of 3 metabolites (caffeoyl quinic acid, rutin and  $\alpha$ -chaconine) against *P. infestans*, were tested *in vitro* at the highest detected concentrations by measuring mycelial growth and the number of sporangia. The growth of *P. infestans* mycelium was measured for 8 days on a solid medium containing the targeted metabolite. Only the  $\alpha$ -chaconine, at 3dpi, significantly reduced mycelium growth compared to control (p.value 0.0196); other metabolites no changes were observed (Figure 10). However, both  $\alpha$ -chaconine and rutin tended to slow the growth rate of *P. infestans* during the first two days, while 4-O-caffeoyl quinic acid had no effect. On the third day, the growth rate is significantly slowed for treatment with  $\alpha$ -chaconine (p.value 0.0254) while rutin had no further effect. In the following days, the growth rate is not reduced with any treatment

After an additional two weeks of cultivation, the sporangia are collected and counted. The number of sporangia decreased significantly regardless of the metabolite tested (p.value 0.00449) (Figure 11). The number of sporangia produced per ml on media containing metabolites was about 6 times lower (between 10 and 16.10<sup>3</sup> sporangia/ml) than on the control medium (70.10<sup>3</sup> sporangia/ml).



### 4. Discussion

The mechanisms involved in plant immunity protect the plant, against pathogens that could limit their survival. Inside this process, the immunity system can produce toxic molecules (e.g. ROS), antimicrobial compounds (e.g. PR proteins and/or metabolites) *via* intermediate reactions that can impact the final responses (Boller and Felix, 2009). Previously we showed that the elicitor triggered different pathways during the PTI and that the metabolites produced by potato plants after treatment was elicitor-dependant (Martin *et al.*, 2019- under review). In this current study, we investigated the role of the CCF, the BABA and the *Ulva* extract in the reprogramming of defence gene and phytohormone production.

After treatment with *Ulva* extract, the *OPR3* gene was induced and OPDA and the JA were up regulated. These results could indicate that in potato plants, after 48h of treatment, *Ulva* extract mobilizes the JA pathway to trigger the defence induction. These results are consistent with those of Jaulneau *et al.* (2010) which also showed that in *Medicago truncatula* treated with an ulvan from *Ulva* spp, the signalization was also through the JA pathway. The authors have confirmed these results by using a mutant of *Arabidopsis thaliana* (jasmonic acid resistant - jar1.1 deficient). Conversely, in tomato plants, an ulvan of *Ulva lactuca* induced the SA pathway, the *PAL* gene which is a key enzyme of phenylpropanoid pathway; and phenolic compounds such as hydroxycinnamic derivatives, flavonoids and hydroxybenzoic acids (El Modafar *et al.*, 2012).

In contrast, the CCF and, particularly, BABA treatments down regulated both JA and ethylene pathways. CCF significantly reduced JA-Ile production and tended to reduce the JA. The BABA treatment significantly reduced JA-Ile, JA and ACC which is a precursor of ethylene. Although, CCF and BABA treatments did not show the SA-induction, they did, however, show the *PR* genes induction (*PR1* for BABA and CCF and *PR2* only for BABA) that are SA pathway activation markers. Moreover, these results are in accordance with Zhong *et al.* (2014); Saubeau *et al.* (2016); Meller *et al.* (2018); Thomas *et al.* (2019), who demonstrated that CCF and BABA can activate SA signaling pathway. Saubeau *et al.* (2016) observed on potato a SA peak 12h after CCF treatment and the *PRs* genes were up regulated from 24h-48h (Thomas *et al.*, 2019). In the same way, on soybeans, 15 SA pathway genes were up regulated 24h after BABA treatment (Meller *et al.*, 2018).



Together, these results may indicate that CCF and BABA induce the plant immunity via the SA pathway by a crosstalk with JA pathways (Thaler *et al.*, 2012). In our study, it is likely that, the SA pathway was induced at earlier times by both elicitors.

An interesting result showed that only CCF and BABA treatments up regulated the IAA-auxin (data not shown). The IAA is a phytohormone involved in diverse physiological processes such as cell elongation and tissue differentiation, and in particular, also responsible for immune response balancing (Fu and Wang, 2011). In plant-pathogen interactions, the auxin is known to be an antagonist of the SA-induced pathway, which has been subject of various reviews (Kazan and Manners, 2009; Fu and Wang, 2011; Denancé *et al.*, 2013). This result may indicate that hormonal balancing has already happened in plants treated with CCF and BABA.

### **4.1. Secondary metabolism was also modulated by the elicitors**

#### **4.1.1. Phenylpropanoid and flavonoid pathways**

The *Ulva* extract up regulated the phenylpropanoid (*PAL*, *C4H* and *4CL*), flavonoid (*CHS*) and alkaloid genes (*SSI*, *SGT1* and *SGT3*). These results were in accordance with Martin *et al.* (2019- under review) who showed the metabolites such as scopolin, caffeoyl quinic acid (both phenylpropanoids), prunin (flavonoid) and solanidine (glycoalkaloid) were produced after *Ulva* extract treatment. These families of compounds are part of the secondary metabolism responsible for the interaction of the plant with its environment, including protection against pathogens (Scossa *et al.*, 2016).

The up regulation of *PAL*, a key marker of activation of phenylpropanoid pathway, is usually correlated with the defence response against pathogens. The up regulation of the *PAL* could lead to the induction of the SA pathway (Kim and Hwang, 2014; Zhang *et al.*, 2017a). Indeed, the *Ulva* extract (El Modafar *et al.*, 2012; Abouraïcha *et al.*, 2015), the CCF (Kröner *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2019) and the BABA (Zhong *et al.*, 2014) have already been associated to defence responses through the *PAL* activation and consequently SA signalling. Our results showed that only the *Ulva* extract treatment activated the *PAL* gene which led to the production of caffeoyl quinic acid. In addition, the *CHS*, the first gene of the flavonoid pathway, was also activated after *Ulva* extract treatment. However, this induction did not lead to the production of rutin, a flavonoid antimicrobial compound. In potato, this metabolite is related to the resistance against the bacteria *Pectobacterium atrosepticum* (Kröner *et al.*, 2012). However, the mechanism is probably more elaborate, because Rojas Rodas *et al.* (2014) found another gene, the *flavonol-3-O-glucoside L-rhamnosyltransferase* encoding the rutin in soybean plant.



### 4.1.2. Alkaloid pathway

The activation of selected genes from the alkaloid pathway was an exclusivity of *Ulva* extract treatment. *SSI*, *STG1* and *SGT3* leading to the production of chaconine and solanine were increased with this treatment. This family of sterol glycoalkaloids, are firstly known not only by their toxicity to humans and animals but also by their beneficial effects in plant resistance (Friedman, 2006). As a result, it is being considered as a bio-insecticide against *Trogoderma granarium* beetle, pest of stored grains and cereal products (Nenaah, 2011). The *SGT1* and *SGT2* genes are positively correlated with the ratio between solanine and chaconine, respectively (Krits *et al.*, 2007). As the *STG2* gene was not up regulated by *Ulva* extract, we could presume that the plant chose the production of  $\alpha$ -solanine instead of  $\alpha$ -chaconine. Both metabolites are produced by the mevalonate pathway – where the *hmgr* enzyme catalyzes the reactions – then goes to squalene, which *SSI* gene. This gene is implicated in the production of cholesterol and solanidine, the specific potato steroidal glycoalkaloids-SGA (Ginzberg *et al.*, 2012). Krits *et al.* (2007) demonstrated that the high expression of *HMGR1* and *SSI* are strongly correlated with the production of SGA. *HMGR* transcripts subfamilies could be accumulated depending on the attack origin. *HMGR1* has been accumulated in response to wounding and *HMGR2* and *HMGR3* to pathogen infection (Ginzberg *et al.*, 2012). In our study, *Ulva* extract did not up regulate *HMGR2* but it will be interesting to test the two others genes, *HMGR1* and *HMGR3*.

### 4.2. Efficiency of metabolites against *P. infestans*

Three metabolites, rutin, caffeoyl quinic acid and  $\alpha$ -chaconine were tested *in vitro* against *P. infestans*. These metabolites strongly decreased the sporangia production, only  $\alpha$ -chaconine decreased the mycelium growth. For the  $\alpha$ -chaconine, these results are in accordance with Fewell and Roddick (1997). These authors showed that  $\alpha$ -chaconine inhibits the mycelial growth and spores germination of *Alternaria brassicicola* and *Phoma medicaginis*. *In vitro*, the rutin decreased the growth of *P. infestans* and *Pectobacterium atrosepticum*. However, in potato tubers tests, only the symptoms of *P. atrosepticum* were reduced (Kröner *et al.*, 2012). In our study, BABA and CCF strongly reduced the concentration of the three metabolites suggesting an inefficiency of these elicitors against *P. infestans*.





### 4.3. Specific induction of the defence responses by PAMPs of *P. infestans*

CCF treatment down regulated mainly defence responses studied in this work. Our results are in accordance with Wan *et al.* (2008). Indeed, these authors showed in a comparative study between the bacterial PAMPs, flagellin 22 - ET-Tu and a fungus PAMP, chitooctase, that the fungus elicitor down regulated more genes than the others PAMPs. Unexpectedly, the CCF also down regulated the *PR5a* gene characterised by its anti-oomycete and anti-fungus activities on different plant species (Ali *et al.*, 2018), such as *Vitis vinifera* against the oomycete *Plasmopara viticola* (He *et al.*, 2017) and wheat against the fungus *Puccinia triticina* (Zhang *et al.*, 2017b). These results could be explained by the fact that the CCF mimics the action of *P. infestans*. However, the induction of genes was already showed after 48h of CCF treatment on the BF15 potato genotype (Thomas *et al.*, 2019) as well as on others genotypes at different times (Saubeau *et al.*, 2016). In Désirée genotype, the entire defense mechanism could be induced before 48h. These results raise the question of the defense activation kinetics.

## 5. Conclusion

This study highlights the differential regulation of the potato immune system after treatment with three different elicitors confirming the induction of PTI depending on the elicitor. Indeed, it shows that the induction of PTI almost certainly involves the SA pathway with CCF and BABA treatments and JA pathway after treatment with *Ulva* extract. Moreover, the *Ulva* extract has been proved to be a strong activator of the main pathways of secondary metabolism. However, it will be necessary to validate the signaling way through other specific genes markers of both pathways such as an expressor of pathogenesis-related genes 1-*NPR1*, a central regulator of SA signaling and JA ZIM-domain-*JAZ* (Berens *et al.*, 2017). The differential induction could be explained by a specific perception of each elicitor (Martin *et al.*, 2019- submitted). Considering the new inputs the defence response kinetics could also explain this different activation of defence.



### 6. References

- Abouraïcha, E., El Alaoui-Talibi, Z., El Boutachfaiti, R., Petit, E., Courtois, B., Courtois, J., *et al.* (2015). Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Sci. Hortic.* 181, 121–128. doi:10.1016/j.scienta.2014.11.002.
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., *et al.* (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* 212–213, 29–37. doi:10.1016/j.micres.2018.04.008.
- Altamiranda, E. A. G., Andreu, A. B., Daleo, G. R., and Olivieri, F. P. (2008). Effect of  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. *Australas. Plant Pathol.* 37, 421. doi:10.1071/AP08033.
- Bari, R., and Jones, J. D. G. (2008). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488. doi:10.1007/s11103-008-9435-0.
- Bengtsson, T., Holefors, A., Witzell, J., Andreasson, E., and Liljeroth, E. (2014a). Activation of defence responses to *Phytophthora infestans* in potato by BABA. *Plant Pathol.* 63, 193–202. doi:10.1111/ppa.12069.
- Bengtsson, T., Weighill, D., Proux-Wéra, E., Levander, F., Resjö, S., Burra, D., *et al.* (2014b). Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics* 15, 315. doi:10.1186/1471-2164-15-315.
- Berens, M. L., Berry, H. M., Mine, A., Argueso, C. T., and Tsuda, K. (2017). Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 401–425. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035544.
- 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.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., and Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00155.
- Desender, S., Klarzynski, O., Potin, P., Barzic, M.-R., Andrivon, D., and Val, F. (2006). Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* Induce Different Defence Response Patterns in Tobacco, Tomato, and Potato. *Plant Biol.* 8, 636–645. doi:10.1055/s-2006-924102.
- El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfaiti, R., Abouraïcha, E., Zehhar, N., Petit, E., *et al.* (2012). Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Sci. Hortic.* 138, 55–63. doi:10.1016/j.scienta.2012.02.011.



## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

- Fewell, A. M., and Roddick, J. G. (1997). Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. *Mycol. Res.* 101, 597–603. doi:10.1017/S0953756296002973.
- Fisher, M. C., Henk, Daniel. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., *et al.* (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194. doi:10.1038/nature10947.
- Friedman, M. (2006). Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8655–8681. doi:10.1021/jf061471t.
- Fry, W. E. (2016). *Phytophthora infestans*: New Tools (and Old Ones) Lead to New Understanding and Precision Management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 529–547. doi:10.1146/annurev-phyto-080615-095951.
- Fry, W. E., Birch, P. R. J., Judelson, H. S., Grünwald, N. J., Danies, G., Everts, K. L., *et al.* (2015). Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. *Phytopathology* 105, 966–981. doi:10.1094/PHYTO-01-15-0005-FI.
- Fu, J., and Wang, S. (2011). Insights into Auxin Signaling in Plant-Pathogen Interactions. *Front. Plant Sci.* 2. doi:10.3389/fpls.2011.00074.
- Ginzberg, I., Thippeswamy, M., Fogelman, E., Demirel, U., Mweetwa, A. M., Tokuhisa, J., *et al.* (2012). Induction of potato steroidal glycoalkaloid biosynthetic pathway by overexpression of cDNA encoding primary metabolism HMG-CoA reductase and squalene synthase. *Planta* 235, 1341–1353. doi:10.1007/s00425-011-1578-6.
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., *et al.* (2008). Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Res.* 51, 47–57. doi:10.1007/s11540-008-9089-y.
- He, R., Wu, J., Zhang, Y., Agüero, C. B., Li, X., Liu, S., *et al.* (2017). Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. *Protoplasma* 254, 1579–1589. doi:10.1007/s00709-016-1047-y.
- Henry, G., Thonart, P., and Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *BASE*. Available at: <https://popups.uliege.be/443/1780-4507/index.php?id=8709><http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=16961&file=1&pid=8709> [Accessed February 28, 2019].
- Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., *et al.* (2010). Ulvan, a Sulfated Polysaccharide from Green Algae, Activates Plant Immunity through the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–11. doi:10.1155/2010/525291.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A. J., de Groot, K. E., Vleeshouwers, V. G. A. A., and Govers, F. (1997). A Gene Encoding a Protein Elicitor of *Phytophthora infestans* Is Down-Regulated During Infection of Potato. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 10, 13–20. doi:10.1094/MPMI.1997.10.1.13.



## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

- Kazan, K., and Manners, J. M. (2009). Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 14, 373–382. doi:10.1016/j.tplants.2009.04.005.
- Kim, D. S., and Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *J. Exp. Bot.* 65, 2295–2306. doi:10.1093/jxb/eru109.
- Krits, P., Fogelman, E., and Ginzberg, I. (2007). Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes. *Planta* 227, 143–150. doi:10.1007/s00425-007-0602-3.
- Kröner, A., Hamelin, G., Andrivon, D., and Val, F. (2011). Quantitative Resistance of Potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: Integrating PAMP-Triggered Response and Pathogen Growth. *PLoS ONE* 6, e23331. doi:10.1371/journal.pone.0023331.
- Kröner, A., Marnet, N., Andrivon, D., and Val, F. (2012). Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 23–31. doi:10.1016/j.plaphy.2012.05.006.
- Kushalappa, A. C., Yogendra, K. N., and Karre, S. (2016). Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Crit. Rev. Plant Sci.* 35, 38–55. doi:10.1080/07352689.2016.1148980.
- Kuźnicki, D., Meller, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Braszewska-Zalewska, A., Drozda, A., and Floryszak-Wieczorek, J. (2019). BABA-Induced DNA Methylome Adjustment to Intergenerational Defense Priming in Potato to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 10. doi:10.3389/fpls.2019.00650.
- Launay, Y. (2019). Induction des défenses précoces de plantes de pomme de terre par des éliciteurs de natures différentes. Rouen: Université de Rouen - Laboratoire Glyco-MEV EA4358.
- Le Boulch, P. (2018). Des éliciteurs d'origine différentes induisent-ils chez la pomme de terre des voies de défense spécifiques ? Rennes: INRA UMR IGEPP - Le Rheu.
- Liljeroth, E., Bengtsson, T., Wiik, L., and Andreasson, E. (2010). Induced resistance in potato to *Phytophthora infestans*—effects of BABA in greenhouse and field tests with different potato varieties. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 171–183. doi:10.1007/s10658-010-9582-4.
- Maillard, A., Ali, N., Schwarzenberg, A., Jamois, F., Yvin, J.-C., and Hosseini, S. A. (2018). Silicon transcriptionally regulates sulfur and ABA metabolism and delays leaf senescence in barley under combined sulfur deficiency and osmotic stress. *Environ. Exp. Bot.* 155, 394–410. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.07.026.
- Meller, B., Kuźnicki, D., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J., and Floryszak-Wieczorek, J. (2018). BABA-Primed Histone Modifications in Potato for Intergenerational Resistance to *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.01228.





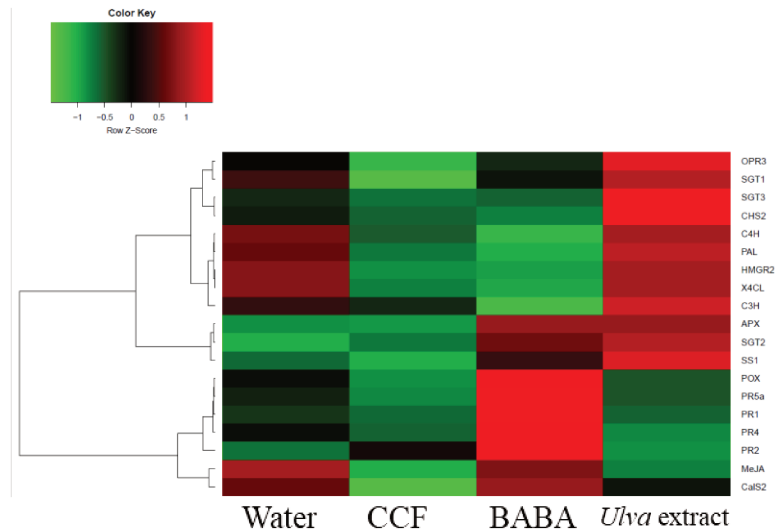
## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

- Meng, X., and Zhang, S. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 245–266. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102314.
- Nenaah, G. E. (2011). Toxic and antifeedant activities of potato glycoalkaloids against *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 47, 185–190. doi:10.1016/j.jspr.2010.11.003.
- Nowicki, M., Foolad, M. R., Nowakowska, M., and Kozik, E. U. (2012). Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding. *Plant Dis.* 96, 4–17. doi:10.1094/PDIS-05-11-0458.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e–445. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., and Bednarek, P. (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytol.* 206, 948–964. doi:10.1111/nph.13325.
- Rojas Rodas, F., Rodriguez, T. O., Murai, Y., Iwashina, T., Sugawara, S., Suzuki, M., *et al.* (2014). Linkage mapping, molecular cloning and functional analysis of soybean gene Fg2 encoding flavonol 3-O-glucoside (1 → 6) rhamnosyltransferase. *Plant Mol. Biol.* 84, 287–300. doi:10.1007/s11103-013-0133-1.
- Saubeau, G. (2014). Implication de la PAMPs-Triggered Immunity dans la résistance quantitative de la pomme de terre à *Phytophthora infestans*.
- Saubeau, G., Gaillard, F., Legentil, L., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V., Andrivon, D., *et al.* (2014). Identification of Three Elicitins and a Galactan-Based Complex Polysaccharide from a Concentrated Culture Filtrate of *Phytophthora infestans* Efficient against *Pectobacterium atrosepticum*. *Molecules* 19, 15374–15390. doi:10.3390/molecules191015374.
- Saubeau, G., Perrin, F., Marnet, N., Andrivon, D., and Val, F. (2016). Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 65, 342–352. doi:10.1111/ppa.12420.
- Scossa, F., Brotman, Y., de Abreu e Lima, F., Willmitzer, L., Nikoloski, Z., Tohge, T., *et al.* (2016). Genomics-based strategies for the use of natural variation in the improvement of crop metabolism. *Plant Sci.* 242, 47–64. doi:10.1016/j.plantsci.2015.05.021.
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., and Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17, 260–270. doi:10.1016/j.tplants.2012.02.010.
- Thomas, C., Mabon, R., Andrivon, D., and Val, F. (2019). The Effectiveness of Induced Defense Responses in a Susceptible Potato Genotype Depends on the Growth Rate of *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 32, 76–85. doi:10.1094/MPMI-03-18-0064-R.
- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S., *et al.* (2008). A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 471–481. doi:10.1105/tpc.107.056754.



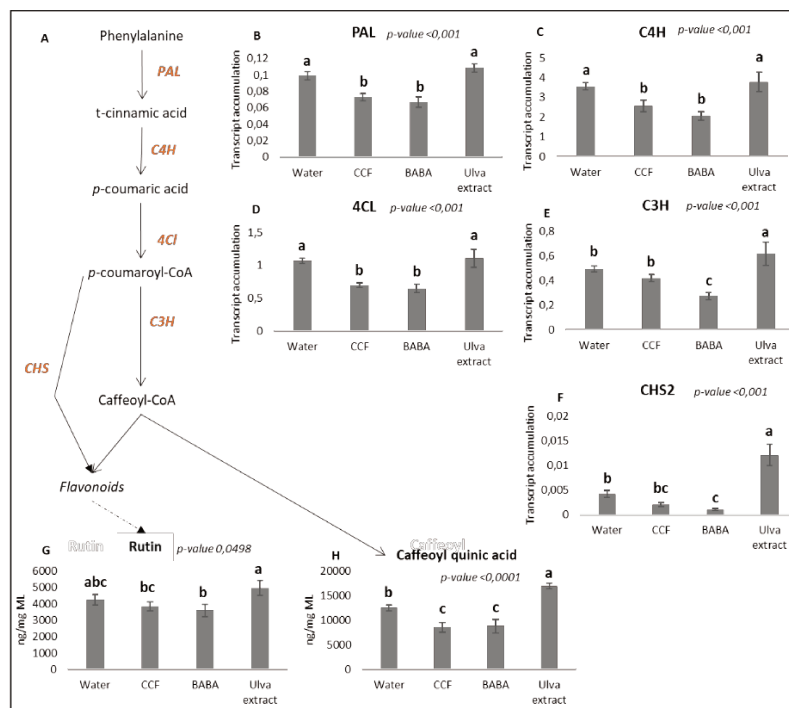
## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

- Zhang, C., Wang, X., Zhang, F., Dong, L., Wu, J., Cheng, Q., *et al.* (2017a). Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/s41598-017-07832-2.
- Zhang, Y., Yan, H., Wei, X., Zhang, J., Wang, H., and Liu, D. (2017b). Expression analysis and functional characterization of a pathogen-induced thaumatin-like gene in wheat conferring enhanced resistance to *Puccinia triticina*. *J. Plant Interact.* 12, 332–339. doi:10.1080/17429145.2017.1367042.
- Zhong, Y., Wang, B., Yan, J., Cheng, L., Yao, L., Xiao, L., *et al.* (2014). DL- $\beta$ -Aminobutyric Acid-Induced Resistance in Soybean against *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE* 9, e85142. doi:10.1371/journal.pone.0085142.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 414–420. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.003.



**Figure 2.** Représentation sous forme de Heatmap de la régulation des transcrits après traitement avec les éliciteurs.

L'accumulation des transcrits est basée sur la mesure de la distance de Pearson et organisé par le « clustering » de Ward. L'échelle de couleurs représente les réponses du gène : réprimées par le vert, neutres par le noir et induites par le rouge.



**Figure 3.** Expression des transcrits de la voie des phénylpropanoïdes quantifiés par RT-qPCR

A. Représentation schématique des voies des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes à partir des voies métabolomiques-KEGG. Les gènes en orange et en gras ont été analysés par RT-qPCR. Les métabolites en noir et en gras, la rutine et l'acide caffeoyl quinique, ont été quantifiés par UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. Les flèches pleines indiquent un lien direct entre les métabolites et les flèches pointillées indiquent un lien non direct avec le métabolite mentionné. L'accumulation des transcrits et la concentration des métabolites (ng/mg de matière lyophilisée-ML) sont illustrés par des histogrammes. B. PAL, C. C4H, D. 4CL, E. C3H, F. CHS2, G. rutine et H. acide caffeoyl quinique. Les barres représentent l'erreur-standard de deux expériences indépendantes (n=2). L'ensemble de données a été analysé au moyen d'un modèle linéaire à effets mixtes ajusté par REML. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le même test (valeur  $p < 0,05$ ).

### 1.3 Cas du génotype Bintje

Comme pour le génotype Désirée, les données obtenues avec l'essai réalisé en 2017 pour le génotype Bintje, ont été utilisées pour faire l'ensemble des analyses ciblées de phytohormones, de transcrits et de métabolites. Le protocole expérimental est décrit figure 1.

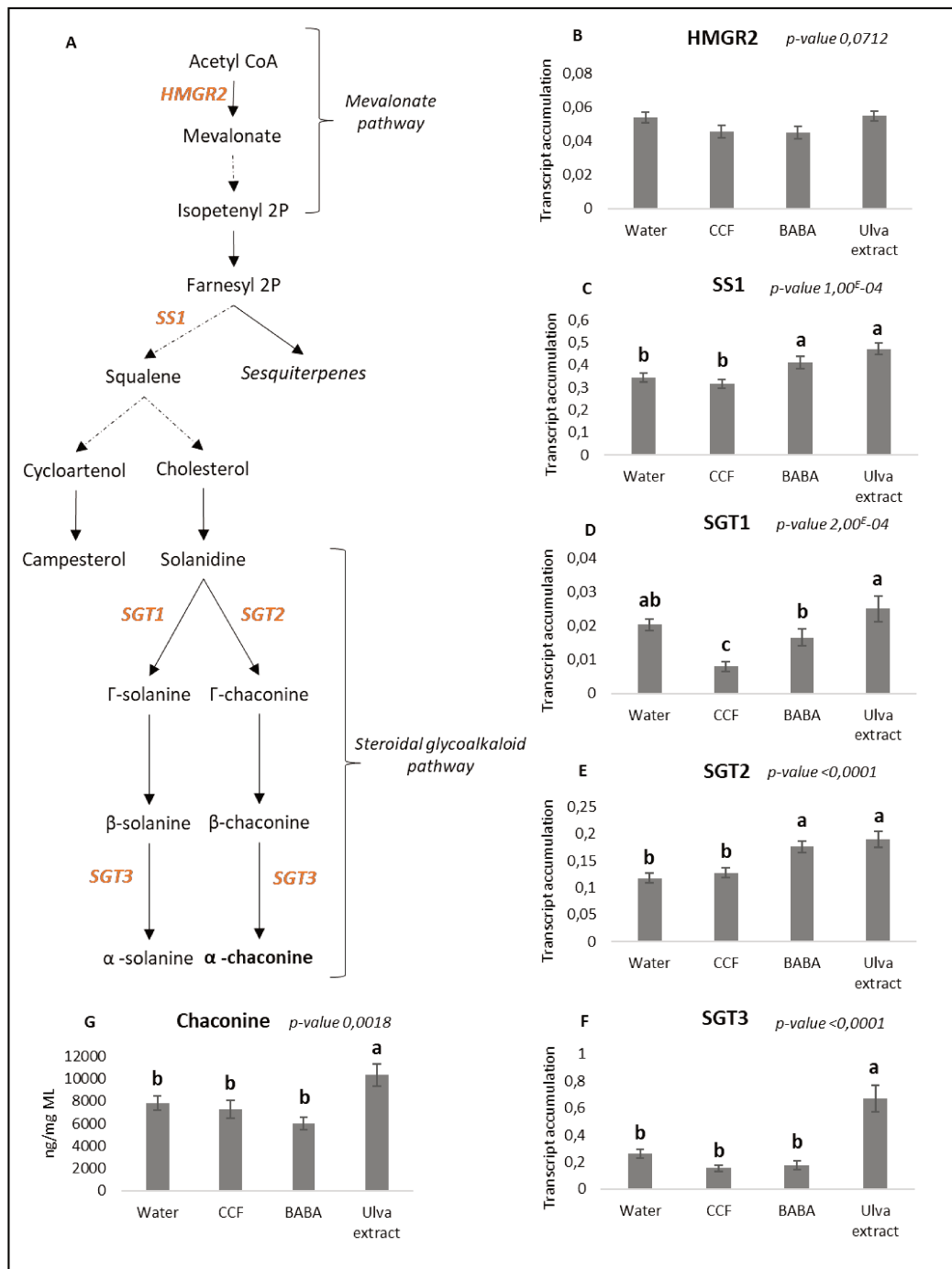
Les 20 gènes liés aux réponses de défenses et le gène de ménage ont été analysés à partir des échantillons obtenus sur les plantes traitées au CCF (8 mg/ml), au BABA (0,5 mM), à l'extrait d'*Ulva* (8 mg/ml) après 48h du traitement. Toutes les solutions d'éliciteurs ont été diluées dans l'eau+Tween 20 à 0,1% qui compose aussi la solution contrôle.

Une **analyse globale** des gènes choisis montre que chaque éliciteur régule les gènes de façon spécifique : le CCF est le seul à réprimer tous les gènes étudiés. Le BABA induit un groupe de gènes, les *PRs* et le gène *POX* alors que l'extrait d'*Ulva* les réprime, mais il induit tous les autres gènes, comme les gènes des phénylpropanoïdes et alcaloïdes. Il est à noter que certains gènes induits par l'extrait d'*Ulva* le sont aussi mais moins fortement, chez les plantes contrôles (Figure 2). Le gène *WRKY1* n'étant pas bien amplifié dans nos analyses n'est pas présenté dans les résultats suivants.

- **Analyse spécifique de la régulation des différentes voies métaboliques**

**La voie des phénylpropanoïdes** a été étudié *via* les gènes *PAL*, *C4H*, *4Cl*, *C3H* et *CHS2* qui codent des flavonoïdes. Deux résultats majeurs sont observés pour cette famille, (i) les gènes *PAL*, *C4H* et *4CL* ont été réprimés après traitement par le CCF et le BABA qui a également réprimé *C3H* et *CHS2*; (ii) les gènes *C3H* et *CHS2* ont par contre été induits par le traitement avec l'extrait d'*Ulva* (Figure 3). Pour compléter ces résultats, deux métabolites de cette famille ont été quantifiés : la rutine et l'acide caffeoyl quinique. L'acide caffeoyl quinique est induit significativement par l'extrait d'*Ulva* et réprimé significativement par le CCF et le BABA. Les autres éliciteurs réduisent la production de ce métabolite. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour la rutine par rapport au contrôle même si les éliciteurs ne présentent pas le même comportement les uns par rapport aux autres (Figure 3).

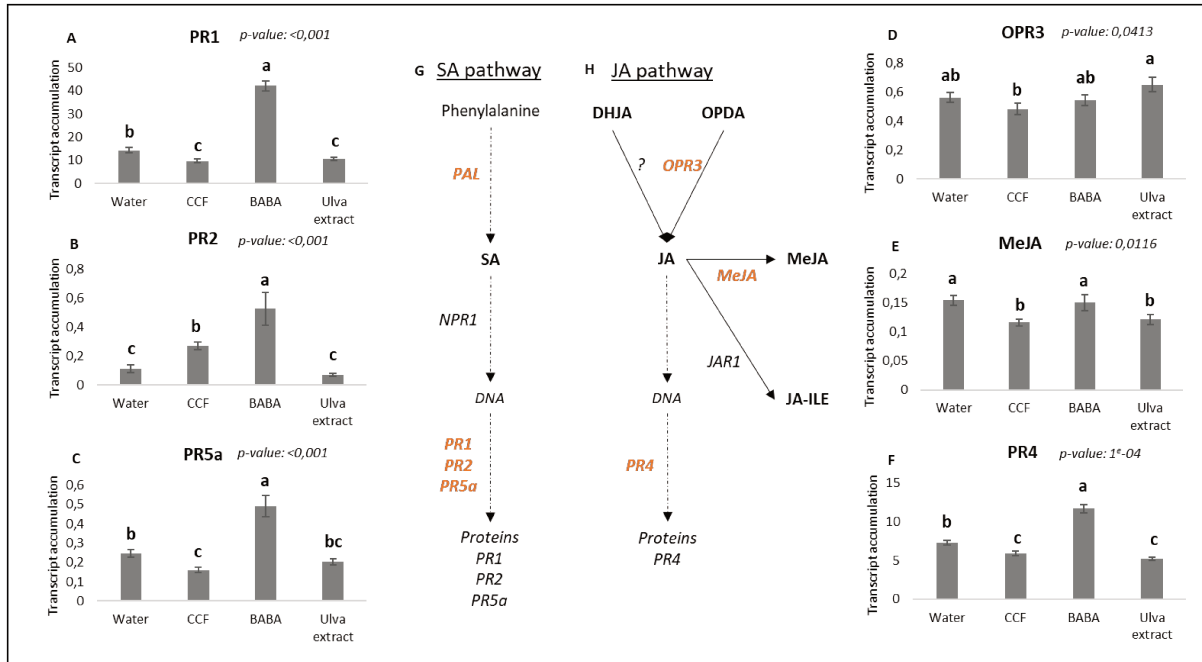
Concernant la **voie des alcaloïdes**, le gène *HMGR* en amont de cette voie n'est régulé par aucun traitement, mais les autres gènes ont été régulés par les éliciteurs : l'extrait d'*Ulva* a induit les gènes *SSI*, *STG2* et *SGT3* par rapport au contrôle et le BABA, *SSI* et *STG2*. Par contre, le CCF n'a pas induit les gènes de cette voie, mais a réprimé le *STG1*. Cependant, bien



**Figure 4. Expression des transcrits de la voie des terpénoïdes et des alcaloïdes quantifiés par RT-qPCR**

A. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des terpénoïdes et des alcaloïdes ciblant la voie des glycoalcaloïdes stéroïdiens à partir des voies métabolomiques de KEGG. Les gènes en orange et en gras ont été analysés par RT-qPCR. Le métabolite en noir et en gras,  $\alpha$ -chaconine, a été quantifié par UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>. Les flèches pleines indiquent un lien direct entre les métabolites et les flèches pointillées indiquent un lien non direct avec le métabolite mentionné.

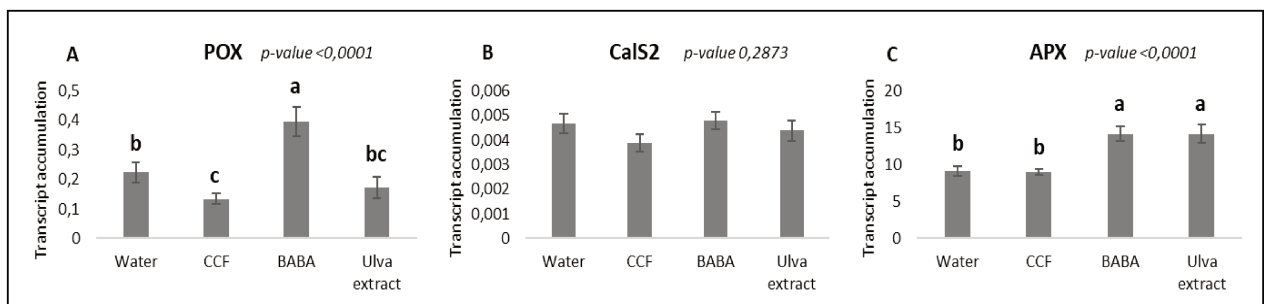
L'accumulation des transcrits et la concentration des métabolites (ng/mg de matière lyophilisée-ML) sont illustrées par des histogrammes. B. HMGR2, C. SS1, D. SGT1, E. SGT2, F. SGT3 et, G. chaconine. Les barres représentent l'erreur-standard de deux expériences indépendantes (n=2). L'ensemble de données a été analysé au moyen d'un modèle linéaire à effets mixtes ajusté par REML. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le même test (valeur  $p < 0,05$ ).



**Figure 5. Expression des transcrits des protéines PRs et des gènes de la voie de l'acide jasmonate quantifiés par RT-qPCR.**

Les gènes cibles régulés ont été analysés par RT-qPCR. L'accumulation des transcrits est illustrée par des histogrammes. A. PR1, B. PR2, C. PR3, D. OPR3, E. MeJA et F. PR4. Les barres représentent l'erreur-standard de deux expériences indépendantes. L'ensemble de données a été analysé au moyen d'un modèle linéaire à effets mixtes ajusté par REML. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le même test (valeur  $p < 0,05$ ).

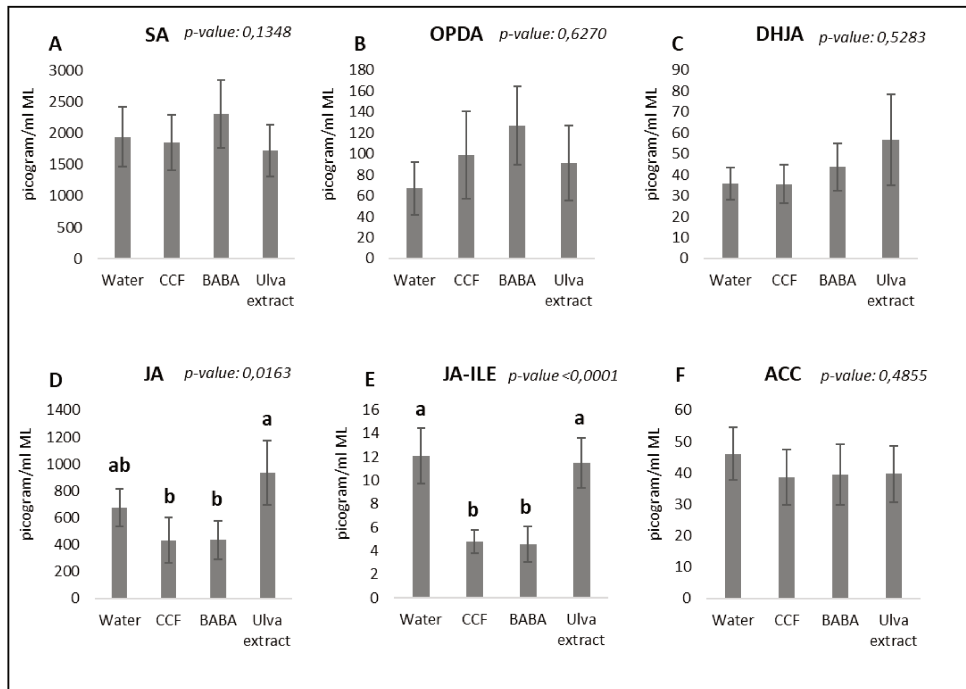
Représentations schématiques des voies de SA (G) et JA (H) basées sur des voies métabolomiques de KEGG et Ali et al (2018). Les gènes en orange et en gras ont été analysés par RT-qPCR et les gènes noirs n'ont pas été analysés. Les phytohormones en noire et en gras, SA, DHJA, OPDA, JA, MeJA et JA-ILE ont été quantifiées par UHPLC-MS/MS. Les flèches pleines indiquent un lien direct entre les métabolites et les flèches pointillées indiquent un lien non direct avec le métabolite mentionné.



**Figure 6. Expression des transcrits au niveau de la paroi végétale quantifiés par RT-qPCR**

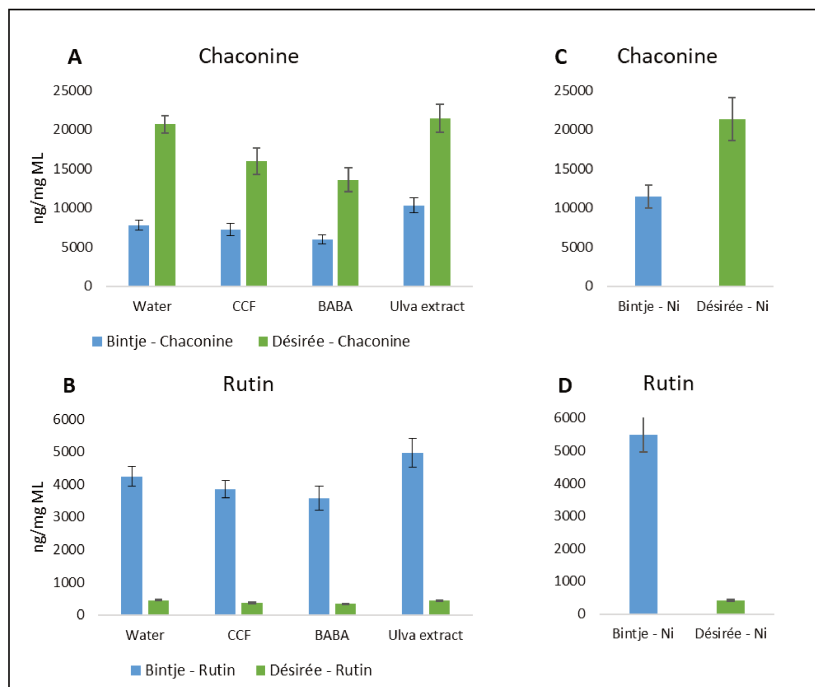
L'accumulation des transcrits est illustrée par des histogrammes. A. POX, B. Cals2 et C. APX. Les barres représentent l'erreur-standard de deux expériences indépendantes. L'ensemble de données a été analysé au moyen d'un modèle linéaire à effets mixtes ajusté par REML. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le même test (valeur  $p < 0,05$ ).





**Figure 7. Quantification des phytohormones issues du métabolisme secondaire**

A.SA, B. OPDA, C. DHJA, D. JA, E. JA-ILE et F. ACC. Les phytohormones ciblées ont été analysées par UHPLC-MS/MS. Les histogrammes représentent les concentrations en picogramme/ml de matière lyophilisée (ML) des phytohormones en fonction des traitements. Les barres représentent l'erreur-standard de deux expériences indépendantes ( $n=12$ ). L'ensemble de données a été analysé au moyen d'un modèle linéaire à effets mixtes ajusté par REML. Différentes lettres indiquent des différences significatives basées sur le même test (valeur  $p < 0,05$ ).



**Figure 8. Les métabolites A. rutine et B. chaconine concentrés différemment entre les génotypes**

A. Chaconine et B. Rutine, la concentration des métabolites (ng/mg de matière lyophilisée-ML) est illustrée par des histogrammes. Les barres d'erreur représentent l'erreur-standard de deux expériences indépendantes ( $n=12$ ).

## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

que le BABA et l'extrait d'*Ulva* ont induit les gènes *STGs*, seul le traitement avec l'extrait d'*Ulva* a induit une production significative de l' $\alpha$ -chaconine (Figure 4).

**Les gènes *PR*** sont tous fortement induits par le traitement avec le BABA. Le CCF induit seulement le gène *PR2* et réprime les gènes *PR1*, *PR4* et *PR5a*. L'extrait d'*Ulva* a réprimé les gènes *PR1* et *PR4*. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la phytohormone JA n'ont pas été induits. Le gène *MeJA* a été réprimé par le CCF et l'extrait d'*Ulva* (Figure 5).

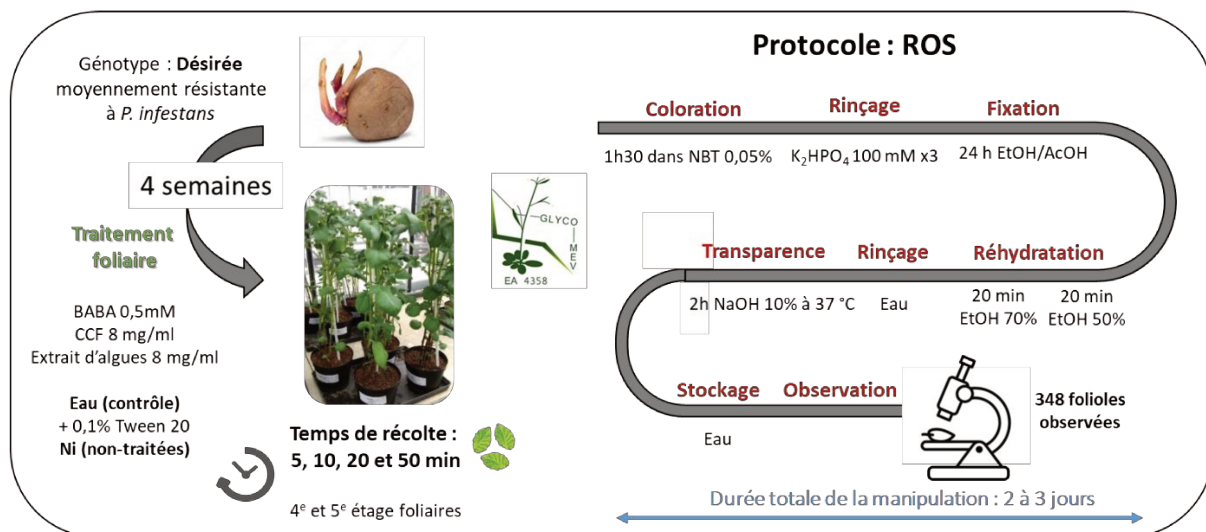
Les gènes liés à la paroi végétale, *POX* et *APX*, montrent des différences significatives entre les éliciteurs et le contrôle : le traitement avec le BABA induit les deux gènes et l'extrait d'*Ulva* seulement *APX* (Figure 6).

**Analyse des phytohormones**, la majorité des phytohormones analysées n'a pas présenté de différences significatives entre les éliciteurs et le contrôle (Figure 7). Aucun éliciteur n'a induit la production de SA, de JA et de l'éthylène, phytohormones liées à la défense des plantes, bien que le CCF et le BABA ont tendance à diminuer la production de JA alors que l'extrait d'*Ulva* a tendance à l'augmenter. Par contre, le JA-ILE, produit du JA, est fortement réduit par le CCF et le BABA (Figure 7).

### 1.3.1. Différences entre les génotypes

Globalement les résultats obtenus pour l'induction des transcrits sont proches bien que les différences entre les traitements éliciteurs soient moins marquées chez Bintje.

A l'inverse, la concentration en phytohormones et en métabolites varie fortement entre les deux génotypes. Par exemple, l' $\alpha$ -chaconine est plus concentrée chez le génotype Désirée mais la rutine est plus concentrée chez Bintje (Figure 8A-B). Ces différences de concentration ont également été observées après analyse des données obtenues sur les plantes non traitées (NI) (Figure 8C-D) soulignant de nouveau l'effet constitutif apporté par le fond génétique.



**Figure 9. Protocole expérimental pour l'analyse de ROS réalisé au laboratoire GLYCOMEV**

Le BABA, le CCF et l'extraits d'*Ulva* 8 mg/ml + le contrôle ont été testés sur le génotypes *Désirée* âgés de 4 semaines. 50 plantes ont été utilisées au long de l'essai et 348 folioles observées. Les échantillons sont colorés pendant 1h30 dans le NBT à 0,05%, rincés dans tampon phosphate à 100 mM pour 3 fois. La coloration est fixée pendant 24h dans éthanol et l'acide acétique (3/1 : v/v). Ensuite les folioles sont incubées dans 10% d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 37°C pendant 2h. Elles sont rincées à l'eau et réhydratées dans l'éthanol 70% et 50% pendant 20 min pour chaque solution. Les folioles sont stockées dans l'eau et observées à la loupe binoculaire. A partir de la récolte des folioles, le protocole peut durer jusqu'à 3 jours.

**Tableau 2. Pourcentage des folioles qui témoignent de la présence de ROS par rapport au contrôle négatif sur la totalité des folioles traitées.**

Temps de cinétique (min)		5	10	20	50
% de folioles avec la présence de ROS, par rapport au contrôle négatif	BABA	0,0%	10,0%	5,0%	4,9%
	CCF	4,8%	33,3%	18,2%	0,0%
	Extrait d' <i>Ulva</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

### 2. Question 2 : Est-ce que les éliciteurs induisent des ROS et des modifications de la paroi végétale ?

#### 2.1 Stratégie et Matériel et Méthodes

##### 2.1.1 Stratégie

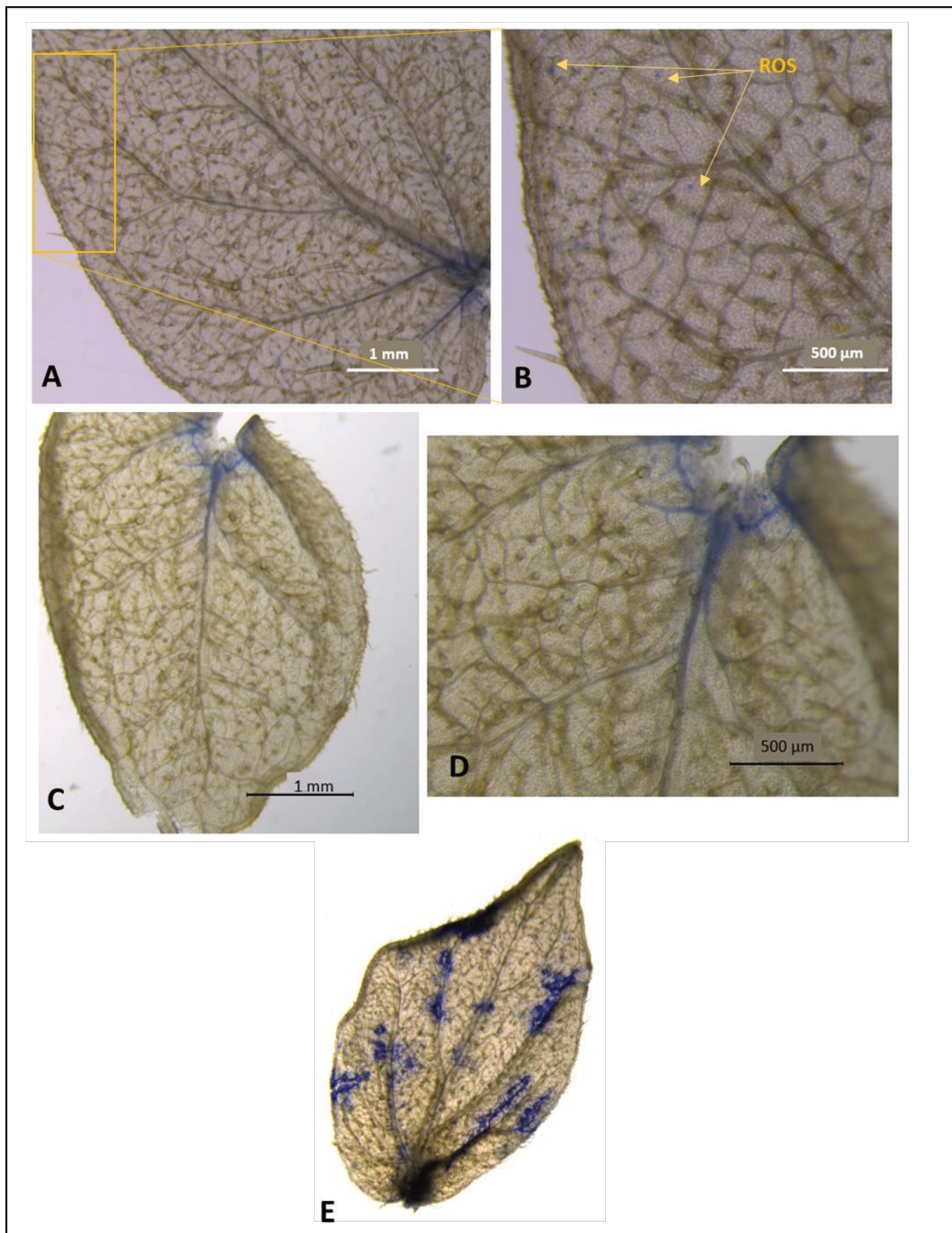
L'étude a été concentrée sur le génotype Désirée car elle a nécessité la mise au point des protocoles expérimentaux pour l'analyse des ROS et des monosaccharides et généré un volume d'analyses qui n'a pu être étendu au génotype Bintje dans le temps imparti. Les résultats obtenus pendant le stage de Yuna Launay pour la production des ROS sont préliminaires, mais nous permettent de dégager des pistes sur l'induction de ces réactions par les éliciteurs. Les travaux concernant la paroi végétale sont encore en cours d'analyse. Seuls les résultats obtenus pour le ROS sont présentés ci-dessous.

##### 2.1.2 Mise en œuvre expérimentale

Cette analyse a été réalisée sur les plantes de Désirée cultivées en serre à Rouen dans des conditions similaires à celles réalisées à l'IGEPP, la température est de 20°C, l'hygrométrie de 60% et la photopériode de 18h de jour et 6h de nuit. Après 4 semaines, les plantes ont été traitées avec le CCF, le BABA, l'extrait d'*Ulva*. Toutes les solutions ont été aussi diluées dans l'eau+Tween20 0,1% qui est la solution contrôle de l'essai (Figure 9). Les folioles ont été récoltées au 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> étage foliaire à des temps de cinétique précoces : 5, 10, 20 et 50 min. 50 plantes ont été cultivées et l'observation a porté sur 348 folioles (Figure 9). Pour la faisabilité des observations, ces plantes ont été cultivées à différentes semaines. Le nombre de folioles récoltées par plante et par essai dépendait du nombre des folioles produites par chaque plante.

Pour l'expérimentation, 12 plantes ont été traitées avec la solution contrôle (168 folioles observées), 9 plantes avec le BABA (162 folioles observées), 13 avec le CCF (114 folioles observées) et 9 avec l'extrait d'*Ulva* (72 folioles observées). 10 plantes ont été réservées à la modalité Ni (120 folioles observés).

La mise en évidence des ROS a été faite en utilisant le « Nitro Blue Tetrazolium » (NBT) 0,05% (m/v) préparé dans du tampon phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,5), les folioles prélevées étaient incubées pendant 1h30 dans cette solution. Après trois rinçages des folioles avec cette même solution de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, elles ont été fixées pendant 12h dans un mélange éthanol : acide acétique (3/1 v/v) afin d'éliminer la chlorophylle.



**Figure 10. Evaluation de la production de ROS sur folioles du génotype Désirée visualisée par des régions ou point bleu. La production de ROS au niveau de base des folioles est causée par le stress de la coupe et n'était pas pris en compte dans les résultats.**

(A-B) Folioles traitées avec le CCF+Tween20 à 0,1% récolté après 10 min du traitement à 1 mm (A) ou 500 μm (B) d'approximation. (C-D) Folioles contrôle traitées à l'eau+Tween20 à 0,1%. (E) Foliole Ni stressée avec une pince pour servir de contrôle positive de la présence de ROS.

## Chapitre II : Mécanismes de l'activation de défense

Ce processus a été répété quand les folioles n'étaient pas jugées encore assez transparentes. Ensuite, elles étaient réhydratées avec de l'éthanol à 70 % pendant 20 min, puis de l'éthanol 50 % (v/v) pendant 20 min. Enfin les folioles ont été rincées dans de l'eau également pendant 20 min. Elles sont ensuite traitées avec du NaOH 10 % (m/v) à 37 °C pendant 2h pour rendre les tissus transparents.

La présence de ROS se traduit par une coloration bleue foncée visualisée à la loupe binoculaire (Leica M125, caméra DFC295), face supérieure ou inférieure, suivant le protocole développé pour les folioles de pomme de terre par Yuna Launay (Figure 9).

### **2.2 Résultats préliminaires: Le traitement BABA et principalement le traitement CCF induisent la production de ROS**

348 folioles traitées avec les éliciteurs ont été observées après 5, 10, 20 et 50 minutes de traitement. Globalement, après observation de toutes les folioles, la production des ROS n'était pas très marquée comparée à celle induite par une blessure (Figure 10E). Les figures 10A et 10B montrent une foliole avec une production de ROS (point bleu) par rapport à une foliole contrôle dans les figures 10C et 10D. Cette production a été observée majoritairement sur des plantes traitées avec le CCF, très faiblement avec le BABA et pas du tout avec l'extrait d'*Ulva* quel que soit le temps de cinétique.

Le tableau 2 présente le pourcentage de folioles présentant des ROS. Avec le traitement CCF, à 5 min, 4,8% des folioles présentent des ROS, à 10 et 20 min, 33,3% et 18,2% des folioles ont montré des ROS, à 50 min, aucun ROS n'est observé. Après traitement avec le BABA, les détections sont observées à partir de 10 min avec 10% des folioles avec du ROS et 5% et 4,9% à 20 et 50 minutes, respectivement.

Ces résultats préliminaires restent à confirmer car ils reposent sur une analyse qualitative de la présence ou absence des ROS et sur un nombre de folioles différent entre les traitements. Une analyse d'image pourrait permettre de quantifier les ROS observés.



Cette deuxième étude a ciblé des gènes appartenant à des voies du métabolisme secondaire bien représentées dans notre première étude comme celles des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes, et des alcaloïdes. Des gènes complémentaires liés à la défense comme les gènes *PR*, les gènes liés au renforcement de la paroi végétale et aux phytohormones ont été ajoutés dans l'analyse.

Le traitement avec l'extrait d'*Ulva* a induit les voies des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes ce qui a confirmé la traduction des métabolites des mêmes familles observées dans le premier chapitre. Les gènes liés aux phytohormones révèlent aussi la signalisation par la voie du JA démontrée pour l'extrait d'*Ulva*.

Par contre, les traitements avec le CCF et le BABA ont réprimé la majorité des gènes liés au métabolisme secondaire. Les gènes des alcaloïdes n'étaient induits ni par le CCF, ni par le BABA, cependant les métabolites de cette famille ont été identifiés par les analyses métabolomiques non-ciblées suite à ces deux traitements.

Les résultats obtenus suggèrent fortement que le BABA et le CCF utilisent la voie du SA grâce à l'activation des gènes *PR* principalement par le traitement BABA. Nous avons déjà suggéré que ces deux traitements pourraient induire la production de ROS et les travaux réalisés à Rouen vont dans le même sens mais demandent à être confirmés par une quantification.

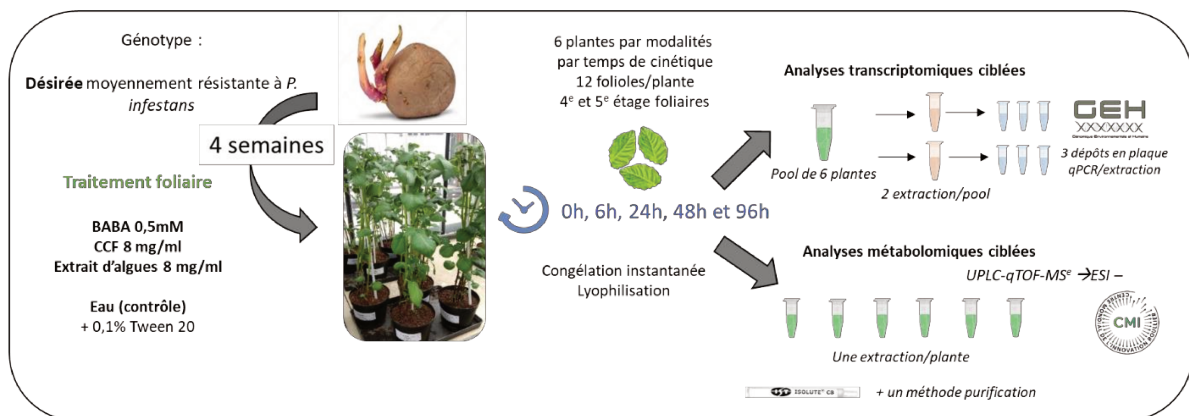
Il est également intéressant de noter que nos résultats montrent bien une corrélation positive entre les gènes de la voie des phénylpropanoïdes et des stéroïdes alcaloïdes. Ces gènes sont corrélés négativement avec les gènes *PR2* et *POX*. Au niveau du mécanisme de l'activation de défense, ces gènes pourraient être utilisés comme marqueurs pour identifier le choix fait par la plante de voies de défense.

En conclusion, l'effet « éliciteurs » est bien confirmé par les résultats obtenus dans ce deuxième chapitre. L'effet « génotype » a aussi été observé au niveau de la concentration de certains composés différemment exprimés entre Bintje et Désirée.





**CHAPITRE III**  
**Dynamique des réponses de défense induites par les**  
**éliciteurs**



**Figure 1. Design expérimental du test de cinétique de réponse de défense réalisé en 2019**

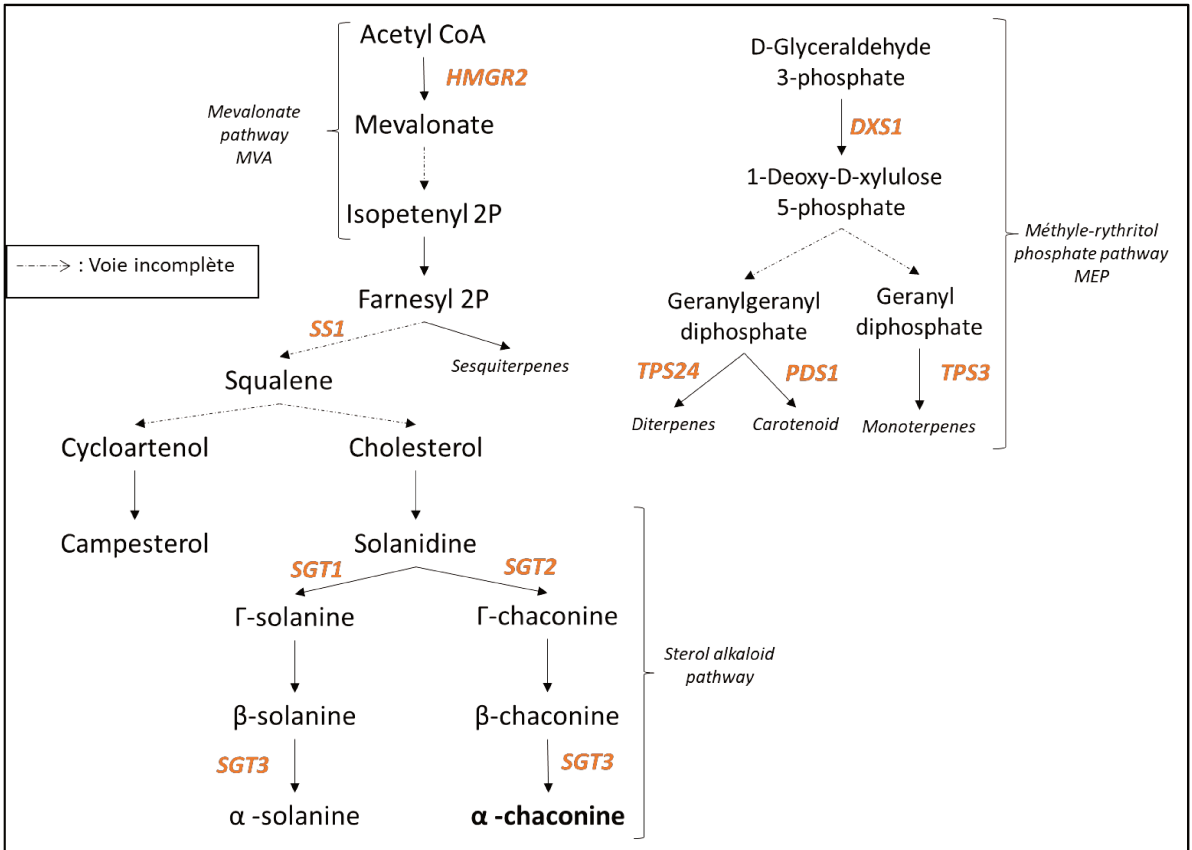
### I. Introduction

Les chapitres antérieurs ont exploré les réponses de défense au sein de la PTI 48h après traitement par les différents éliciteurs. Les résultats majeurs de ces analyses ont montré que chaque éliciteur induit un profil métabolique et un profil de transcrits différents mis en place par la pomme de terre pour répondre au stimulus du traitement. L'intégration de l'ensemble des données nous ont conduits aux observations suivantes (i) l'induction de gènes *PRs* par le BABA et le CCF serait conditionnée par l'activation du SA (van Loon *et al.*, 2006) dont l'accumulation n'a pas été observée à 48h, (ii) à l'inverse, pour ces mêmes éliciteurs, la présence des alcaloïdes est vérifiée mais les gènes impliqués dans cette induction ne sont pas activés et (iii) concernant l'extrait d'*Ulva* les transcrits et les métabolites de la famille des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes sont exprimés tous les deux à 48h. Ces éléments nous ont conduits à poser l'hypothèse que cette induction différentielle des défenses pourrait être due à une cinétique d'induction spécifique à chaque éliciteur pouvant remettre en cause l'effet fort de l'origine des éliciteurs. Cette hypothèse a été testée dans le cadre de la thèse *via* l'encadrement du stage de Master 2 de T. Legros (2019).

### II. Stratégie et Matériel et Méthodes

Pour cette étude, nous avons choisi de travailler sur le génotype, Désirée induit par le CCF (8 mg/ml), le BABA (0,5 mM) et l'extrait d'*Ulva* (8 mg/ml) dilués dans la solution eau+Tween20 à 0,1 % (solution contrôle) utilisés dans les mêmes conditions que précédemment. Les plantes ont été cultivées en serre 4 semaines puis pulvérisées par les éliciteurs sur l'ensemble des feuilles jusqu'à ruissellement. Douze folioles par plante ont été prélevées à 0h, 6h, 24h, 48h et 96h respectivement avec pour objectif d'étudier à la fois les réponses précoces et tardives des plantes. L'échantillonnage étant destructif, chaque modalité de traitement à chaque temps était constituée de 6 plantes par répétition. Les folioles récoltées au 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> étage foliaire en partant de l'apex ont été immédiatement plongées dans l'azote liquide puis lyophilisées et broyées, comme décrit dans les chapitres antérieurs (Figure 1). La modalité non-induit (Ni) a aussi été échantillonnée dans cet essai, mais n'a pas encore été complètement analysée c'est pourquoi elle ne sera pas présentée dans ce chapitre.

***NB : Deux essais indépendants ont été réalisés, mais seul un des deux a pu être analysé et présenté dans ce chapitre. Le deuxième essai est en cours d'analyse.***



**Figure 2. Voies des terpènes et des stérols alcaloïdes**

### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

Les transcrits et les métabolites ont été ciblés sur les mêmes voies de défense que celles précédemment décrites mais nous avons ajouté plus de gènes et de métabolites liés à la voie des terpénoïdes. Ce choix a été fait car cette voie était bien représentée dans les analyses non ciblées. Les gènes de la voie des terpénoïdes (Figure 2) sont désignés et validés avec le protocole développé par P. Le Boulch (2018). Les nouveaux gènes sont : *1-D-deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS1)*, *phytoene desaturase (PDS)*, *camphene/tricyclene synthase (TPS3)* et *ent-kauren synthase (TPS24)*. Au total, 20 gènes ont été analysés par RT-qPCR à la plateforme GEH (Université de Rennes 1). Au niveau des analyses métabolomiques, nous avons inclus dans cette étude : des **phénylpropanoïdes**, – 4-O caffeoyl quinic acid, caffeic acid, acide shikimique et l-tyrosine (acides aminés en amont de la voie de phénylpropanoïde) ; des **flavonoïdes** - rutin, rhoifolin et prunin ; des **alcaloïdes** –  $\alpha$ -chaconine ; et des **terpénoïdes** – (R)-mevalonic acid ; des **phytohormones** – acide salicylique-SA, 2-OPDA et acide jasmonique-JA. Nous avons également ciblé – la cellobiose, le (6R) -5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride et l'acide dihydrofolique, métabolites identifiés dans le chapitre I.

Les analyses métabolomiques ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le chapitre II. Cependant, pour mieux cibler les métabolites étudiés deux étapes ont été adaptées : (i) une étape de purification des échantillons a été ajoutée et (ii) le temps de détection a été modifié (*cf* partie Matériels et Méthodes).



### III. Résultats

#### 1. Article : The dynamics of defence induction depend on the elicitors

Les résultats majeurs sont présentés sous forme d'un article intitulé : « *The dynamics of defence induction depend on the elicitors* » en préparation pour publication. Cependant ils devront être validés par les analyses du deuxième essai et par un approfondissement des données de cinétique.

##### 1. Introduction

On the world, since the 1930s, the use of pesticides for crop protection has contributed to higher yields (Oerke, 2006). This scenario has intensified after in the 1950s after the green revolution. However, the environmental contaminations and toxic effects on animals and humans have led to think of alternatives more sustainable in crop protection (Carvalho, 2017). Resistant varieties, integrated pest management and biocontrol methods are the mainly alternatives to reduce the intensive use of pesticides (Syed Ab Rahman *et al.*, 2018). Plant have natural defence mechanisms which enhanced throughout the evolution (Jones and Dangl, 2006). The plant are able to perceive the pathogen's molecules or Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) which triggers the defence response. This reaction set is a part of the PAMPs-Triggered Immunity (PTI) (Bigeard *et al.*, 2015). The induction of the PTI has been explored in biocontrol techniques using PAMPs or exogenous molecules called elicitors.

Molecules essential to the pathogens' fitness such as the flagellin (flg22) in bacteria or small peptide (Pep13) in oomycetes were characterised as a PAMPs (Schwessinger and Zipfel, 2008). From *Phytophthora infestans*, an important pathogens of potato crops, a cocktail of PAMPs, called as a concentrated culture filtrated (CCF) (Saubeau *et al.*, 2014), were tested in different potatoes genotypes. The CCF mainly induced SA pathway related-genes such as *PR* genes on different times. In this study, the resistant genotype, Ackersegen treated by the CCF before inoculation with *P. infestans*, strongly induced the *PR* genes from 12h until 48h. On the other hand, for the susceptible genotype, Bintje, the *PR* genes were less expressed at 6h and 48h (Saubeau *et al.*, 2016). After treatment with CCF and inoculation with *P. infestans*, the elicitor led to decrease the symptoms due to the pathogen (Thomas *et al.*, 2019a).

Different synthetic elicitors such as the benzothiadiazole (BTH), an analogue of the salicylic acid (SA) and the  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA), a non-protein amino acid are small





### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

drug-like molecule inductors of plant defence (Bektas and Eulgem, 2015). The BTH was tested against several pathogens in different crops (Zhou and Wang, 2018). For instance, in grapevine, this elicitor was applied 24h before the pathogen inoculation and it induced the *PR* genes and other metabolites that inhibited until 98% of downy (*Plasmopara viticola*) and powdery (*Erysiphe necator*) mildews growth (Dufour *et al.*, 2013). In tobacco, the BTH, applied 96h before the pathogen inoculation, induced a resistance against the powdery mildew (*Oidium neolycopersici*) (Achuó *et al.*, 2004) via the SA pathway. The BABA has also been tested on different crops and against important pathogens such as *P. infestans*. In tomato crops, the BABA treatment, 7 days before the inoculation, showed the reduction of the symptoms area, the sporulation capacity and the infection efficiency of the pathogen (Sharma *et al.*, 2010). On potato crops, treatment with BABA, 48h before the inoculation, induced the cell wall responses with a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, 12h post-inoculation or infection (hpi). This treatment also induced the hypersensitive-like response (HR) 48 hpi against *P. infestans* infection (Bengtsson *et al.*, 2014a). The BABA also induced a resistance against aphids on soybean crop. Applied 72h before the infestation, it increased the lignin biosynthesis 24 hpi and the production of isoflavonoids, 120 hpi (Yao *et al.*, 2019).

Extracts of plants and algae are natural products that have been used to increase defence responses. For instance, an extract of olive tree were applied on potato tubers against the bacterial disease soft rot caused by *Pectobacterium atrosepticum* and *P. carotovorum*. The tubers were treated 24h with the elicitor and inoculated with the two strains of *Pectobacterium* respectively. The authors showed a significant decrease of the soft rot symptoms at 4 dpi (Ouanas *et al.*, 2017). This extract increased the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity 7.5h after treatment. The polysaccharide Ulvan, extract of a green alga *Ulva lactuca* applied 24h before inoculation, has induced the symptoms reduction of different pathogens such as *Verticillium dahlia* in olive trees 30 days post-inoculation (dpi) (Ben Salah *et al.*, 2018). Tomatoes seeds were treated with the same elicitor which reduced by half at 45 dpi the plant mortality by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (El Modafar *et al.*, 2012). Both studies with *U. lactuca* extracts and olive tree extracted showed that after treatment, evaluated the PAL activity increased in the olive tree and in the tomatoes. El Modafar *et al.* (2012) suggest that the resistance depended on the induction of salicylic acid pathway. All these examples have shown that various elicitors are able to decrease the pathogen symptoms by inducing specific defence pathways but at different times.



## Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

On potato, an important pesticide-consuming crop against *P. infestans* (Haverkort *et al.*, 2008), it is clear that there is a need to find alternative methods to reduce this consumption. Currently, some elicitors are effective under controlled conditions to fight against *P. infestans*. However, no elicitor-product has been yet homologated in the European market.

Our hypothesis are that (i) the interaction between plant/elicitor could be conditioning the efficiency of elicitors and particularly (ii) the kinetic of induction is specific to each elicitor. To test this hypothesis, the BABA, the *Ulva* extract, and the CCF were applied on potato at different treatment time (0h, 6h, 24h, 48h and 96h). We focused the study on the main defence pathways (phenylpropanoid, alkaloid, flavonoid, terpenoid) and on the PR proteins. We compared the induction of (i) the transcripts of genes by RT-qPCR and (ii) the metabolite compounds by UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>, involved in these pathways.

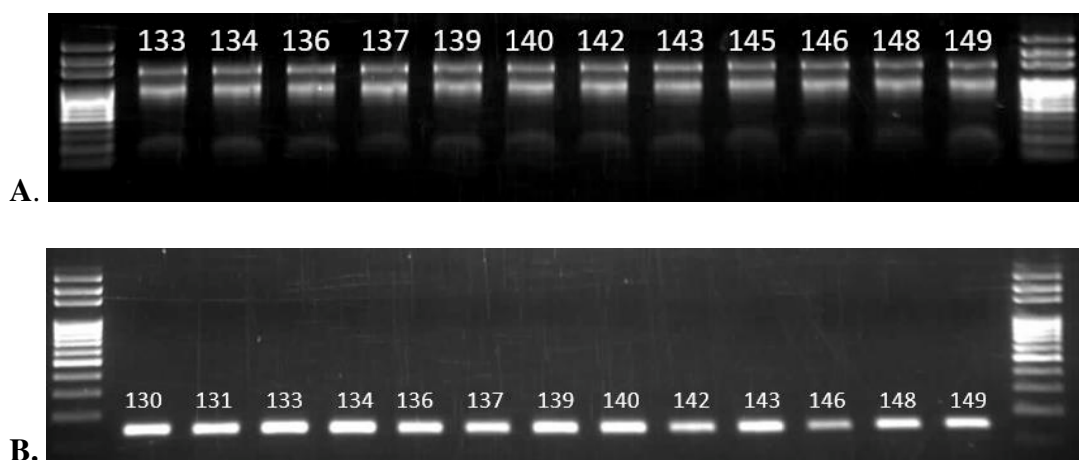
## 2. Materials and Methods

### 2.1.Plant production and elicitor treatments

The tubers of Désirée was produced in 2018 by the Biological Resources Centre - BrACySol (*Brassica - Allium - Cynara – Solanum*; INRA-UMR IGEPP) at Ploudaniel/France. The potato genotype “Désirée” was cultivated in greenhouse for 4 weeks until the treatment with the elicitor’s solutions.. The greenhouse has been maintained at 20°C with a variation of  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  and the photoperiod of 16h day and 8h night. The production of these plants followed the protocol described by Martin *et al.* (2019). Four weeks old plants were treated respectively with CCF at 8 mg/ml, produced in-house with the strain 14-P29-03R from *P. infestans* based on the method described by Thomas *et al.*, (2019); the BABA (Chemical Abstracts Service - CAS 541-48-0) applied at 0.5 mM and purchased by Sigma-Aldrich/France and the *Ulva* extract at 8 mg/ml produced from a green alga of *Ulva* spp. by the Roullier Group-Saint Malo/France.

Each elicitor solutions were applied on 6 plants per kinetic point. The 12 leaflets of 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> leaf stage were harvested at 0h, 6h, 24h, 48h and 96h respectively. As the sampling was destructive, 6 plants were selected for each treatment at each kinetic point. The leaflets were fast-frozen in liquid nitrogen and after at least 24h at  $-80^{\circ}\text{C}$ , they were lyophilized for 24h. Before grounding, all the samples have been stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  during the same period to not break the cold chain. The lyophilized material was used for the following analysis.

Two independent trials were performed with a two-week interval, however, only the results of one trial will be presented on this manuscript. The results of the other trial will be analysed after the final presentation of this thesis.



**Figure 3.** The quality control steps on extraction protocol. (A) The integrity of the RNA on electrophoresis agarose gel; and (B) Migration of PR2 gene on electrophoresis agarose gel

**Tableau 1.** Target genes used on the analysis of transcript profiles

Correspondance of metabolic pathway	Gene name	NCBI's GenBank number	Gene function
<b>PR proteins</b>	<b>PR1</b>	AJ250136	Pathogenesis-related protein 1
	<b>PR2</b>	U01901	Pathogenesis-related protein 2 ( $\beta$ -glucanase)
	<b>PR4</b>	AM908515.1	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)
	<b>PR5a</b>	XM_006364057.2	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin like)
<b>Phenylpropanoid pathway</b>	<b>PAL</b>	XM_006367472	Phenylalanine ammonia-lyase 1
	<b>C4H</b>	XM_006350825	Trans-cinnamate 4-monooxygenase
	<b>4CL</b>	M62755	4-coumarate-CoA ligase
<b>Flavonoid pathway</b>	<b>CHS2</b>	NM_001288367.1	Chalcone synthase
<b>Alkaloid and Terpenoid pathways</b>	<b>HMGR2</b>	AB041031	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase 2
	<b>SS1</b>	JF202610	Squalene synthase
	<b>DXS1</b>	GU936657.1	1-D-deoxyxylulose 5-phosphate synthase
	<b>PDS</b>	AY484445.1	Phytoene desaturase
	<b>SGT1</b>	NM_001318679.1	Scopoletin glucosyltransferase-like
	<b>SGT2</b>	JN695006	UDP-glucose:solanidine glucosyltransferase
	<b>SGT3</b>	HM188447	rhamnose:beta-solanine/beta-chaconine rhamnosyltransferase
<b>Modification pariétale</b>	<b>CalS2</b>	TA45471_4113	Callose synthase
<b>Système antioxydant</b>	<b>POX</b>	AM231411	Peroxidase (putative peroxidase)
	<b>APX</b>	AB041343	Ascorbate peroxidase
<b>Ethylène</b>	<b>EIN3</b>	CK279984	Potato ethylene-insensitive 3 (EIN3-binding F box protein 1)
<b>Reference genes</b>	<b>L2</b>	39816659	Ribosomal protein L2
	<b>GAPDH</b>	U170005	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	<b>Actine</b>	DQ252512.1	Actin 7

### 2.2. Genes analysis

For the transcript analysis, the leaflets of 6 plants of each treatment were pooled into one sample to the RNA extraction. From this pool, two samples of 15 mg were taken to the extraction. The transcription protocol analysis was realised according to Thomas *et al.* (2019b). The extraction was performed with the "SV Total Isolation System" (Promega®) kit and a quality control was done by RNA extractions electrophoresis on 1% agarose gel (Figure 3A). The complementary DNA was produced with the "iScript cDNA Synthesis" kit (Biorad®). The PCR program for reactions was: 5 min at 25°C; 30 min at 42°C; 5 min at 85°C; and 3h at 4°C. A control of the purity and quality of the cDNA was obtained by PCR using primers specific to a gene encoding the PR2 protein whose transcripts were always expressed (Figure 3B). After all validation steps, the sample is ready for qPCR.

19 defence related genes and 3 reference genes were targeted were analysed by RT-qPCR (Tableau 1). The expression analysis of the genes was carried out at the Beaulieu Environmental and Human Genomics Platform (University of Rennes 1). The Smart-Chip-Real Time PCR system (Wafergen) equipment analysing a microchip that contains 5184 wells was used following a conformation of 24 genes/216 samples. For each gene, the sample is deposited in triplicate in the chip. The reference genes were chosen with NormFinder algorithm (Andersen *et al.*, 2004) that identify the optimal normalization gene among a set of candidates ( *$\beta$ -tubuline*, *Actine 7* and *GAPDH*).

The primers with an efficiency higher than 85% were used to continue the analysis. Those deviating by more than one Ct from the other Ct are not taken into account for the analyses. The housekeeping gene, are individually linearized by the calculation:  $E(-Ct)$ , an average of these linearized Ct is calculated for each treatment. The geometric mean between the selected genes is performed for each treatment. For genes, the Ct are linearized in the same way and then normalized by household genes.

### 2.3. Metabolite analysis

The target metabolites are part of the different metabolic pathways such as phenylpropanoid, flavonoid, alkaloid and terpenoid pathways. These metabolites were purchased from Sigma/France : rutin (CAS: 207671-50-9), 4-O caffeoyl quinic acid (CAS: 905-99-7), rhoifolin (CAS: 17306-46-6), prunin (CAS: 529-55-5), caffeic acid (CAS: 331-39-5),



### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

cellobiose (CAS: 528-50-7), salicylic acid-SA (CAS: 69-72-7), shikimic acid (CAS: 138-59-0), l-tyrosine (CAS: 60-18-4), (R)-mevalonic acid (CAS: 150-97-0), (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride (CAS: 69056-38-8), dihydrofolic acid (CAS: 4033-27-6), 2-OPDA (CAS: 85551-10-6) and jasmonate acid-JA (CAS: 6894-38-8). The  $\alpha$ -chaconin (n°OC293251601) was purchased from Carbosynth – Batch.

The samples for metabolites analysis were not pooled. The leaflets of 6 plants per kinetic point were analysed individually. 10 mg were taken to the extraction of the metabolites. The solution extraction was based on the methanol-water-formic acid (70:29:1) followed an adapt protocol developed by Martin *et al.* (2019). First of all, the samples were extracted with 1 ml of solution of extraction, mixed for 30 min and centrifuged for 20 min to obtain the supernatant. A second extraction with 0.5 ml of solution extraction was performed with 5 min of mixing and 10 min of centrifugation. Both supernatants were mixed. However, it was added, on the final step of the extraction, a purification protocol to better extract the target metabolites. The samples placed in plates of 96 wells of 2 ml are dry evaporated under nitrogen flow at 40°C (Biotage SPE DRY96). Then they are diluted in 800  $\mu$ l of an ultrapure water solution with 2% formic acid. This solution is filtered (> 0.2  $\mu$ m) and passed through an Evolute® Express ABN 30 mg-1 ml column. The column is washed with 1 ml of methanol and the solutions are taken up in a new 96-well 2 ml plate. Methanol is dry evaporated under nitrogen flow at 40°C and samples are stored at -20°C. Purification eluates highly polar compounds that are not retained by the column. These samples were re-diluted with the same extraction solution.

The analysis were performed either on the stock solution for cellobiose, rutin, rhoifolin, prunin, caffeic acid and salicylic acid or on the 20-fold diluted samples for chaconine, 4-O caffeoyl quinic acid and cellobiose to cover all concentrations of metabolites. Therefore, two standard curves ranges were prepared. For the stock solution, the range was composed by 10 points: 10 ppb - 20 ppb - 50 ppb - 100 ppb - 100 ppb - 200 ppb - 500 ppb - 1 ppm - 2 ppm - 5 ppm - 10 ppm. For diluted samples, the range was composed by 9 points: 50 ppb - 100 ppb - 200 ppb - 500 ppb - 1 ppm - 2 ppm - 5 ppm - 10 ppm - 20 ppm. The quality control for this analysis is one point in the standard range.

The Ultra-High-performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer - Xevo G2-S QToF (UPLC-QTOF-MS<sup>e</sup> from Waters® – Milford/Massachusetts/USA) equipped with an electrospray ion source (ESI) was used for the analysis. Then, the column Kinetex EVO C18 (150 x 2.1 mm – 2.6  $\mu$ m, 100Å, Phenomenex,



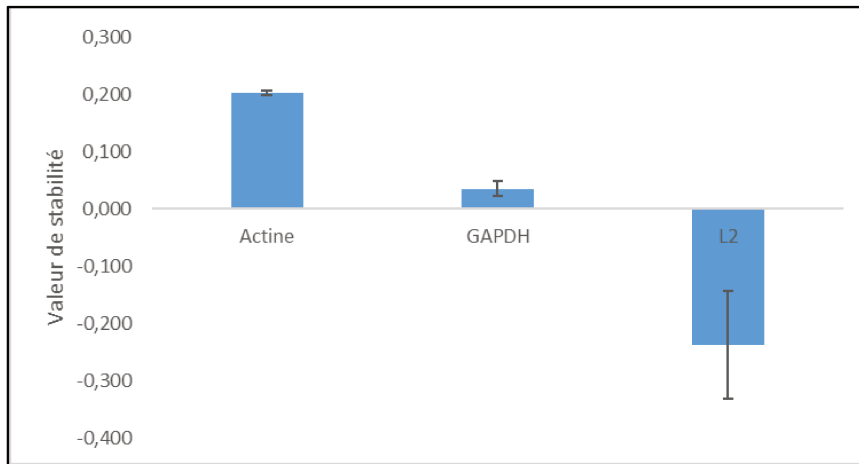


### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

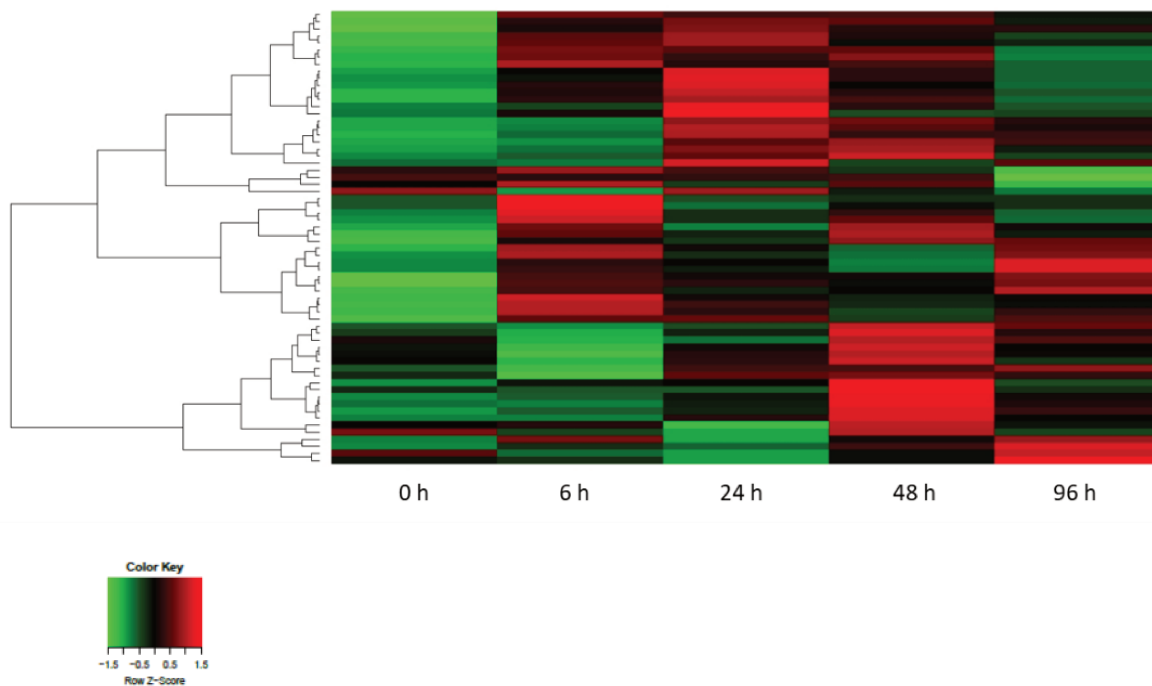
USA) was coupled. The LC-MS protocol was also based on Martin *et al.* (2019), but only in negative mode (ESI-). However, an adaption on the detection mode was realized. The sensitive mode was performed in order to identify molecules at low concentrations. In addition, the data acquisition decreased of original protocol from 18 min to 13 min and cleaning of the column were taken from 2 min to 7 min. These changes helped to target the metabolites of our study and limit the saturation of the mass detector.

#### 2.4. Statistical analysis

The transcriptomic data matrix, represented by the heatmap and the correlation charts, were analysed with a correlation-based distance with Pearson correlation coefficients and, only to the heatmap, Ward.D2 clustering was applied. The transcript accumulations and metabolic concentrations were represented by histogram and line charts. The ANOVA for Linear Model Fits were performed to test whether target genes and metabolites differed among the four treatments. Tukey HSD tests were also performed and the different letters indicate significant differences. The data was considered significant if the p value  $\leq 0.05$  for both tests. All statistic tests were conducted using R software version 3.3.3 with the “gplot”, “FactoMineR”, “ade4” and “Tukey.HSD” packages.



**Figure 4. Three reference genes tested in the study measured by NormFinder algorithm**

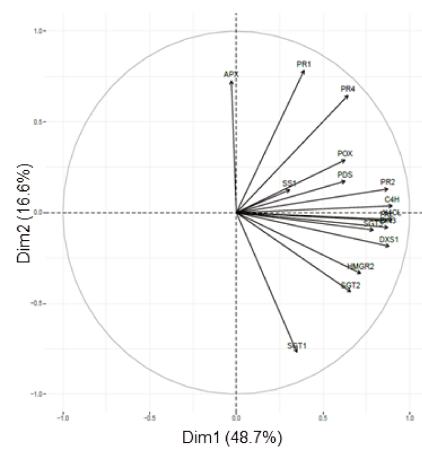
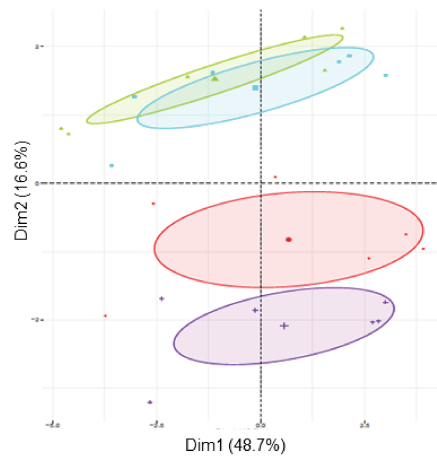


**Figure 5. Transcript accumulation after the elicitor treatments at different kinetic points**

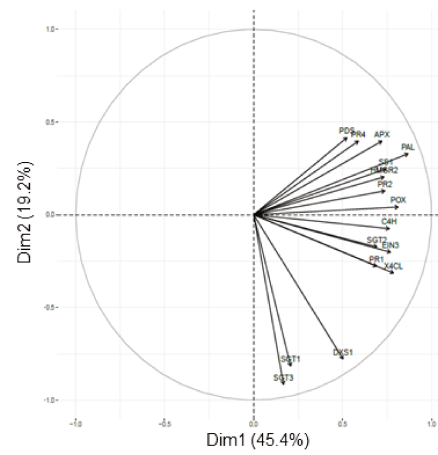
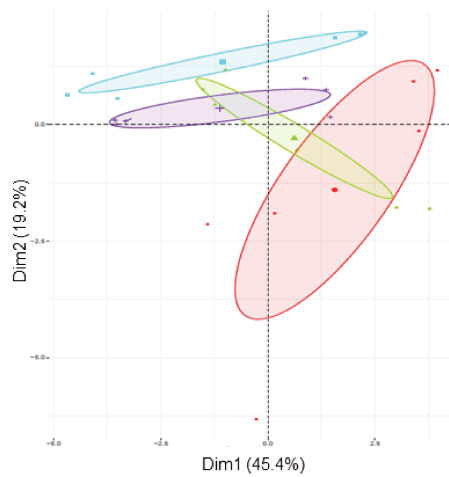
Each row represents the average transcript accumulation per treatment and the columns represent one kinetic point. Associated to the rows, the hierarchical clustering tree brings together the genes by the correlation-based distance calculated with Pearson correlation coefficient and Ward clustering. Clusters showed up-regulation (red), neutral effect (black) and down-regulation (green) by genes of each kinetic points.

## Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

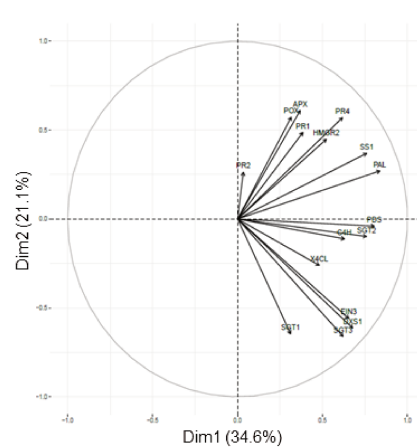
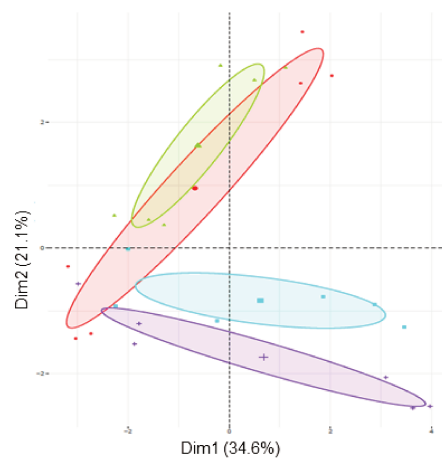
### A. Time=0h



### B. Time=6h



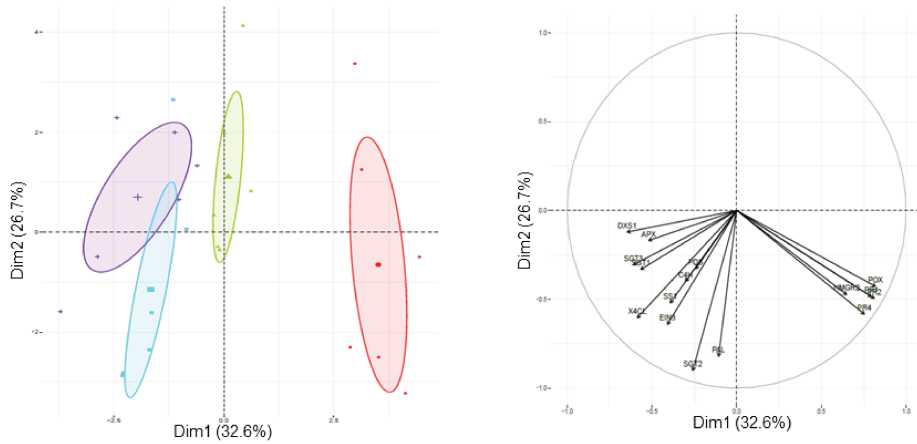
### C. Time=24h



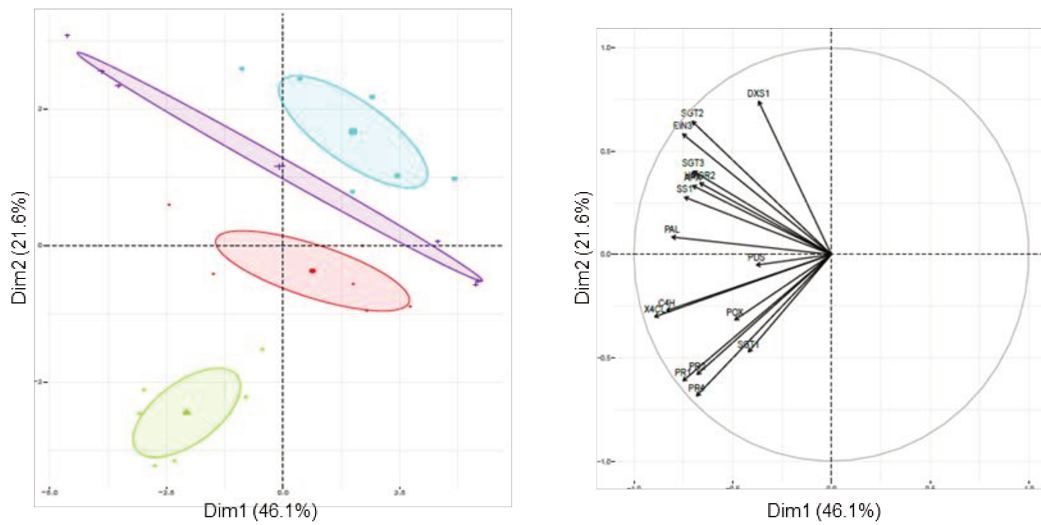
Treatment    ● BABA    ▲ CCF    ■ Control    + Ulva extract

Figure 6. Transcript profiles of the elicitors at different kinetic points

### D. Time=48h



### E. Time=96h



Treatment ● BABA ▲ CCF ■ Control + Ulva extract

**Figure 6. (continuous) Transcript profiles of the elicitors at different kinetic points**

The kinetic points are represented by the PCA and the correlation circle representations in: (A) 0h, (B) 6h, (C) 24h, (D) 48h and (E) 96h. Left side: the PCA plot showed a grouping of individuals by elicitors based on transcript accumulation by RT-qPCR. Right side: the correlation circle showed the genes that contribute most to group separation.

### 3. Results

#### 3.1. Transcripts induction varies according to the kinetic point

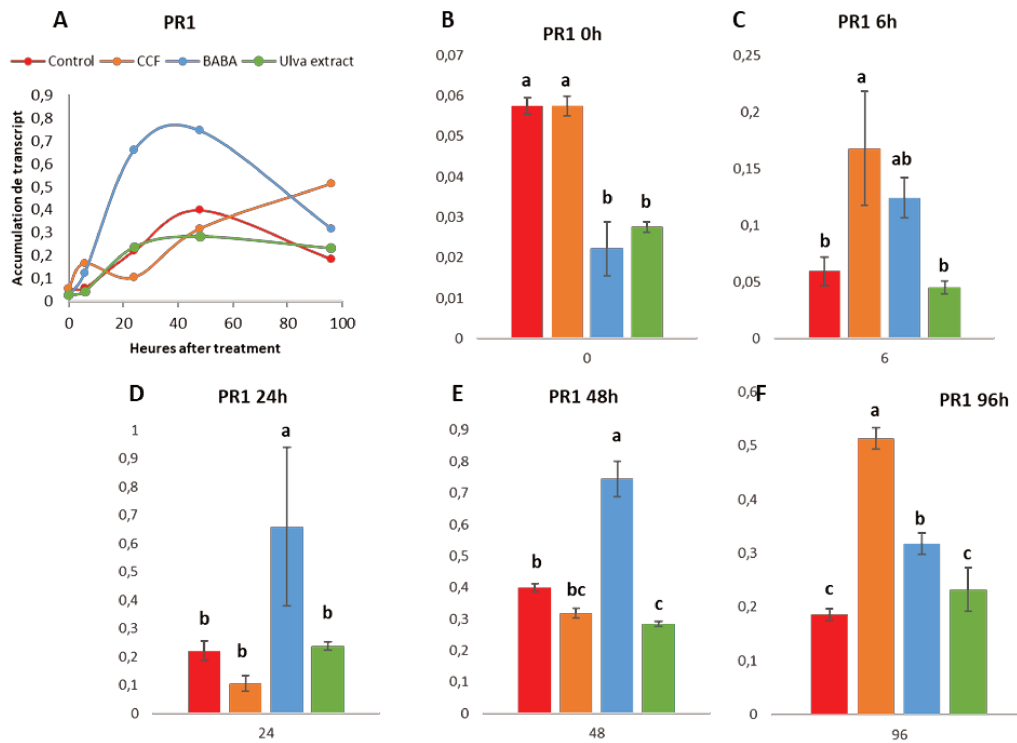
Potato plants were four weeks old and they were treated with 3 different origins of elicitors (CCF, BABA and *Ulva* extract) and water+Tween20 as a control. Five kinetic points were analysed (0h, 6h, 24h, 48h and 96h). The aim of this study is to evaluate, for each elicitor, from a selection of defence-related genes the dynamic of defence responses. The 4 reference genes were analysed by NormFinder algorithm and the normalisation of defence-related genes was done with the *GAPDH* (Figure 4).

Among the 20 genes studied by RT-qPCR, only 16 had their efficacy validated to be analysed in the following results that excluded *CHS2*, *TPS3*, *TPS4* and *Cals2* genes. The accumulation of transcripts induced at each kinetic point is represented on a Heatmap. (Figure 5). Each line represented one gene from one treatment and each column represented one kinetic point. The results showed that the genes were down-expressed at 0h that contrasted with the progression of up-expression from 6h to 48h. Then, the accumulation of the transcript decreased at 96h.

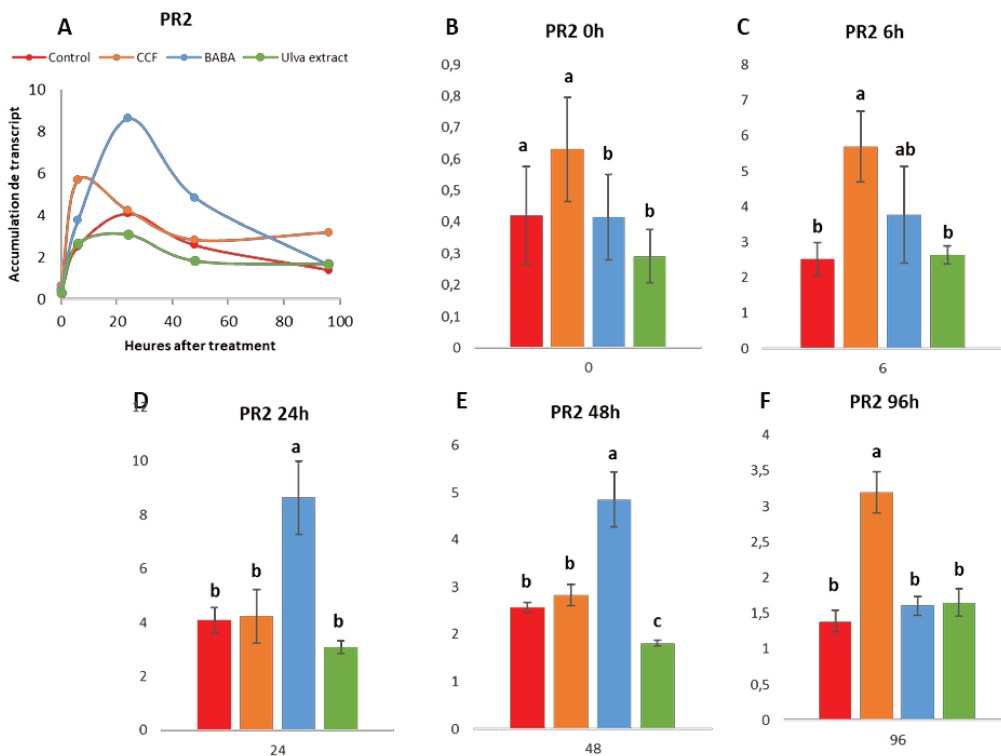
#### 3.2. The dynamics of transcripts induction depend on the treatment

The transcripts modulated by each treatment were analysed at each kinetic point. The results are represented by PCAs (Figures 6) which explain more than 55% of the data. Correlation circles contributed to the identification of discriminating genes for each treatment in different quarters (Figures 6).

At **0h**, the average of each treatment was centred in the first axis of PCA. The second axis separated the *Ulva* extract and the BABA treatments from the CCF and control treatments with *STG1* gene while the *APX*, *PR1* and *PR4* genes were more represented with the CCF treatments and control. (Figure 6A). At **6h**, the BABA differed from the other treatments with the expression of *SGT1*, *SGT3* and *DXS1* genes (Figure 6B). At **24h**, the *APX*, *POX* and *PRs* (*PR1* and *PR4*) genes contributed to separate BABA and CCF treatment from control and *Ulva* extract. The *SGTs* (*SGT1* and *SGT3*), *EIN3* and *DXS1* contributed to discriminate the *Ulva* extract treatment from the others treatments (Figure 6C). At **48h**, the expression of *PRs* (*PR1*, *PR2* and *PR4*), *POX* and *HMGR2* genes were up-expressed in the BABA treatment (Figure 6D) and separated the BABA from the other treatments. On the other hand, at **96h**, it was the CCF treatment which is separated from the other treatments thanks to *PRs* (*PR1*, *PR2* and *PR4*) genes (Figure 6E).

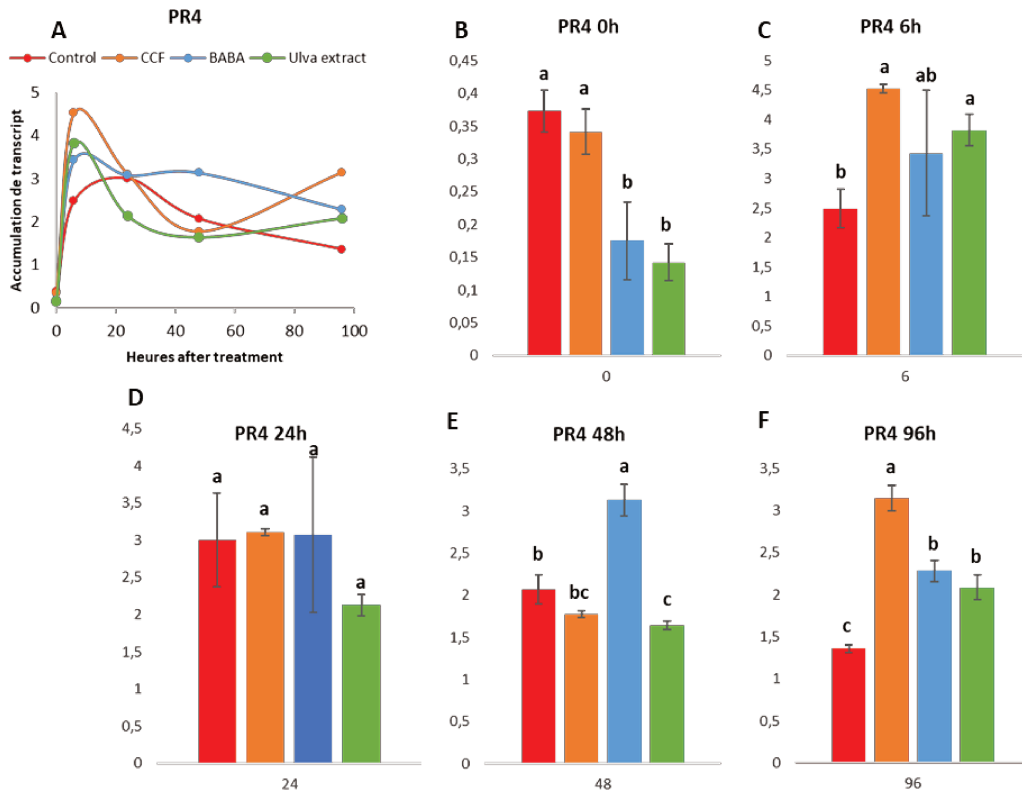


**Figure 7. The transcript accumulation, PR1: (A) dynamics in all kinetic points and (B-F) histogram charts of each kinetic point**

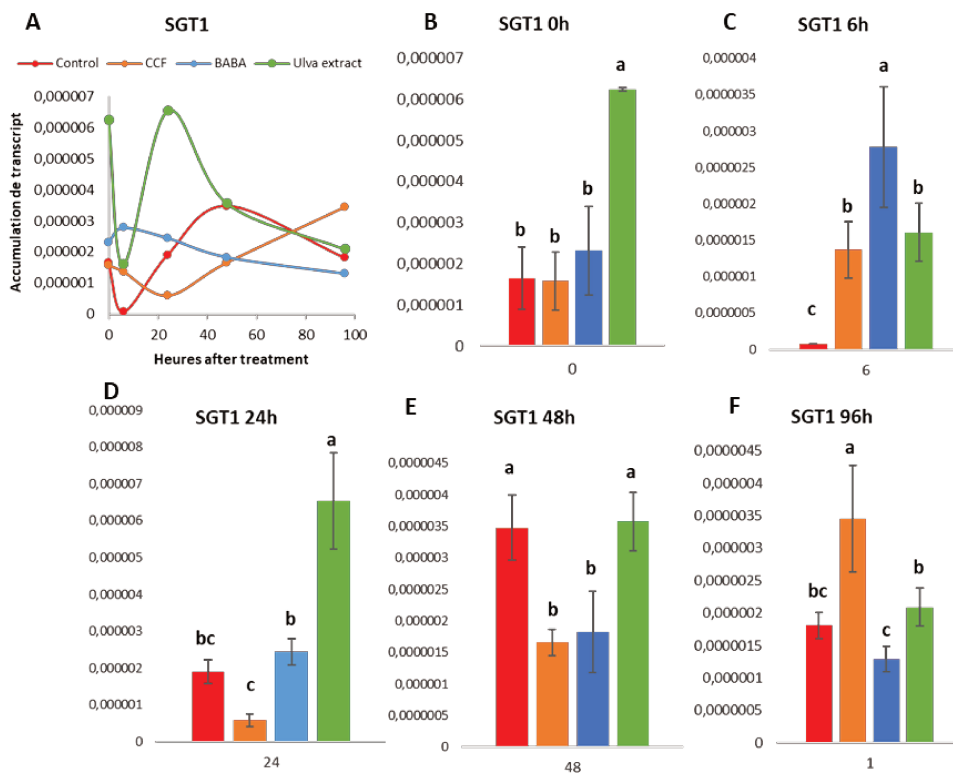


**Figure 8. The transcript accumulation, PR2: (A) dynamics in all kinetic points and (B-F) histogram charts of each kinetic point**

## Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

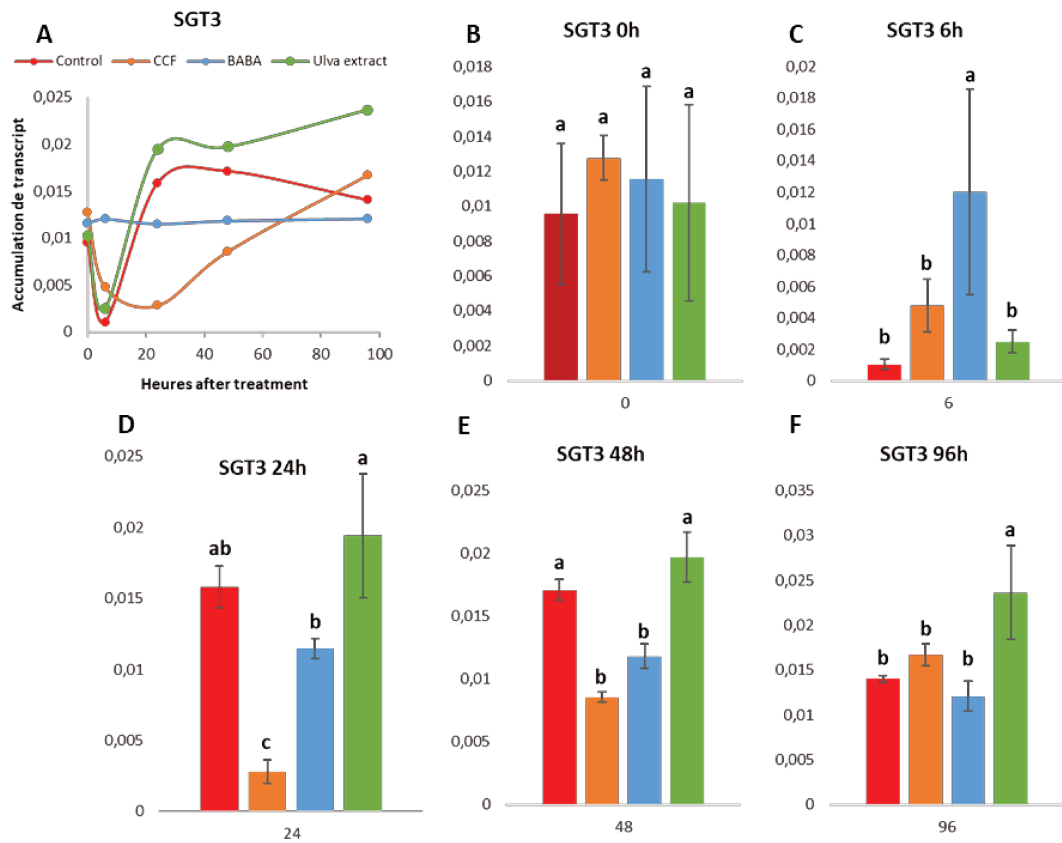


**Figure 9** The transcript accumulation, PR4: (A) dynamics in all kinetic points and (B-F) histogram charts of each kinetic point.



**Figure 10.** The transcript accumulation, SGT1: (A) dynamics in all kinetic points and (B-F) histogram charts of each kinetic point.





**Figure 11.** The transcript accumulation, SGT3: (A) dynamics in all kinetic points and (B-F) histogram charts of each kinetic point.

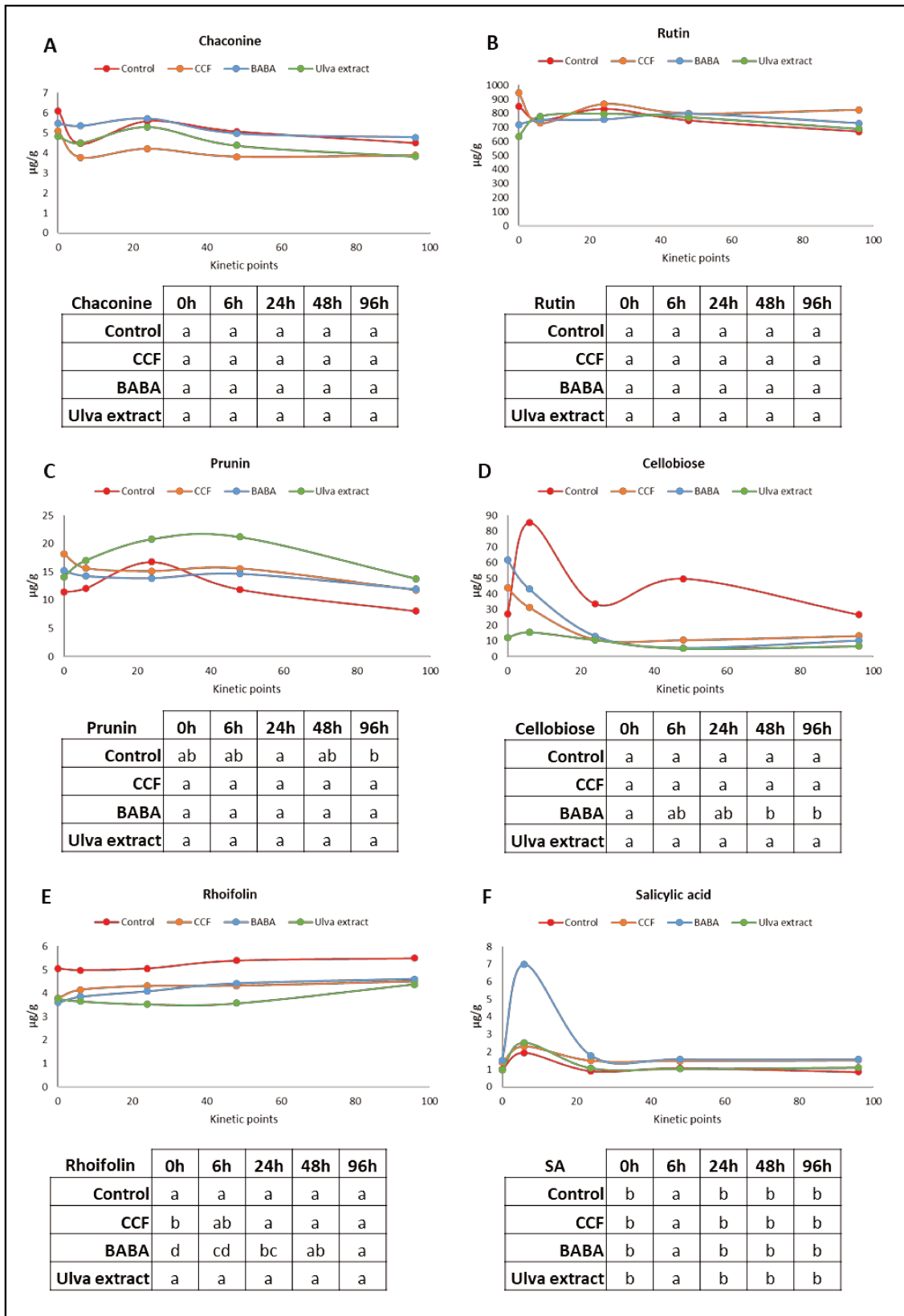
### 3.3. PRs genes and SGT genes were differently modulated by the elicitors

Two families of genes were highlighted in these results: the *PRs* genes and *SGTs* genes. These genes respectively code the PRs proteins which are strongly antimicrobials (van Loon *et al.*, 2006) and the solanine and chaconine belonging to the secondary metabolism (McCue *et al.*, 2011).

Concerning the PR genes, the results showed that the *PR1* and *PR2* followed the same regulation dynamics for each elicitor (Figure 7 and 9). Indeed, BABA strongly induced *PR1* and *PR2* from 24h to 48h but at 96h, the transcripts accumulation did not differ from the control. The CCF treatment induced two peaks of *PR1* and *PR2* at 6h and more strongly at 96h. The *Ulva* extract treatment did not show any significant difference with control except at 48 hours or it decreases the expression of *PR1* and *PR2*.

All treatments increased *PR4* transcripts accumulation at 6h compared to the control. This accumulation was maintained for all treatments at 24 hours. But it increased again at 48h for BABA and at 96h for all three treatments but more strongly for CCF. (Figure 9).

Concerning *SGT1*, there was a very low accumulation of transcripts. However, the results showed some differences in the kinetic points of gene expression (Figure 10). From 0h to 24h, the *Ulva* extract treatment induced this gene while BABA only increased it at 6h and CCF at 6h and 96h. *A contrario*, BABA and CCF decreased this expression at 48h. To *SGT3* were strongly induced by BABA treatment at 6h (Figure 11). In addition, the CCF treatment decreased significantly at 24h and 48h. Among the three *SGT* genes, only *SGT2* did not show the significant difference between the treatments (data not-shown).



**Figure 12. Quantification of metabolites from defence-related pathways**

*The chaconine from glycoalkaloid pathway; rutin, prunin and rhoifolin from flavonoid pathway; salicylic acid, an phytohormone. The unit of measurement is µg/g of lyophilised material*

### 3.4. Some target metabolites have also a specific production dynamics after elicitors treatments

We analysed the metabolites linked with the target pathways: phenylpropanoid, flavonoid, alkaloid and terpenes. Some metabolites such as shikimic acid, l-tyrosine, (R)-mevalonic acid, (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride, dihydrofolic acid, 2-OPDA and JA, could not be quantified with our protocol. Among the metabolites quantified, the caffeic acid the 4-O caffeoyl quinic acid, the  $\alpha$ -chaconine and the rutin, (Figure 12A and 12B) did not show differences in the production dynamics whatever the elicitor applied. On the other hand, four metabolites, prunin, cellobiose, rhoifolin and SA showed significant differences in the dynamics of production.

The prunin presented a difference in the dynamics of production only on the control with a peak at 24h (Figure 12C) and the cellobiose only on the BABA at 48h and 96h (Figure 12D). The rhoifolin showed differences into the dynamics of two treatments: the BABA and the CCF (Figure 12E). In both treatments, the production of this metabolite progressively increased from 0h to 96h. SA, alone, showed a difference in all treatments. Indeed, all plants presented a peak of SA production at 6h (Figure 12F). In this kinetic point, the BABA treatment increased the SA production almost in three times.

## 4. Discussion

Previous study showed that the elicitor-origin modulates the defence response triggered in the potato plants (Martin et al 2019). To take a step forward in this discussion, our objective was to test whether the defence-induction kinetic is also specific to each elicitor. We chose to test the defence responses expressed at early and late points: 0h, 6h, 24h, 48h and 96h. For this purpose, some genes and metabolites of phenylpropanoid, flavonoid, alkaloid and terpenoid pathways were studied.

A global analysis revealed a dynamic of induction of the target genes. The results showed that these genes can be activated at different kinetic points. Hence, it is difficult to attribute a family of genes to one kinetic point. Despite this fact, we highlighted two points of the kinetics, 24h and 48h for which most genes were induced. These two points are often used on elicitor studies. For example, BTH (Dufour *et al.*, 2013) and ulvan (Ben Salah *et al.*, 2018) were applied respectively to grapevines and olive trees 24h before pathogens inoculation.



### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

In potato plants, BABA (Bengtsson *et al.*, 2014a) or CCF (Thomas *et al.*, 2019b), were applied 48h before the inoculation.

24h or 48h, could be the average time required to produce effective defence responses. Indeed, the plant's immune system takes a time to produce the defence response. The final response against a pathogen started with its perception by a specific receptor on the cell wall (Zipfel, 2009) or inside the cell (Luna *et al.*, 2014). Then, a signalling cascade with Ca<sup>2+</sup> burst, ROS burst, MAPKs and phytohormone production are decisive for an effective defence. This cascade lead to induce in the nucleus the genes transcription finally encoding the proteins and metabolites against the pathogen (Bigéard *et al.*, 2015).

At 96h, few genes have been activated but the potato plants were not inoculated with a pathogen. The immunity often comes at a cost in decreasing yield and the plant system must balance its energy between defence and growth (Ning *et al.*, 2017). As a result, the decrease of the transcripts observed at 96h could indicate that the plant does not need to spend more energy on the defence.

Our results also showed that it is the elicitor treatments who determinate the induction or repression of genes at different times.

The BABA was the treatment that induced the largest number of transcript. At 6h, this treatment strongly induced *SGT* and *DXS1* genes. The *SGT* genes are part of the alkaloids pathway that originated by methylerythrytol phosphate pathway (MEP) while *DXS1* is part of mevalonate (MEV) pathway. MEP and MEV pathways are two major pathways of terpenes (Kegg Pathway Database, 2019). Bengtsson *et al.* (2014b) showed that the BABA treatment influenced modifications on MEV pathway on potato plants infected by *P. infestans*. Our results suggest that BABA treatment changed both terpene pathways but they must be confirmed with more genes belonging to these pathways. BABA also induced, from 24h to 96h, the *PR* and *POX* genes. These results are confirmed by Bengtsson *et al.* (2014b) that observed, after 48h of potato plant treatment, the PRs and cell wall peroxidase production. The POX has multiple functions such as phytoalexin production and hypersensitive response but mainly it is responsible for combating degradation enzymes produced by pathogens (Bengtsson *et al.*, 2014b).

The CCF treatment induced at 6h and 96h all *PR* genes. It is at 96h that the CCF differs more than the others elicitors. The *PR* genes are markers of defence responses often used to verify the action of CCF on potato plants (Saubeau *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2019a, 2019b).



### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

The CCF tested against *P. infestans* on potato Bintje, a susceptible genotype, also induced at 6h, the *PR1*, *PR2* and *PR5* genes. On the other hand, on Ackersegen, a resistant genotype, the induction started at 12h until 48h, a latest kinetic point of the study (Saubeau *et al.*, 2016). Our tests were performed on Désirée, a moderately resistant genotype that was never tested in kinetic with this elicitor. The BABA and the CCF induced strongly defence at 96h of treatment. It would be interesting to study later kinetics points to see whether these defences are maintained.

The *Ulva* extract induced the *SGT1* gene at 6h and 24h, and *SGT3* gene only at 96h, both belonging to alkaloid pathway. The modulation of these genes encoding the solanine and the chaconine was verified for the first time in our laboratory. These two metabolites are exclusives of potato plants and they are correlated with the resistance to the “colorado potato beetle” (Tai *et al.*, 2014). Despite the regulation of *SGT* genes, the chaconine, did not have its production altered on any kinetic point. An interesting point about the treatment with *Ulva* extract is the induction of *PR4* at 6h and 96h. The others *PR* genes studied were not modulated by this treatment. Different authors associated the induction of *PR3* and *PR4* to JA and ET-inducible defence-related genes (van Loon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). On potato plants, our studies showed that *Ulva* extract induce the defence response through the JA pathway (Martin et al – in preparation for Frontiers in Plant Sciences).

Concerning the metabolites analysis, 4 of them presented a different dynamic over kinetic points but only SA presented a dynamic for all treatments. The SA is a phytohormone that could influence PRs protein production and they had both been impacted by the elicitor treatments (van Loon *et al.*, 2006). The peak of SA was at 6h and it observed that the *PR* genes started the induction at 24h mainly after BABA treatment. For CCF, the *PR* genes were induced at 6h, on the same time of SA induction. In this case, it is possible that the SA induction started at early times.

### 5. Conclusion

The study show that the dynamics of defence induction depend on the elicitors. It also allows to determine with more precision the exact times of the defence induction by each elicitors. However, the limit of this study is having few target genes and also few metabolites to relate transcriptomics and metabolomics. It will be interesting to perform non targeted study in both levels. In terms of crop management, this study show that positioning of the product in the cultural cycle is essential to the efficiency against the pathogens.





### 6. References

- Achuo, E. A., Audenaert, K., Meziane, H., and Hofte, M. (2004). The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathol.* 53, 65–72. doi:10.1111/j.1365-3059.2004.00947.x.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., and Ørntoft, T. F. (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 Res.* 64, 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Bektas, Y., and Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00804.
- Ben Salah, I., Aghrouss, S., Douira, A., Aissam, S., El Alaoui-Talibi, Z., Filali-Maltouf, A., *et al.* (2018). Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against verticillium wilt of olive. *J. Plant Interact.* 13, 248–255. doi:10.1080/17429145.2018.1471528.
- Bengtsson, T., Holefors, A., Witzell, J., Andreasson, E., and Liljeroth, E. (2014a). Activation of defence responses to *Phytophthora infestans* in potato by BABA. *Plant Pathol.* 63, 193–202. doi:10.1111/ppa.12069.
- Bengtsson, T., Weighill, D., Proux-Wéra, E., Levander, F., Resjö, S., Burra, D., *et al.* (2014b). Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics* 15, 315. doi:10.1186/1471-2164-15-315.
- 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.
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur.* 6, 48–60. doi:10.1002/fes3.108.
- Dufour, M. C., Lambert, C., Bouscaut, J., Mérillon, J. M., and Corio-Costet, M. F. (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 Pathol.* 62, 370–382. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02628.x.
- El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfai, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., *et al.* (2012). Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Sci. Hort.* 138, 55–63. doi:10.1016/j.scienta.2012.02.011.
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., *et al.* (2008). Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Res.* 51, 47–57. doi:10.1007/s11540-008-9089-y.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi:10.1038/nature05286.



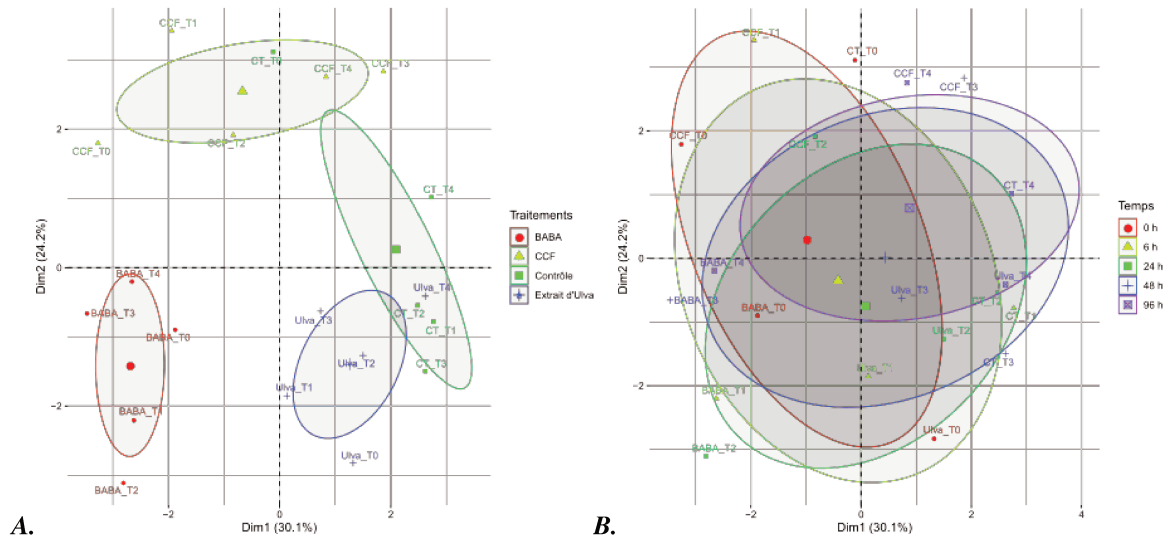
### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

- Le Boulch, P. (2018). Des éliciteurs d'origine différente induisent-ils chez la pomme de terre des voies de défense spécifiques ? Rennes: INRA UMR IGEPP - Le Rheu.
- Legros, T. (2019). Etude cinétique de l'induction, par trois éliciteurs, des réponses de défenses de la pomme de terre cv. Désirée. Rennes: INRA UMR IGEPP - Le Rheu.
- Luna, E., van Hulten, M., Zhang, Y., Berkowitz, O., López, A., Pétriacq, P., *et al.* (2014). Plant perception of  $\beta$ -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 10, 450–456. doi:10.1038/nchembio.1520.
- McCue, K. F., Rockhold, D. R., Chhan, A., and Belknap, W. R. (2011). Structure of Two *Solanum tuberosum* Steroidal Glycoalkaloid Glycosyltransferase Genes and Expression of their Promoters in Transgenic Potatoes. *Am. J. Potato Res.* 88, 485–492. doi:10.1007/s12230-011-9215-2.
- Ning, Y., Liu, W., and Wang, G.-L. (2017). Balancing Immunity and Yield in Crop Plants. *Trends Plant Sci.* 22, 1069–1079. doi:10.1016/j.tplants.2017.09.010.
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43. doi:10.1017/S0021859605005708.
- Ouanas, S., Hamelin, G., Hervet, M., Andrivon, D., Val, F., and Yahiaoui-Zaidi, R. (2017). Protection against bacterial soft rot by olive extracts is related to general defence induction in potato tubers. *Plant Pathol.* 66, 404–411. doi:10.1111/ppa.12583.
- Saubeau, G., Gaillard, F., Legentil, L., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V., Andrivon, D., *et al.* (2014). Identification of Three Elicitins and a Galactan-Based Complex Polysaccharide from a Concentrated Culture Filtrate of *Phytophthora infestans* Efficient against *Pectobacterium atrosepticum*. *Molecules* 19, 15374–15390. doi:10.3390/molecules191015374.
- Saubeau, G., Perrin, F., Marnet, N., Andrivon, D., and Val, F. (2016). Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 65, 342–352. doi:10.1111/ppa.12420.
- Schwessinger, B., and Zipfel, C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 389–395. doi:10.1016/j.pbi.2008.06.001.
- Sharma, K., Butz, A. F., and Finckh, M. R. (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 Pathol.* 59, 1062–1071. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02341.x.
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., and Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci.* 267, 102–111. doi:10.1016/j.plantsci.2017.11.012.
- Tai, H. H., Worrall, K., Pelletier, Y., De Koeyer, D., and Calhoun, L. A. (2014). Comparative Metabolite Profiling of *Solanum tuberosum* against Six Wild *Solanum* Species with Colorado Potato Beetle Resistance. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9043–9055. doi:10.1021/jf502508y.



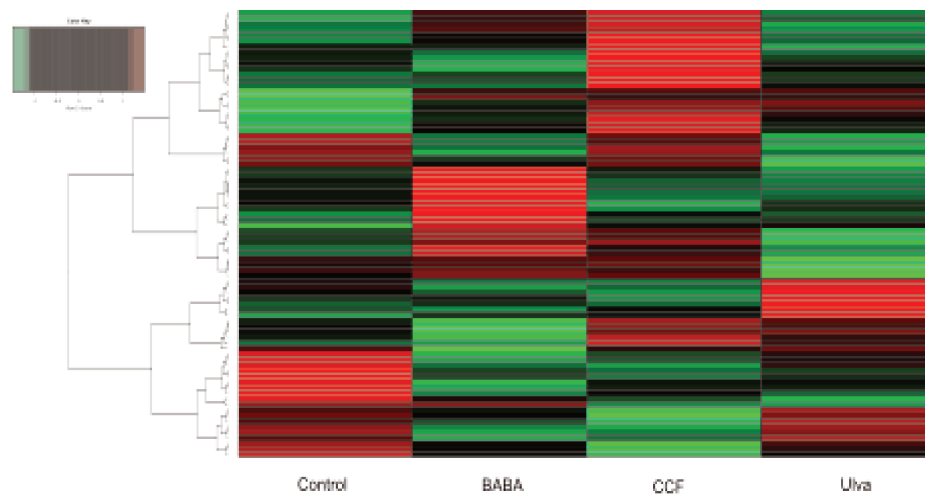
### Chapitre III : Dynamique des réponses de défense induites par les éliciteurs

- Thomas, C., Le Boulch, P., Andrivon, D., and Val, F. (2019a). Potato genotypes differentially alter the expression of *Phytophthora infestans* effectors during PAMP-mediated resistance induction. *bioRxiv*. doi:10.1101/547984.
- Thomas, C., Mabon, R., Andrivon, D., and Val, F. (2019b). The Effectiveness of Induced Defense Responses in a Susceptible Potato Genotype Depends on the Growth Rate of *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 32, 76–85. doi:10.1094/MPMI-03-18-0064-R.
- van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- Wang, N., Xiao, B., and Xiong, L. (2011). Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice. *J. Plant Physiol.* 168, 2212–2224. doi:10.1016/j.jplph.2011.07.013.
- Yao, L., Zhong, Y., Wang, B., Yan, J., and Wu, T. (2019). BABA application improves soybean resistance to aphid through activation of phenylpropanoid metabolism and callose deposition. *Pest Manag. Sci.* doi:10.1002/ps.5526.
- Zhou, M., and Wang, W. (2018). Recent Advances in Synthetic Chemical Inducers of Plant Immunity. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.01613.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 414–420. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.003.



**Figure 13. Profil d'accumulation des transcrits (A) en fonction des éliciteurs et (B) en fonction du temps de cinétique**

Le jeu de données des deux ACPs est le même. La représentation (A) distribue les données en fonction des traitements des éliciteurs et la (B) en fonction des temps de récoltes après traitements.



**Figure 14. Représentation sous forme de Heatmap de la régulation des transcrits après traitement avec les éliciteurs et tous les temps de cinétique**

L'accumulation des transcrits est basée sur la mesure de la distance de Pearson et organisé par le « clustering » de Ward. L'échelle de couleurs représente les réponses du gène réprimés par le vert, les réponses neutres par le noir et les inductions par le rouge.

## 2. Complément à l'article : L'effet « origine des éliciteurs » est plus fort que l'effet « cinétique » dans l'induction de transcrits

L'analyse des gènes ciblés a montré que chaque traitement est associé à un profil d'induction spécifique de transcrits. Ces effets de traitements ont été observés par des analyses descriptives. Ces ACPs expliquent 54,3% de la variance entre les traitements et permettent de séparer les traitements en 4 groupes distincts (Figure 13A). Le traitement BABA constitue un cluster indépendant. Le CCF, le contrôle et l'extrait d'*Ulva* sont assez proches. Tout traitement confondu, l'ACP représentant l'effet temps, explique le même pourcentage de variance, mais elle n'a pas montré de clusters distincts (figure 13B) suggérant que l'effet « temps » est moins fort que l'effet « origine des éliciteurs ».

Cet effet traitement est encore plus visible dans la représentation sous forme de heatmap (Figure 14), où chaque ligne représente un gène à un point de cinétique donné et chaque colonne un traitement. Ces résultats sont intéressants parce qu'ils montrent que les éliciteurs, quel que soit le temps, sont capables d'induire des profils de transcrits qui leur sont spécifiques confirmant ainsi les résultats déjà obtenus dans les deux premiers chapitres de la thèse.

**Cette étude nous a permis de confirmer l'hypothèse de la dynamique d'induction des réponses de défense propre à chaque éliciteur. Pour l'ensemble des gènes choisis les inductions les plus fortes sont observées à 48h. Ces résultats sont appuyés essentiellement par les réponses d'induction des gènes *PRs*. Pour le BABA, les défenses sont plutôt activées à partir de 24h et maintenues jusqu'à 96h. Le CCF présentait un pic d'induction précoce à 6h et un deuxième pic à 96h. Pour l'extrait d'*Ulva*, les gènes *PRs* sont peu induits au cours de la cinétique. Il est à noter que de façon surprenante, nous n'avons pas retrouvé l'effet fort de cet éliciteur sur l'induction de la voie des phénylpropanoïdes. L'analyse du deuxième essai avec des répétitions supplémentaires devrait nous permettre d'infirmer ou de confirmer ce résultat.**

Les résultats obtenus par cette approche sont en accord avec les conclusions des chapitres I et II, sur un effet dominant de l'origine des éliciteurs.





**DISCUSSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**



Ce travail de thèse partait de l'hypothèse que les réponses de défense de la plante modèle, la pomme de terre, vont dépendre de l'origine de l'éliciteur et du niveau de résistance des génotypes. Les approches utilisées au cours de ce projet, la métabolomique, l'analyse des transcrits et les études préliminaires sur la paroi ont ciblé différentes voies de défense activées pendant la PTI.

Les résultats majeurs de ce projet ont montré que **des éliciteurs d'origine distincte vont moduler différemment les défenses de la pomme de terre**. Pris indépendamment, il avait déjà été montré, par exemple, que le BABA induisait chez la pomme de terre le gène *PRI* via la voie du SA (Bengtsson *et al.*, 2014a) et que l'extrait d'*Ulva* réprimait ce gène probablement pour induire la voie du JA chez *Medicago truncatula* (Jaulneau *et al.*, 2010). Par contre, le caractère innovant de ce projet de thèse est d'avoir comparé à l'intérieur d'une même espèce la capacité de trois éliciteurs à produire des composés antimicrobiens.

De plus, nous avons montré que les mêmes voies de défense sont induites par un même éliciteur sur les deux génotypes, Bintje et Désirée. La génétique des **génotypes interfère davantage avec l'abondance des métabolites** produits plutôt qu'avec la nature de ces métabolites. L'induction de métabolites par les éliciteurs dépend donc aussi d'une concentration seuil constitutive de ces métabolites dans un génotype donné. Cependant, dans notre étude l'influence du génotype a été vérifiée principalement au niveau métabolomique et non pour les transcrits. Des études transcriptomiques antérieures réalisées chez la pomme de terre, avaient pourtant montré des différences entre des génotypes sensibles et résistants à deux niveaux : l'amplitude d'expression des gènes et la cinétique d'induction (Saubeau *et al.*, 2016).

Sur la pomme de terre, peu d'études ont encore été réalisées en métabolomique non ciblée. Cependant, Yogendra *et al.* (2014) ont comparé deux génotypes de pomme de terre résistants et un sensible à *P. infestans*. Ils ont montré que les génotypes résistants inoculés avec l'agent pathogène ont induit une plus forte concentration des métabolites liés aux voies des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes. En couplant ces résultats à des analyses transcriptomiques, les auteurs ont observé que la résistance de ces génotypes était liée au renforcement de la paroi végétale. Il est important de noter que dans cette étude les métabolites responsables par la résistance ne sont pas tous absents dans le génotype sensible, ils sont souvent moins concentrés ce qui correspond aussi à nos observations.



Une troisième question a été testée dans notre étude : est-ce que la cinétique de déclenchement des défenses était éliciteur-dépendante ? Nos premiers résultats suggèrent que **chaque éliciteur induit plus fortement les défenses à des temps précis**. Le travail de Saubeau *et al.* (2016) avait déjà montré une induction des transcrits des gènes de défense exprimée à différents temps de cinétique en fonction des génotypes de pomme de terre. Dans le génotype sensible Bintje, *PR1* était exprimé à 6h et réprimé à 48h.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de thèse nous a permis d'aller plus loin dans la compréhension des réponses de défense produites par la pomme de terre au cours de la PTI. Cependant, notre étude a montré quelques limites et des points d'amélioration ont été soulevés.

**Au niveau des éliciteurs**, deux points peuvent être notés : (i) les produits sélectionnés sont bien issus de différentes origines, mais ce ne sont pas des éliciteurs classiquement utilisés dans les plantes modèles comme la flg (Zipfel *et al.*, 2004) ou l'Et-Tu (Zipfel *et al.*, 2006), pour lesquels les mécanismes impliqués dans la PTI sont bien connus. En conséquence, la bibliographie est moins disponible pour ces éliciteurs ; (ii) les éliciteurs, CCF (Saubeau *et al.*, 2014) et l'extrait d'*Ulva* (Jaulneau *et al.*, 2010), sont constitués de plusieurs molécules, infestines et galactane pour le CCF et un mélange complexe pour l'extrait d'algue. Chaque molécule peut être potentiellement perçue par la plante, ce qui complexifie le signal. Il serait pertinent de purifier ces molécules pour étudier plus finement leurs interactions avec la pomme de terre.

**Au niveau des génotypes**, nous avons observé des différences entre Bintje (sensible), et Désirée, (moyennement résistante à *P. infestans*) (Thomas, 2019). Cependant ces génotypes étant peu contrastés, il serait intéressant d'étendre l'étude à une gamme de génotypes allant de très résistant à très sensible pour confirmer ou infirmer nos résultats.

**Au niveau de la méthodologie**, les techniques d'analyses utilisées pour l'étude ont été un grand challenge de ce projet de thèse. Tout d'abord, comme déjà indiqué plus haut, les études en métabolomique non-ciblée sont peu développées sur le modèle pomme de terre. La machine choisie pour les analyses, une UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>, est très sensible aux petites molécules présentes en faible quantité dans les extraits de plantes. L'extraction des échantillons de plante et la colonne (C18) sont un deuxième choix technique qui a permis d'extraire et d'analyser un type de métabolite préférentiel, polaire et semi-polaire.



Même si l'étude est non-ciblée, les choix techniques, orientent vers le métabolisme secondaire et restreignent les spectres des métabolites.

Une limite à notre étude a été l'identification précise des métabolites. En effet, peu de données métaboliques sont encore disponibles sur les plantes, nécessitant d'utiliser des bases de données online incomplètes et de les compiler dans une base de données « maison ». Malgré la création de cette base, les identifications restent putatives (niveau 2) (Dunn *et al.*, 2013) et la validation des métabolites est possible seulement avec l'analyse comparative avec des standards commerciaux quand ils sont disponibles (Salek *et al.*, 2013). Ainsi, pour des raisons de sécurité, nous n'avons pas pu obtenir les standards pour la morphine et ses dérivés ni pour la codéine. La validation des métabolites pourrait aussi, dans l'avenir, être complétée par des données MS/MS que nous n'avons pas à disposition pour le projet. Malgré ces limites le développement de cet outil « métabolomique » pour la pomme de terre, reste un acquis important pour le laboratoire et l'entreprise qui ne l'avait pas encore utilisé.

**Au niveau de l'analyse des transcrits**, les connaissances, antérieures sur les gènes de défense de la pomme de terre *via* l'extension de la puce qPFD nous ont permis de cibler des gènes impliqués dans les voies de défense mises en évidence par notre étude en métabolomique. Cependant, le nombre de gènes analysés (i) était faible par rapport au nombre des voies de défenses identifiées dans les analyses métabolomiques. Une étude en RNAseq pourrait nous donner une image plus vaste et plus précise des gènes impliqués non seulement dans les voies de défense mais aussi dans les voies qui y sont associées et (ii) les analyses de l'expression de gènes se positionnent au même temps que celles des analyses métabolomiques soit à 48h. Mais dans la cellule, ces deux niveaux d'activation de la défense, transcription et traduction en métabolites, se succèdent dans le temps ce qui peut entraîner un biais dans nos résultats. C'est pourquoi nous avons engagé de façon préliminaire une analyse en cinétique afin d'essayer de lier transcription et production de métabolites.



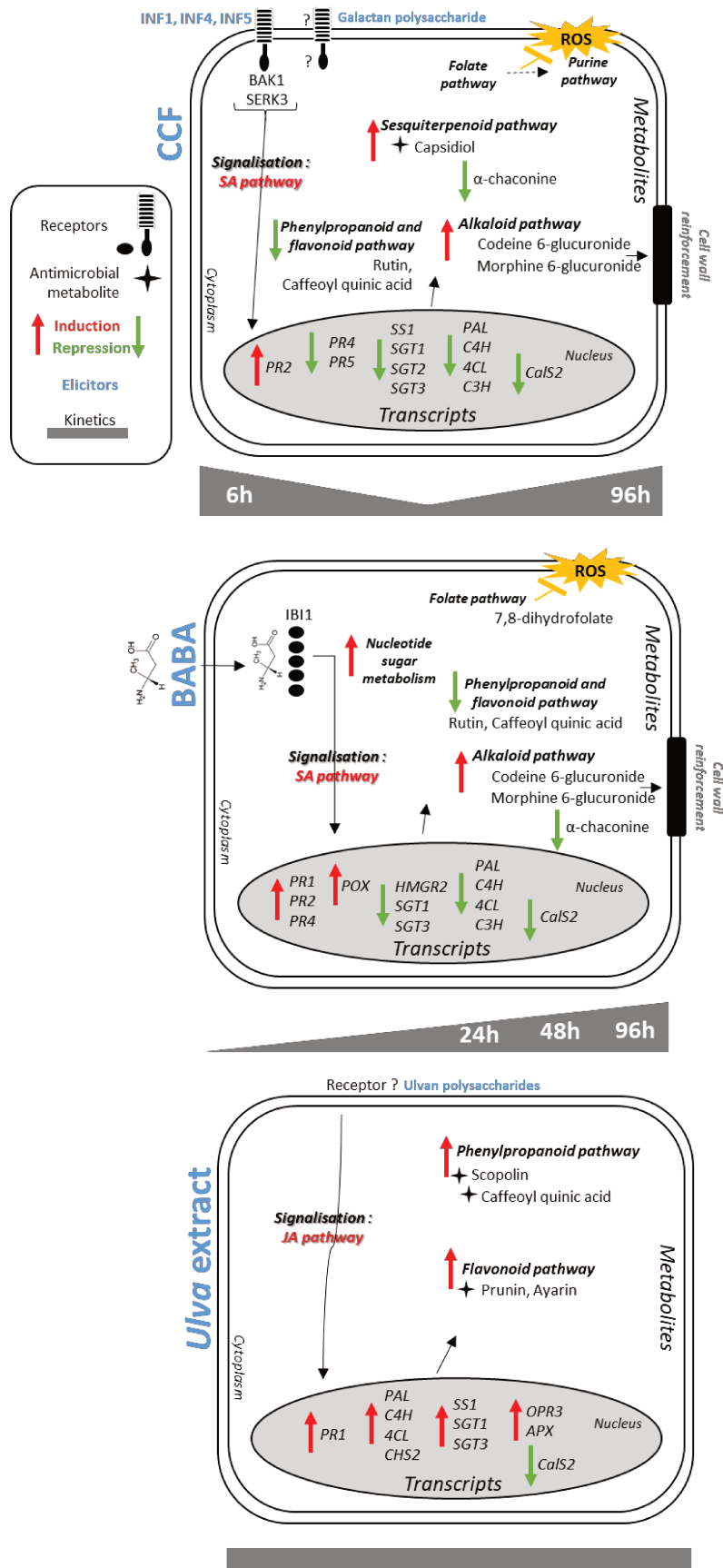


Figure 1. Schéma hypothétique de la PTI chez la pomme de terre après induction avec les trois éliciteurs d'origines différentes : de la perception à la production des antimicrobiens

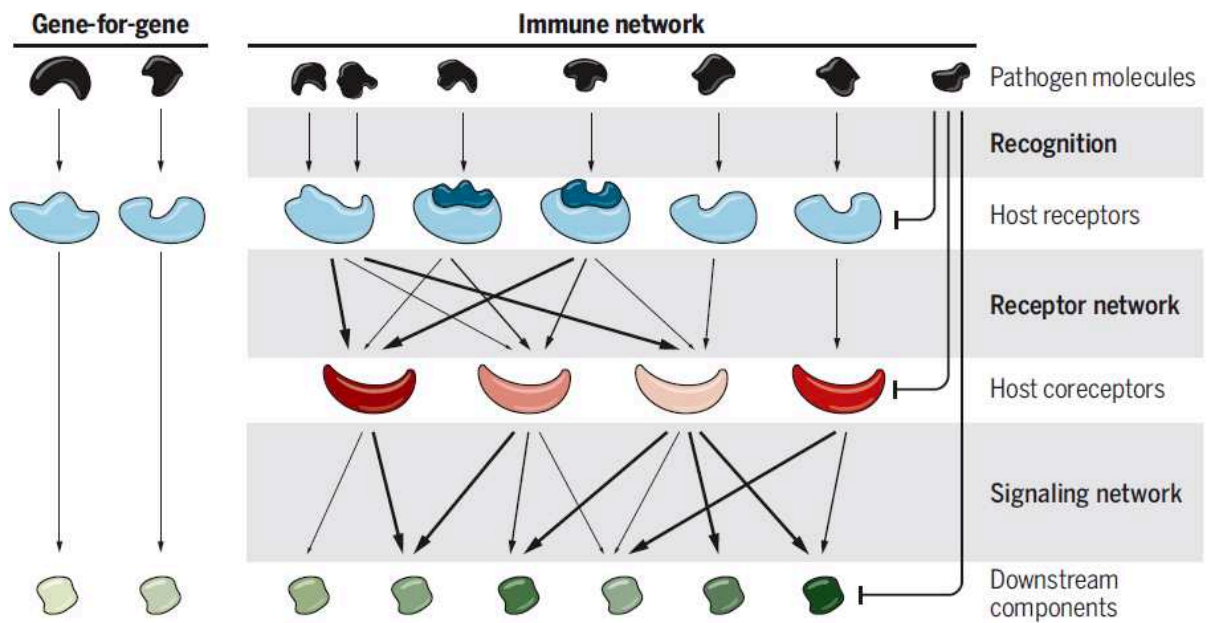
## I. Apport cognitif de notre étude pour la PTI chez la pomme de terre

La PTI se traduit par une cascade de réactions qui amènera à la défense. L'introduction bibliographique de ce manuscrit a présenté ces différentes réactions (perception, réactions rapides, signalisation...). Malgré les limites de notre étude, les résultats obtenus donnent des éléments de compréhension de la PTI chez la pomme de terre après application des trois éliciteurs. Ces éléments sont présentés figure 1.

**Concernant la perception**, le CCF, le BABA et les extraits d'*Ulva*, sont probablement perçus par différents récepteurs. Le CCF pourrait être perçu par le récepteur ELR qui a été identifié comme récepteur pour INF1 et INF5 mais pas pour INF4 (Du *et al.*, 2015) et le galactan par un récepteur non encore identifié (Choi and Klessig, 2016). Le BABA est probablement perçu à l'intérieur de la cellule végétale par le récepteur IB11 (Luna *et al.*, 2014). Les ulvanes sont des polysaccharides proches de la pectine, et majoritaires dans la paroi des algues vertes (Vera *et al.*, 2011). Ils pourraient donc être perçus indirectement par le récepteur WAK1 des pectines. Cependant, les récepteurs de l'ulvane n'ont pas encore été identifiés (Jaulneau 2010).

Pour le CCF et l'extrait d'*Ulva*, contenant un mélange des molécules potentiellement perçues, il est probable que la perception soit faite par un réseau de récepteurs. Ce concept de réseau de récepteurs est assez nouveau. Wu *et al.* (2018) questionnant la théorie binaire de Flor (1971), modèle gène-pour-gène, ont mis en évidence différents réseaux de récepteurs donc un système immunitaire plus complexe entraînant différentes interactions entre les cascades de réponses de défense (Figure 2).

L'ensemble des résultats obtenus donne de fortes indications sur le fait que les traitements avec le CCF et le BABA produisent des **ROS** contrairement à l'extrait d'*Ulva* qui ne semble pas induire de réaction pariétale. Saubeau *et al.* (2013) avaient déjà suggéré la présence de ROS après traitement de cultures cellulaires de pomme de terre par le CCF. Après traitement avec le BABA, Bengtsson *et al.*, (2014a) ont confirmé la présence de ROS sur les folioles et aussi des réactions d'hypersensibilité et de la callose. Par contre nos résultats ne permettent pas de déterminer quelle est l'intensité de cette production et son impact potentiel sur le développement de l'agent pathogène.



**Figure 2. Le réseau des récepteurs des plantes par Wu et al. (2018)**

La théorie de Flor (1981) est à gauche avec le schéma « gène pour gène » et à droite, un schéma hypothétique d'un réseau de récepteurs pour le déclenchement de la défense.

**Les voies de signalisation** mobilisées par les éliciteurs sont différentes. La voie du SA est probablement induite par le CCF et le BABA même si, dans les analyses, nous n'avons pas quantifié le SA. Cette hypothèse est renforcée par le fait que dans notre étude, à 48h, les gènes *PR1* et *PR2* dépendant de la voie du SA est activée (van Loon *et al.*, 2006) suggérant une activation plus précoce de cette voie. Saubeau *et al.* (2014) avait aussi montré sur la pomme de terre, l'implication de la voie du SA dans la signalisation après traitement par le CCF. De la même façon, après induction par le BABA de différentes cultures contre différents bioagresseurs (agent pathogènes et insectes), la voie de signalisation identifiée est toujours celle du SA. C'est le cas chez la tomate (Rejeb *et al.*, 2018), le soja (Zhong *et al.*, 2014), la pomme de terre (Eschen-Lippold *et al.*, 2010), et l'*Arabidopsis* (Zimmerli *et al.*, 2000). Si le mode de perception de l'extrait d'*Ulva* reste encore inconnu, il paraît clair d'après nos résultats que la voie de signalisation induite par cet éliciteur est celle du JA. Au niveau de la signalisation, Jaulneau *et al.* (2010) ont aussi vérifié sur *M. truncatula*, l'activation de la voie du JA. Ces auteurs le démontrent en utilisant des mutants d'*Arabidopsis*.

La **régulation des transcrits** est différente entre les traitements. Ainsi, la majorité des gènes choisis sont réprimés par le CCF ce qui paraît contradictoire avec les résultats précédemment obtenus par Thomas (2019). Par contre, le CCF représentant des PAMPs de *P. infestans* pourrait se comporter de la même façon mimant ainsi l'action de l'agent pathogène. L'étude de Wan *et al.* (2008) sur *A. thaliana* a aussi montré une répression des transcrits plus forte par le chiooctaose, un PAMP de champignon que la flagelline ou d'autres PAMPs bactériens. Concernant le BABA, ces sont les gènes *PRs* et la *POX* qui ont été fortement induits contrairement à tous les autres gènes ciblés qui sont réprimés. Ces gènes sont probablement des marqueurs de l'induction par le BABA car beaucoup de travaux mettent en évidence l'activation des gènes *PRs* suite à ce traitement (Bengtsson *et al.*, 2014a, 2014b). L'extrait d'*Ulva*, contrairement au CCF et au BABA a induit la majorité des gènes de la voie des phénylpropanoïdes et des alcaloïdes confirmant ainsi les travaux de El Modafar *et al.* (2012) et Abouraïcha *et al.* (2015) qui ont utilisés la *PAL*, en amont de la voie des phénylpropanoïdes, comme marqueur de défense après traitement par des extraits d'*Ulva*.

La **diversité des métabolites spécifiquement induits** marque encore plus la différence entre les traitements. Le CCF et le BABA, induisent des alcaloïdes comme la codeïne-6-glucurionide et la morphine-6-glucurionide bien que les gènes correspondants soient réprimés. Ces alcaloïdes ont déjà été identifiés chez la pomme de terre après infection par *P. infestans* (Yogendra *et al.*, 2017).



La famille des sesquiterpénoïde est aussi induite au détriment des glycoalcaloïde, comme l' $\alpha$ -chaconine (Bengtsson *et al.*, 2014b). Le faible nombre de métabolites induits par le CCF pourrait aussi s'expliquer par le décalage dans le temps entre induction des transcrits et production des métabolites. Le BABA induit un petit nombre de métabolites spécifiques appartenant au métabolisme primaire. Pastor *et al.* (2014) ont trouvé ce pattern d'induction du métabolisme primaire après traitement par le BABA sans l'agent pathogène. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le BABA est plutôt un potentialisateur de la défense (Bacelli and Mauch-Mani, 2016). Ce type d'induction permet à la plante de se préparer à l'attaque ultérieure d'un agent pathogène sans mobiliser trop d'énergie. A contrario, l'extrait d'*Ulva* a activé les gènes de la voie des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes et induit des métabolites de ces mêmes voies, comme le montre la quantification de l'acide caffeoyl quinique. C'est intéressant de souligner que l'extrait d'*Ulva* a été testé par la première fois sur pomme de terre et qu'il est capable d'induire une voie de défense spécifique à cette plante: celle des glycoalcaloïdes. Les gènes de cette voie, *SGT1* et *SGT3*, uniquement induits par cet extrait, amènent à la production de la solanine et de la chaconine. Cependant, dans notre étude, la concentration de chaconine n'est pas augmentée suite au traitement ce qui suggère que l'activation de cette voie produirait plutôt de la solanine que nous n'avons pas pu doser (McCue *et al.*, 2006, 2007).

**PTI versus ETI ?** Nous avons ciblé notre étude sur la PTI souvent liée à une réponse générale de la plante aux agents pathogènes contrairement à l'ETI associée à une réponse spécifique. Cependant, nos résultats et ceux d'autres auteurs cités au cours de ce manuscrit ont montré la capacité des éliciteurs à induire des réponses très spécifiques à chaque stress et la capacité de la plante à discriminer ces éliciteurs. L'ensemble de ces résultats questionne le concept de réponse générale de la PTI et des différences avec l'ETI. La PTI est aussi associée à une résistance quantitative ou non spécifique de la plante et l'ETI à une résistance qualitative ou spécifique (Boller and Felix, 2009). Cependant, la revue de Kushalappa *et al.* (2016) suggère que la division binaire entre PTI/ETI et la résistance quantitative/qualitative n'est pas très claire. Ainsi, Katagiri et Tsuda (2010) ont observé que sur *Arabidopsis*, l'induction de la PTI avec la flg22 ou l'induction de l'ETI avec l'effecteur de *P. syringae*, AvrRpt2, passe par la même voie de signalisation de la défense. Les auteurs suggèrent que les différences majeures entre PTI et ETI ne résultent pas de différences dans la nature de la signalisation mais de différences dans la manière dont cette signalisation commune est utilisée, la réponse étant plus rapide et plus forte avec l'ETI qu'avec la PTI.



## II. Apports de l'étude à la protection des plantes

Les résultats de ce projet de thèse apportent des éléments nouveaux pour le management des SDPs en protection des cultures. Les éliciteurs ou SDPs sont souvent étudiés par des protocoles développés pour l'application de pesticides avec ou sans efficacité. Notre travail fait suite à plusieurs travaux de recherche qui indiquent une complexité dans **l'interaction tripartite entre la plante, l'éliciteur et l'agent pathogène**.

**Concernant la plante**, certains génotypes peuvent naturellement, de façon **constitutive**, présenter un niveau déjà élevé de composés de défense efficace contre les agents pathogènes ou avoir un potentiel d'**inductibilité** suffisant pour augmenter leur production. Ces caractéristiques font partie du **potentiel génétique** du génotype. L'importance de ce potentiel a été mis en évidence sur pomme de terre dans notre étude mais aussi dans les travaux de Saubeau *et al.* (2016) et Yogendra *et al.* (2014). Ces résultats pourraient être mobilisés en amélioration des plantes en utilisant les métabolites induits différenciellement comme des candidats « marqueurs défense » pour screener les génotypes à déployer en culture.

**Concernant l'éliciteur**, dans notre étude, le CCF et le BABA ont été utilisés à des concentrations connues pour induire des réponses de défense. Pour l'extrait d'*Ulva* spp, qui n'avait pas encore été appliqué sur la pomme de terre, nous avons testé deux concentrations ce qui a permis de mettre en évidence un effet dose. Jaulneau *et al.* (2011) ont aussi testé un éliciteur à base d'algue verte à différentes doses (3, 6 et 27 mg/ml) sur *Phaseolus vulgaris* (haricot) contre trois agents pathogènes responsables de l'oïdium, *Erysiphe polygona*, *E. necator* et *Spherotheca fuliginea*. La plus grande réduction des symptômes a été observée à la dose de 6 mg/ml. Contre *B. cinerea*, le BTH a permis la réduction de symptômes sur haricot et concombre, à partir de la dose de 250 mg/L et jusqu'à 1000 mg/L alors que sur tomate, dès la dose d'1 mg/L les symptômes diminuent significativement et ce jusqu'à un seuil de 50 mg/L. A des concentrations plus fortes aucun effet de protection n'est observé (Azami-Sardoei *et al.*, 2013). L'efficacité d'un éliciteur dépend donc à la fois de la dose appliquée et de la plante ciblée. Nos résultats préliminaires indiquent aussi que la cinétique d'induction doit être pris en compte pour optimiser la production des composés de défense et donc l'efficacité de l'éliciteur. Cet élément est directement lié au positionnement optimum du traitement en condition de plein champs. Cette question devra être traitée dans la gestion des SDPs pour la protection des cultures.





Dans notre étude, chaque éliciteur a induit des patterns de défense spécifiques pour limiter la progression des agents pathogènes (Kushalappa *et al.*, 2016). Dans cette logique, un point important à réfléchir est le déclenchement de ces différentes voies de défense par l'application raisonnée d'**une combinaison d'éliciteurs**. Plusieurs études ont déjà montré ces interactions entre éliciteurs qui peuvent être bénéfiques ou non (Gust *et al.*, 2017). Ainsi, chez *Arabidopsis* les réponses de défense induites par elf18 sont augmentées par le co-traitement avec le DAMP - RALF17 (Stegmann *et al.*, 2017). La combinaison des traitements flg22 et elf18 a induit la production de ROS mais en co-traitement avec des oligogalacturonane (OGA), les flux de  $Ca^{2+}$  ont diminué (Aslam *et al.*, 2009). Des études devront donc être faites pour voir s'il n'y a pas de compétition dans la signalisation de la défense après utilisation d'une combinaison d'éliciteurs.

**L'agent pathogène** est la cible de ces produits finaux de défense induits. La question qui se pose est donc de savoir quel éliciteur appliquer contre quel agent pathogène ? Par exemple, le CCF induit dans les tubercules de pomme de terre des phénylpropanoïdes et flavonoïdes. Ces produits testés *in vitro* sont efficaces contre la bactérie *P. atrosepticum* et *P. infestans* mais pas contre *P. infestans in vivo* (Kröner *et al.* 2012). Les antimicrobiens produits ne seront donc pas efficaces contre tous les agents pathogènes d'où l'importance de notre étude de montrer le potentiel de chaque éliciteur. Dans la perspective de développement de SDPs, il serait intéressant d'identifier les gammes d'agents pathogènes à cibler en fonction des métabolites induits par chaque éliciteur.

L'ensemble des résultats acquis au cours de cette thèse soulignent la complexité de l'immunité végétale chez la pomme de terre et chez les plantes en général. Mobiliser cette immunité par l'application de SDP nécessite de prendre en compte les différents facteurs décrits ci-dessus. Il faudra aussi garder un point de vigilance sur l'impact de ces molécules sur la physiologie, la croissance de la plante et sur le coût énergétique associé à la défense (Neilson *et al.*, 2013). Idéalement, maîtriser l'ensemble de ces facteurs pourrait permettre de faire une « prescription » précise de SDPs pour une culture donnée et les agents pathogènes qui y sont associés.



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abouraïcha E, El Alaoui-Talibi Z, El Boutachfai R, Petit E, Courtois B, Courtois J, El Modafar C** (2015) Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae* **181**: 121–128
- Abramowski D, Arasimowicz-Jelonek M, Izbiańska K, Billert H, Floryszak-Wieczorek J** (2015) Nitric oxide modulates redox-mediated defense in potato challenged with *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology* **143**: 237–260
- Achuo EA, Audenaert K, Meziane H, Hofte M** (2004) The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology* **53**: 65–72
- Agrios GN** (2005) *Plant diseases caused by fungi*, 5th Edition. San Diego, CA
- Agurla S, Gayatri G, Raghavendra AS** (2014) Nitric oxide as a secondary messenger during stomatal closure as a part of plant immunity response against pathogens. *Nitric Oxide* **43**: 89–96
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* **17**: 73–90
- Algarra Alarcon A, Lazazzara V, Cappellin L, Bianchedi PL, Schuhmacher R, Wohlfahrt G, Pertot I, Biasioli F, Perazzoli M** (2015) Emission of volatile sesquiterpenes and monoterpenes in grapevine genotypes following *Plasmopara viticola* inoculation *in vitro*: VOCs of grapevines with *Plasmopara viticola*. *Journal of Mass Spectrometry* **50**: 1013–1022
- Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, et al** (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* **212–213**: 29–37
- alim'agri** (2019a) Le plan Écophyto, qu'est-ce que c'est ? <https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest>
- alim'agri** (2019b) Qu'est-ce que le biocontrôle ? <https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-que-le-biocontrole>
- Altamiranda EAG, Andreu AB, Daleo GR, Olivieri FP** (2008) Effect of  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. *Australasian Plant Pathology* **37**: 421
- Andersen CL, Jensen JL, 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**: 5245–5250
- Arfaoui A, El Hadrami A, Adam LR, Daayf F** (2016) Pre-treatment with calcium enhanced defense-related genes' expression in the soybean's isoflavones pathway in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **93**: 12–21

- Asai S, Yoshioka H** (2009) Nitric Oxide as a Partner of Reactive Oxygen Species Participates in Disease Resistance to Necrotrophic Pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 619–629
- Ashour M, Wink M, Gershenzon J** (2010) Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. In JA Roberts, ed, *Annual Plant Reviews online*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 258–303
- Aslam SN, Erbs G, Morrissey KL, Newman M-A, Chinchilla D, Boller T, Molinaro A, Jackson RW, Cooper RM** (2009) Microbe-associated molecular pattern (MAMP) signatures, synergy, size and charge: influences on perception or mobility and host defence responses. *Molecular Plant Pathology* **10**: 375–387
- Azami-Sardooei Z, Seifi HS, De Vleeschauwer D, Höfte M** (2013) Benzothiadiazole (BTH)-induced resistance against *Botrytis cinerea* is inversely correlated with vegetative and generative growth in bean and cucumber, but not in tomato. *Australasian Plant Pathology* **42**: 485–490
- de Azevedo Souza C, Li S, Lin AZ, Boutrot F, Grossmann G, Zipfel C, Somerville SC** (2017) Cellulose-Derived Oligomers Act as Damage-Associated Molecular Patterns and Trigger Defense-Like Responses. *Plant Physiology* **173**: 2383–2398
- Aziz A, Gauthier A, Bezier A, Poinssot B, Joubert J-M, Pugin A, Heyraud A, Baillieul F** (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with -1,3 glucans and -1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1463–1472
- Baccelli I, Mauch-Mani B** (2016) Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *Plant Molecular Biology* **91**: 703–711
- Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A** (2018) Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* **93**: 614–636
- Báidez AG, Gómez P, Del Río JA, Ortuño A** (2007) Dysfunctionality of the Xylem in *Olea europaea* L. Plants Associated with the Infection Process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of Phenolic Compounds in Plant Defense Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 3373–3377
- Bari R, Jones JDG** (2008) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473–488
- Beauvallet G, Gaucher D** (2015) Le choix du fongicide essentiel pour lutter contre le mildiou. ARVALIS - Institut du végétal, <https://www.arvalis-infos.fr/le-choix-du-fongicide-essentiel-pour-lutter-contre-le-mildiou-@/view-10445-arvarticle.html>
- Beddington J** (2010) Food security: contributions from science to a new and greener revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**: 61–71
- Bektas Y, Eulgem T** (2015) Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00804

- Bellée A, Cluzet S, Dufour M-C, Mérillon J-M, Corio-Costet M-F** (2018) Comparison of the Impact of Two Molecules on Plant Defense and on Efficacy against *Botrytis cinerea* in the Vineyard: A Plant Defense Inducer (Benzothiadiazole) and a Fungicide (Pyrimethanil). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**: 3338–3350
- Ben Salah I, Aghrouss S, Douira A, Aissam S, El Alaoui-Talibi Z, Filali-Maltouf A, 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**: 248–255
- Bengtsson T, Holfors A, Witzell J, Andreasson E, Liljeroth E** (2014a) Activation of defence responses to *Phytophthora infestans* in potato by BABA. *Plant Pathology* **63**: 193–202
- Bengtsson T, Weighill D, Proux-Wéra E, Levander F, Resjö S, Burra D, Moushib L, Hedley PE, Liljeroth E, Jacobson D, et al** (2014b) Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics* **15**: 315
- Benhamou N, Rey P** (2012) Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable.: I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection* **92**: 1
- Bennett MH, Gallagher MDS, Bestwick CS, Rossiter JT, Mansfield JW** (1994) The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**: 321–333
- Berens ML, Berry HM, Mine A, Argueso CT, Tsuda K** (2017) Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annu Rev Phytopathol* **55**: 401–425
- Berthelot R, RMT Elicitra** (2018) Les stimulateurs de défense des plantes: panorama et solutions d'avenir.
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H** (2015) Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**: 521–539
- Blanco FA, Zanetti ME, Daleo GR** (2007) Calcium-dependent Protein Kinases are Involved in Potato Signal Transduction in Response to Elicitors from the Oomycete *Phytophthora infestans*: Calcium-dependent Protein Kinase. *Journal of Phytopathology* **156**: 53–61
- Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC** (1990) Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. *Annual Review of Phytopathology* **28**: 113–138
- Boller T, 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**: 379–406
- Breen S, Williams SJ, Outram M, Kobe B, Solomon PS** (2017) Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends in Plant Science* **22**: 871–879



- Briand X, Cluzet S, Esquerre-Tugaye T, Salamagne S, Dumas B** (2006) Utilisation des ulvanes comme activateurs des réactions de défense des plantes et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques.
- Brisset M-N, Duge de Bernonville T** (2011) Dispositif pour déterminer ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou parties de plantes.
- Bull CT** (2018) Taxing Times — Plant Pathogens in a Global Economy.
- Burlot S** (2017) Etude de stimulateurs potentiels de défense sur culture de pomme de terre en condition contrôlée. INRA UMR IGEPP - Le Rheu, Rennes
- Carvalho FP** (2017) Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* **6**: 48–60
- Chandrasekaran M, Belachew ST, Yoon E, Chun SC** (2017) Expression of  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Gen Plant Pathol* **83**: 7–13
- Chen H, Xue L, Chintamanani S, Germain H, Lin H, Cui H, Cai R, Zuo J, Tang X, Li X, et al** (2009) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 2527–2540
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G** (2006) The *Arabidopsis* Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *The Plant Cell* **18**: 465–476
- Choi HW, Klessig DF** (2016) DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*. doi: 10.1186/s12870-016-0921-2
- Choi J, Choi D, Lee S, Ryu C-M, Hwang I** (2011) Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends in Plant Science* **16**: 388–394
- Claverie J, Balacey S, Lemaître-Guillier C, Brulé D, Chiltz A, Granet L, Noirot E, Daire X, Darblade B, Héloir M-C, et al** (2018) The Cell Wall-Derived Xyloglucan Is a New DAMP Triggering Plant Immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2018.01725
- Clément J** (2011) Stratégies de reproduction de l'oomycète hétérothallique *Phytophthora infestans* en réponse aux infections multiples et à la résistance partielle de son hôte *Solanum tuberosum*. Université Européenne de Bretagne, Rennes, France
- Clinckemaille A, Decroës A, van Aubel G, Carrola dos Santos S, Renard ME, Van Cutsem P, Legrève A** (2017) The novel elicitor COS-OGA enhances potato resistance to late blight. *Plant Pathology* **66**: 818–825
- Cluzet S, Torregrosa C, Jacquet C, Lafitte C, Fournier J, Mercier L, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé M-T, 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 & Environment* **27**: 917–928

- Cohen Y, Rubin AE, Kilfin G** (2010) Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- $\beta$ -amino-butyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology* **126**: 553–573
- Cook D, Donzelli BGG, Creamer R, Baucom DL, Gardner DR, Pan J, Moore N, Krasnoff SB, Jaromczyk JW, Schardl CL** (2017) Swainsonine Biosynthesis Genes in Diverse Symbiotic and Pathogenic Fungi. *G3-Genes|Genomes|Genetics* **7**: 1791–1797
- Cook J, Zhang J, Norrie J, Blal B, Cheng Z** (2018) Seaweed Extract (Stella Maris®) Activates Innate Immune Responses in *Arabidopsis thaliana* and Protects Host against Bacterial Pathogens. *Marine Drugs* **16**: 221
- Costet L, Fritig B, Kauffmann S** (2002) Scopoletin expression in elicitor-treated and tobacco mosaic virus-infected tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **115**: 228–235
- Couto D, Zipfel C** (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* **16**: 537–552
- Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R** (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews* **10**: 397–412
- De Vleeschauwer D, Van Buyten E, Satoh K, Balidion J, Mauleon R, Choi I-R, Vera-Cruz C, Kikuchi S, Höfte M** (2012) Brassinosteroids Antagonize Gibberellin- and Salicylate-Mediated Root Immunity in Rice. *Plant Physiology* **158**: 1833–1846
- Dellagi A, Heilbronn J, Avrova AO, Montesano M, Palva ET, Stewart HE, Toth IK, Cooke DEL, Lyon GD, Birch PRJ** (2000) A Potato Gene Encoding a WRKY-like Transcription Factor Is Induced in Interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and Is Coregulated with Class I Endochitinase Expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1092–1101
- Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A** (2013) Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00155
- Desender S, Andrivon D, Val F** (2007) Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cellular Microbiology* **9**: 21–30
- Desender S, Klarzynski O, Potin P, Barzic M-R, Andrivon D, Val F** (2006) Lipopolysaccharides of *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas corrugata* Induce Different Defence Response Patterns in Tobacco, Tomato, and Potato. *Plant Biology* **8**: 636–645
- Devaux A, Kromann P, Ortiz O** (2014) Potatoes for Sustainable Global Food Security. *Potato Research* **57**: 185–199
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843–847
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548

- Du J, Verzaux E, Chaparro-Garcia A, Bijsterbosch G, Keizer LCP, Zhou J, Liebrand TWH, Xie C, Govers F, Robatzek S, et al** (2015) Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants* **1**: 15034
- Duan Z, Lv G, Shen C, Li Q, Qin Z, Niu J** (2014) The role of jasmonic acid signalling in wheat (*Triticum aestivum* L.) powdery mildew resistance reaction. *European Journal of Plant Pathology* **140**: 169–183
- Dufour MC, Lambert C, Bouscaut J, Mérillon JM, 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**: 370–382
- Dunn WB, Erban A, Weber RJM, Creek DJ, Brown M, Breitling R, Hankemeier T, Goodacre R, Neumann S, Kopka J, et al** (2013) Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* **9**: 44–66
- Dutsadee C, Nunta C** (2008) Induction of peroxidase, scopoletin, phenolic compounds and resistance in *Hevea brasiliensis* by elicitin and a novel protein elicitor purified from *Phytophthora palmivora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **72**: 179–187
- EFSA Panel on Plant Health, Jeger M, Caffier D, Candresse T, Chatzivassiliou E, Dehnen-Schmutz K, Gilioli G, Grégoire J, Jaques Miret JA, MacLeod A, et al** (2018) Updated pest categorisation of *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal*. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5357
- El Modafar C, Elgadda M, El Boutachfai R, Abouraicha E, Zehhar N, Petit E, El Alaoui-Talibi Z, Courtois B, 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
- El Oirdi M, Trapani A, Bouarab K** (2010) The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen. *Environmental Microbiology* **12**: 239–253
- Eschen-Lippold L, Altmann S, Rosahl S** (2010) DL - $\beta$ -Aminobutyric Acid-Induced Resistance of Potato Against *Phytophthora infestans* Requires Salicylic Acid but Not Oxylipins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 585–592
- Europotato** (2019) The European Cultivated Potato Database. <https://www.europotato.org/varieties/view/Desiree-E#/>
- Fantino E, Segretin ME, Santin F, Mirkin FG, Ulloa RM** (2017) Analysis of the potato calcium-dependent protein kinase family and characterization of StCDPK7, a member induced upon infection with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Reports* **36**: 1137–1157
- FAO** (2017) FAOSTAT - Potatoes Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G** (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–9

- Fewell AM, Roddick JG** (1997) Potato glycoalkaloid impairment of fungal development. *Mycological Research* **101**: 597–603
- Fisher MC, Henk DanielA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ** (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**: 186–194
- Fliegmann J, Felix G** (2016) Immunity: Flagellin seen from all sides. *Nature Plants*. doi: 10.1038/nplants.2016.136
- Flor HH** (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275–296
- Floryszak-Wieczorek J, Arasimowicz-Jelonek M, Abramowski D** (2015) BABA-primed defense responses to *Phytophthora infestans* in the next vegetative progeny of potato. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2015.00844
- FN3PT** (2019) Fiches techniques des maladies et ravageurs de la pomme de terre. Le plant français de pomme de terre, <http://plantdepommedeterre.org/index/fiches-techniques-des-maladies-et-ravageurs>
- Fraser CM, Chapple C** (2011) The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* **9**: e0152
- de Freitas MB, Ferreira LG, Hawerth C, Duarte MER, Noseda MD, Stadnik MJ** (2015) Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. *Carbohydrate Polymers* **133**: 384–390
- de Freitas MB, 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
- Friedman M** (2006) Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 8655–8681
- Fry W** (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and *R* gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* **9**: 385–402
- Fry WE** (2016) *Phytophthora infestans*: New Tools (and Old Ones) Lead to New Understanding and Precision Management. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 529–547
- Fry WE, Birch PRJ, Judelson HS, Grünwald NJ, Danies G, Everts KL, Gevens AJ, Gugino BK, Johnson DA, Johnson SB, et al** (2015) Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. *Phytopathology* **105**: 966–981
- Fu J, Wang S** (2011) Insights into Auxin Signaling in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2011.00074
- Fukusaki E, Kobayashi A** (2005) Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100**: 347–354

- Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che F-S** (2014) Two Distinct EF-Tu Epitopes Induce Immune Responses in Rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 113–124
- Gallego-Giraldo L, Posé S, Pattathil S, Peralta AG, Hahn MG, Ayre BG, Sunuwar J, Hernandez J, Patel M, Shah J, et al** (2018) Elicitors and defense gene induction in plants with altered lignin compositions. *New Phytologist* **219**: 1235–1251
- Gamir J, Darwiche R, van't Hof P, Choudhary V, Stumpe M, Schneider R, Mauch F** (2017) The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *The Plant Journal* **89**: 502–509
- Gao J, Bi W, Li H, Wu J, Yu X, Liu D, Wang X** (2018) WRKY Transcription Factors Associated With NPR1-Mediated Acquired Resistance in Barley Are Potential Resources to Improve Wheat Resistance to *Puccinia triticina*. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2018.01486
- Gauthier A, Trouvelot S, Kelloniemi J, Frettinger P, Wendehenne D, Daire X, Joubert J-M, Ferrarini A, Delledonne M, Flors V, 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
- Giannakopoulou A, Schornack S, Bozkurt TO, Haart D, Ro D-K, Faraldos JA, Kamoun S, O'Maille PE** (2014) Variation in Capsidiol Sensitivity between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora capsici* Is Consistent with Their Host Range. *PLoS ONE* **9**: e107462
- Gika HG, Wilson ID, Theodoridis GA** (2014) LC–MS-based holistic metabolic profiling. Problems, limitations, advantages, and future perspectives. *Journal of Chromatography B* **966**: 1–6
- Ginzberg I, Thippeswamy M, Fogelman E, Demirel U, Mweetwa AM, Tokuhisa J, Veilleux RE** (2012) Induction of potato steroidal glycoalkaloid biosynthetic pathway by overexpression of cDNA encoding primary metabolism HMG-CoA reductase and squalene synthase. *Planta* **235**: 1341–1353
- Gorelova V, Ambach L, Rébeillé F, Stove C, Van Der Straeten D** (2017) Folates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification. *Frontiers in Chemistry*. doi: 10.3389/fchem.2017.00021
- Goss EM, Tabima JF, Cooke DEL, Restrepo S, Fry WE, Forbes GA, Fieland VJ, Cardenas M, Grunwald NJ** (2014) The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 8791–8796
- Goupil P, Benouaret R, Charrier O, ter Halle A, Richard C, Eyheraguibel B, Thiery D, Ledoigt G** (2012) Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology* **21**: 1541–1549
- Gunnaiah R, Kushalappa AC, Duggavathi R, Fox S, Somers DJ** (2012) Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* **7**: e40695

- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, et al** (2007) Bacteria-derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in Arabidopsis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **282**: 32338–32348
- Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T** (2017) Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science* **22**: 779–791
- Hagel JM, Facchini PJ** (2013) Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. *Plant and Cell Physiology* **54**: 647–672
- Halitschke R, Baldwin IT** (2003) Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* **36**: 794–807
- Hasegawa M, Mitsuhashi I, Seo S, Imai T, Koga J, Okada K, Yamane H, Ohashi Y** (2010) Phytoalexin Accumulation in the Interaction Between Rice and the Blast Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1000–1011
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Visser RGF, van der Vossen EAG** (2008) Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research* **51**: 47–57
- He R, Wu J, Zhang Y, Agüero CB, Li X, Liu S, Wang C, Walker MA, Lu J** (2017) Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. *Protoplasma* **254**: 1579–1589
- Henriquez MA, Soliman A, Li G, Hannoufa A, Ayele BT, Daayf F** (2016) Molecular cloning, functional characterization and expression of potato (*Solanum tuberosum*) 1-deoxy- $\alpha$ -xylulose 5-phosphate synthase 1 (*StDXS1*) in response to *Phytophthora infestans*. *Plant Science* **243**: 71–83
- Henry G, Thonart P, Ongena M** (2012) PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*
- Heuberger AL, Robison FM, Lyons SMA, Broeckling CD, Prenni JE** (2014) Evaluating plant immunity using mass spectrometry-based metabolomics workflows. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00291
- Hind SR, Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O’Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, et al** (2016) Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nature Plants*. doi: 10.1038/nplants.2016.128
- Hoffmann L** (2003) Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l’interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d’une nouvelle acyltransférase, l’Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinatate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). *Biologie cellulaire*. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS), Strasbourg

- Hol WHG, Vrieling K, van Veen JA** (2003) Nutrients decrease pyrrolizidine alkaloid concentrations in *Senecio jacobaea*. *New Phytologist* **158**: 175–181
- Hou S, Liu Z, Shen H, Wu D** (2019) Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2019.00646
- Huitema E, Vleeshouwers VGAA, Francis DM, Kamoun S** (2003) Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* **4**: 487–500
- Hukkanen AT, Kokko HI, Buchala AJ, McDougall GJ, Stewart D, Kärenlampi SO, Karjalainen RO** (2007) Benzothiadiazole Induces the Accumulation of Phenolics and Improves Resistance to Powdery Mildew in Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 1862–1870
- Iriti M, Rossoni M, Borgo M, Faoro F** (2004) Benzothiadiazole Enhances Resveratrol and Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine, Meanwhile Improving Resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 4406–4413
- Ishihara A, Hashimoto Y, Tanaka C, Dubouzet JG, Nakao T, Matsuda F, Nishioka T, Miyagawa H, Wakasa K** (2008) The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *The Plant Journal* **54**: 481–495
- Jaulneau V** (2010) Caractérisation moléculaire d'un extrait d'algues vertes, stimulateur des défenses des plantes contre les agents pathogènes. Université Toulouse 3 Paul Sabatier
- Jaulneau V, Lafitte C, Corio-Costet M-F, Stadnik MJ, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B** (2011) An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **131**: 393–401
- Jaulneau V, Lafitte C, Jacquet C, Fournier S, Salamagne S, Briand X, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B** (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
- Jiang Y, Yu D** (2016) WRKY57 regulates JAZ genes transcriptionally to compromise *Botrytis cinerea* resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* pp.00747.2016
- Jolliffe IT, Cadima J** (2016) Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **374**: 20150202
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Joosten L, van Veen JA** (2011) Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. *Phytochemistry Reviews* **10**: 127–136
- Jorge TF, Rodrigues JA, Caldana C, Schmidt R, van Dongen JT, Thomas-Oates J, António C** (2016) Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress: MASS SPECTROMETRY-BASED PLANT METABOLOMICS. *Mass Spectrometry Reviews* **35**: 620–649

- Kalinova J, Radova S** (2009) Effects of rutin on the growth of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **44**: 39–47
- Kamoun S, van West P, de Jong AJ, de Groot KE, Vleeshouwers VGAA, Govers F** (1997) A Gene Encoding a Protein Elicitor of *Phytophthora infestans* Is Down-Regulated During Infection of Potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 13–20
- Katagiri F, Tsuda K** (2010) Understanding the Plant Immune System. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1531–1536
- Katsuragi Y, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T, Che F-S** (2015) CD2-1, the C-Terminal Region of Flagellin, Modulates the Induction of Immune Responses in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 648–658
- Kazan K, Manners JM** (2009) Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **14**: 373–382
- Kiba A, Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S** (2007) Pathogenesis-related protein 1 homologue is an antifungal protein in *Wasabia japonica* leaves and confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology* **24**: 247–253
- Kidd PS, Llugany M, Poschenrieder C, Gunsé B, Barceló J** (2001) The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* **52**: 1339–1352
- Kim DS, Hwang BK** (2014) An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2295–2306
- Kim Y-S, Sano H** (2008) Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. *Phytochemistry* **69**: 882–888
- Kishimoto K, Matsui K, Ozawa R, Takabayashi J** (2005) Volatile C6-aldehydes and Allo-cimene Activate Defense Genes and Induce Resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1093–1102
- Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, Yvin J-C, Kloareg B, 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**: 115–122
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert J-M, Yvin J-C, Kopp M, Kloareg B, Fritig B** (2000) Linear b-1,3 Glucans Are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. *PLANT PHYSIOLOGY* **124**: 1027–1038
- Kostyn K, Czemplik M, Kulma A, Bortniczuk M, Skala J, Szopa J** (2012) Genes of phenylpropanoid pathway are activated in early response to *Fusarium* attack in flax plants. *Plant Science* **190**: 103–115



- Kowalchuk G, Hol W, Vanveen J** (2006) Rhizosphere fungal communities are influenced by *Senecio jacobaea* pyrrolizidine alkaloid content and composition. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2852–2859
- Krits P, Fogelman E, Ginzberg I** (2007) Potato steroidal glycoalkaloid levels and the expression of key isoprenoid metabolic genes. *Planta* **227**: 143–150
- Kröner A, Hamelin G, Andrivon D, Val F** (2011) Quantitative Resistance of Potato to *Pectobacterium atrosepticum* and *Phytophthora infestans*: Integrating PAMP-Triggered Response and Pathogen Growth. *PLoS ONE* **6**: e23331
- Kröner A, Marnet N, Andrivon D, Val F** (2012) Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* **57**: 23–31
- Krzyzaniak Y, Negrel J, Lemaitre-Guillier C, Clément G, Mouille G, Klinguer A, Trouvelot S, Héloir M-C, Adrian M** (2018) Combined enzymatic and metabolic analysis of grapevine cell responses to elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry* **123**: 141–148
- Kumar Y, Dholakia BB, Panigrahi P, Kadoo NY, Giri AP, Gupta VS** (2015) Metabolic profiling of chickpea-Fusarium interaction identifies differential modulation of disease resistance pathway. *Phytochemistry*
- Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S** (2016) Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**: 38–55
- Kuźnicki D, Meller B, Arasimowicz-Jelonek M, Braszewska-Zalewska A, Drozda A, Floryszak-Wieczorek J** (2019) BABA-Induced DNA Methylome Adjustment to Intergenerational Defense Priming in Potato to *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2019.00650
- Launay Y** (2019) Induction des défenses précoces de plantes de pomme de terre par des éliciteurs de natures différentes. Université de Rouen - Laboratoire Glyco-MEV EA4358, Rouen
- Le Boulch P** (2018) Des éliciteurs d'origine différente induisent-ils chez la pomme de terre des voies de défense spécifiques ? INRA UMR IGEPP - Le Rheu, Rennes
- Legros T** (2019) Etude cinétique de l'induction, par trois éliciteurs, des réponses de défenses de la pomme de terre cv. Désirée. INRA UMR IGEPP - Le Rheu, Rennes
- Lehmann S, Serrano M, L'Haridon F, Tjamos SE, Metraux J-P** (2015) Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* **112**: 54–62
- Li B, Meng X, Shan L, He P** (2016) Transcriptional Regulation of Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **19**: 641–650
- Li J, Brader G, Kariola T, Tapio Palva E** (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal* **46**: 477–491

- Liljeroth E, Bengtsson T, Wiik L, 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**: 171–183
- Lin W-C, Lu C-F, Wu J-W, Cheng M-L, Lin Y-M, Yang N-S, Black L, Green SK, Wang J-F, Cheng C-P** (2004) Transgenic tomato plants expressing the Arabidopsis NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research* **13**: 567–581
- van Loon LC** (2016) The Intelligent Behavior of Plants. *Trends in Plant Science* **21**: 286–294
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162
- Lucon CMM, Guzzo SD, de Jesus CO, Pascholati SF, de Goes A** (2010) Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in ‘Valencia’ oranges. *Crop Protection* **29**: 766–772
- Luna E, van Hulten M, Zhang Y, Berkowitz O, López A, Pétriacq P, Sellwood MA, Chen B, Burrell M, van de Meene A, et al** (2014) Plant perception of  $\beta$ -aminobutyric acid is mediated by an aspartyl-tRNA synthetase. *Nature Chemical Biology* **10**: 450–456
- Ma W** (2011) Roles of  $\text{Ca}^{2+}$  and cyclic nucleotide gated channel in plant innate immunity. *Plant Science* **181**: 342–346
- Ma W, Berkowitz GA** (2011)  $\text{Ca}^{2+}$  conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades: Minireview. *New Phytologist* **190**: 566–572
- Ma W, Smigel A, Tsai Y-C, Braam J, Berkowitz GA** (2008) Innate Immunity Signaling: Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  Elevation Is Linked to Downstream Nitric Oxide Generation through the Action of Calmodulin or a Calmodulin-Like Protein. *Plant Physiology* **148**: 818–828
- Ma X, Wang W, Bittner F, Schmidt N, Berkey R, Zhang L, King H, Zhang Y, Feng J, Wen Y, et al** (2016) Dual and Opposing Roles of Xanthine Dehydrogenase in Defense-Associated Reactive Oxygen Species Metabolism in Arabidopsis. *The Plant Cell* **28**: 1108–1126
- Macoy DM, Kim W-Y, Lee SY, Kim MG** (2015) Biotic stress related functions of hydroxycinnamic acid amide in plants. *Journal of Plant Biology* **58**: 156–163
- Maillard A, Ali N, Schwarzenberg A, Jamois F, Yvin J-C, Hosseini SA** (2018) Silicon transcriptionally regulates sulfur and ABA metabolism and delays leaf senescence in barley under combined sulfur deficiency and osmotic stress. *Environmental and Experimental Botany* **155**: 394–410
- Matsuda F, Morino K, Ano R, Kuzawa M, Wakasa K, Miyagawa H** (2005) Metabolic Flux Analysis of the Phenylpropanoid Pathway in Elicitor-treated Potato Tuber Tissue. *Plant and Cell Physiology* **46**: 454–466

- McCue KF, Allen PV, Shepherd LVT, Blake A, Malendia Maccree M, Rockhold DR, Novy RG, Stewart D, Davies HV, Belknap WR** (2007) Potato glycoesterol rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis. *Phytochemistry* **68**: 327–334
- McCue KF, Allen PV, Shepherd LVT, Blake A, Whitworth J, Maccree MM, Rockhold DR, Stewart D, Davies HV, Belknap WR** (2006) The primary in vivo steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato☆. *Phytochemistry* **67**: 1590–1597
- McCue KF, Rockhold DR, Chhan A, Belknap WR** (2011) Structure of Two *Solanum tuberosum* Steroidal Glycoalkaloid Glycosyltransferase Genes and Expression of their Promoters in Transgenic Potatoes. *American Journal of Potato Research* **88**: 485–492
- McKenzie FC, Williams J** (2015) Sustainable food production: constraints, challenges and choices by 2050. *Food Security* **7**: 221–233
- McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW** (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal* **17**: 523–534
- Meller B, Kuźnicki D, Arasimowicz-Jelonek M, Deckert J, Floryszak-Wieczorek J** (2018) BABA-Primed Histone Modifications in Potato for Intergenerational Resistance to *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2018.01228
- Menard R** (2004) -1,3 Glucan Sulfate, but Not -1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* **16**: 3020–3032
- Meng X, Zhang S** (2013) MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 245–266
- Mittag J, Šola I, Rusak G, Ludwig-Müller J** (2015) *Physcomitrella patens* auxin conjugate synthetase (GH3) double knockout mutants are more resistant to *Pythium* infection than wild type. *Journal of Plant Physiology* **183**: 75–83
- Morimoto S, Suemori K, Moriwaki J, Taura F, Tanaka H, Aso M, Tanaka M, Suemune H, Shimohigashi Y, Shoyama Y** (2001) Morphine Metabolism in the Opium Poppy and Its Possible Physiological Function. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **276**: 38179–38184
- Mur LAJ, Prats E, Pierre S, Hall MA, Hebelstrup KH** (2013) Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00215
- Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T** (2009) Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **230**: 517–527

- Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Dai X, Zhao PX, Dixon RA** (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways: Phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology* no-no
- Neilson EH, Goodger JQD, Woodrow IE, Møller BL** (2013) Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science* **18**: 250–258
- Nenaah GE** (2011) Toxic and antifeedant activities of potato glycoalkaloids against *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research* **47**: 185–190
- Nguyen V-L, Truong C-T, Nguyen BCQ, Vo T-NV, Dao T-T, Nguyen V-D, Trinh D-TT, Huynh HK, Bui C-B** (2017) Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* Linn. *PLOS ONE* **12**: e0185674
- Ning Y, Liu W, Wang G-L** (2017) Balancing Immunity and Yield in Crop Plants. *Trends in Plant Science* **22**: 1069–1079
- Nitta Y, Ding P, Zhang Y** (2014) Identification of additional MAP kinases activated upon PAMP treatment. *Plant Signaling & Behavior* **9**: e976155
- Nowicki M, Foolad MR, Nowakowska M, Kozik EU** (2012) Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding. *Plant Disease* **96**: 4–17
- Oerke E-C** (2006) Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**: 31–43
- Olivieri FP, Lobato MC, González Altamiranda E, Daleo GR, Huarte M, Guevara MG, Andreu AB** (2009) BABA effects on the behaviour of potato cultivars infected by *Phytophthora infestans* and *Fusarium solani*. *European Journal of Plant Pathology* **123**: 47–56
- Ouanas S, Hamelin G, Hervet M, Andrivon D, Val F, Yahiaoui-Zaidi R** (2017) Protection against bacterial soft rot by olive extracts is related to general defence induction in potato tubers. *Plant Pathology* **66**: 404–411
- Palmer IA, Shang Z, Fu ZQ** (2017) Salicylic acid-mediated plant defense: Recent developments, missing links, and future outlook. *Frontiers in Biology* **12**: 258–270
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR** (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. doi: 10.1017/jns.2016.41
- Pandey MK, Pandey R, Singh VP, Pandey VB, Singh UP** (2002) Antifungal Activity of 4',7-Dimethoxyisoflavone Against Some Fungi. *Mycobiology* **30**: 55
- Pastor V, Balmer A, Gamir J, Flors V, Mauch-Mani B** (2014) Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00295
- Paulert R, Talamini V, Cassolato JEF, Duarte MER, Noseda MD, Smania A, Stadnik MJ** (2009) Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed

- Ulva fasciata on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection* **116**: 263–270
- Perchepped L, Balagué C, Riou C, Claudel-Renard C, Rivière N, Grezes-Besset B, Roby D** (2010) Nitric Oxide Participates in the Complex Interplay of Defense-Related Signaling Pathways Controlling Disease Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 846–860
- Perrone ST, McDonald KL, Sutherland MW, Guest DI** (2003) Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**: 127–135
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: 45e–445
- Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P** (2015) Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist* **206**: 948–964
- Pichersky E, Raguso RA** (2018) Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist* **220**: 692–702
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM** (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521
- Pushpa D, Yogendra KN, Gunnaiah R, Kushalappa AC, Murphy A** (2014) Identification of Late Blight Resistance-Related Metabolites and Genes in Potato through Nontargeted Metabolomics. *Plant Molecular Biology Reporter* **32**: 584–595
- Qi Z, Verma R, Gehring C, Yamaguchi Y, Zhao Y, Ryan CA, Berkowitz GA** (2010) Ca<sup>2+</sup> signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 21193–21198
- Quintana-Rodriguez E, Morales-Vargas AT, Molina-Torres J, Ádame-Alvarez RM, Acosta-Gallegos JA, Heil M** (2015) Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Ecology* **103**: 250–260
- Raina S, Wankhede D, Jaggi M, Singh P, Jalmi S, Raghuram B, Sheikh A, Sinha A** (2012) CrMPK3, a mitogen activated protein kinase from *Catharanthus roseus* and its possible role in stress induced biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *BMC Plant Biology* **12**: 134
- Raker CM, Spooner DM** (2002) Chilean Tetraploid Cultivated Potato, , is Distinct from the Andean Populations. *Crop Science* **42**: 1451
- Ranf S** (2017) Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 68–77

- Rapicavoli JN, Blanco-Ulate B, Muszyński A, Figueroa-Balderas R, Morales-Cruz A, Azadi P, Dobruchowska JM, Castro C, Cantu D, Roper MC** (2018) Lipopolysaccharide O-antigen delays plant innate immune recognition of *Xylella fastidiosa*. *Nature Communications*. doi: 10.1038/s41467-018-02861-5
- Reczek CR, Chandel NS** (2015) ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* **33**: 8–13
- Rejeb IB, Pastor V, Gravel V, Mauch-Mani B** (2018) Impact of beta-aminobutyric acid on induced resistance in tomato plants exposed to a combination of abiotic and biotic stress. *Journal of Agricultural Science and Botany*. doi: 10.35841/2591-7897.2.3.12-23
- Robatzek S, Bittel P, Chinchilla D, Köchner P, Felix G, Shiu S-H, Boller T** (2007) Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Molecular Biology* **64**: 539–547
- Rojas Rodas F, Rodriguez TO, Murai Y, Iwashina T, Sugawara S, Suzuki M, Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Saito K, Kitajima J, et al** (2014) Linkage mapping, molecular cloning and functional analysis of soybean gene Fg2 encoding flavonol 3-O-glucoside (1 → 6) rhamnosyltransferase. *Plant Mol Biol* **84**: 287–300
- Rong W, Luo M, Shan T, Wei X, Du L, Xu H, Zhang Z** (2016) A Wheat Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase TaCAD12 Contributes to Host Resistance to the Sharp Eyespot Disease. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.01723
- Rousselle P, Robert Y, Crosnier J-C** (1996) La pomme de terre: Production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. Editions Quae
- Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C** (2002) Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* **59**: 23–32
- Sabella E, Luvisi A, Aprile A, Negro C, Vergine M, Nicolì F, Miceli A, De Bellis L** (2018) *Xylella fastidiosa* induces differential expression of lignification related-genes and lignin accumulation in tolerant olive trees cv. Leccino. *Journal of Plant Physiology* **220**: 60–68
- Sade D, Shriki O, Cuadros-Inostroza A, Tohge T, Semel Y, Haviv Y, Willmitzer L, Fernie AR, Czosnek H, Brotman Y** (2015) Comparative metabolomics and transcriptomics of plant response to Tomato yellow leaf curl virus infection in resistant and susceptible tomato cultivars. *Metabolomics* **11**: 81–97
- Salek RM, Steinbeck C, Viant MR, Goodacre R, Dunn WB** (2013) The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience*. doi: 10.1186/2047-217X-2-13
- Sarquís JI, Coria NA, Aguilar I, Rivera A** (2000) Glycoalkaloid content in *Solanum* species and hybrids from a breeding program for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). *American Journal of Potato Research* **77**: 295–302

- Saubeau G** (2014) Implication de la PAMPs-Triggered Immunity dans la résistance quantitative de la pomme de terre à *Phytophthora infestans*. Agrocampus-Ouest, Rennes
- Saubeau G, Gaillard F, Legentil L, Nugier-Chauvin C, Ferrières V, Andrivon D, Val F** (2014) Identification of Three Elicitins and a Galactan-Based Complex Polysaccharide from a Concentrated Culture Filtrate of *Phytophthora infestans* Efficient against *Pectobacterium atrosepticum*. *Molecules* **19**: 15374–15390
- Saubeau G, Goulitquer S, Barloy D, Potin P, Andrivon D, Val F** (2013) Differential induction of oxylipin pathway in potato and tobacco cells by bacterial and oomycete elicitors. *Plant Cell Reports* **32**: 579–589
- Saubeau G, Perrin F, Marnet N, Andrivon D, Val F** (2016) Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **65**: 342–352
- Savary S, Ficke A, Aubertot J-N, Hollier C** (2012) Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* **4**: 519–537
- Schellenberger S** (2012) Impact of Oxygen and Pesticides on Microbial Cellulose Degradation in Aerated Agricultural Soils: A Microscaled Analysis of Processes and Prokaryotic Populations. University of Bayreuth, Faculty of Biology, Chemistry and Earth Sciences
- Schwarzenbacher RE, Luna E, Ton J** (2014) The discovery of the BABA receptor: scientific implications and application potential. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00304
- Schwessinger B, Zipfel C** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 389–395
- Scossa F, Brotman Y, de Abreu e Lima F, Willmitzer L, Nikoloski Z, Tohge T, Fernie AR** (2016) Genomics-based strategies for the use of natural variation in the improvement of crop metabolism. *Plant Science* **242**: 47–64
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux J-P** (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00274
- Seybold H, Trempel F, Ranf S, Scheel D, Romeis T, Lee J** (2014) Ca<sup>2+</sup> signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca<sup>2+</sup> decoding mechanisms. *New Phytologist* **204**: 782–790
- Sharan M, Taguchi G, Gonda K, Jouke T, Shimosaka M, Hayashida N, Okazaki M** (1998) Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science* **132**: 13–19
- Sharma K, Butz AF, 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**: 1062–1071

- Shepherd LVT, Hackett CA, Alexander CJ, McNicol JW, Sungurtas JA, Stewart D, McCue KF, Belknap WR, Davies HV** (2015a) Modifying glycoalkaloid content in transgenic potato – Metabolome impacts. *Food Chemistry* **187**: 437–443
- Shepherd LVT, Hackett CA, Alexander CJ, McNicol JW, Sungurtas JA, Stewart D, McCue KF, Belknap WR, Davies HV** (2015b) Modifying glycoalkaloid content in transgenic potato – Metabolome impacts. *Food Chemistry* **187**: 437–443
- Shigenaga AM, Berens ML, Tsuda K, Argueso CT** (2017) Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 164–172
- Shin SH, Pak J-H, Kim MJ, Kim HJ, Oh JS, Choi HK, Jung HW, Chung YS** (2014) An Acidic PATHOGENESIS-RELATED1 Gene of *Oryza grandiglumis* is Involved in Disease Resistance Response Against Bacterial Infection. *The Plant Pathology Journal* **30**: 208–214
- Shine MB, Yang J-W, El-Habbak M, Nagyabhyru P, Fu D-Q, Navarre D, Ghabrial S, Kachroo P, Kachroo A** (2016) Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. *New Phytologist* **212**: 627–636
- Sivankalyani V, Feygenberg O, Diskin S, Wright B, Alkan N** (2016) Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. *Postharvest Biology and Technology* **111**: 132–139
- Stegmann M, Monaghan J, Smakowska-Luzan E, Rovenich H, Lehner A, Holton N, Belkhadir Y, Zipfel C** (2017) The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* **355**: 287–289
- Stephuhn A, Baldwin IT** (2007) Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecology Letters* **10**: 499–511
- Stotz HU, Jikumaru Y, Shimada Y, Sasaki E, Stingl N, Mueller MJ, Kamiya Y** (2011) Jasmonate-Dependent and COI1-Independent Defense Responses Against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*: Auxin is Part of COI1-Independent Defense Signaling. *Plant and Cell Physiology* **52**: 1941–1956
- Sun H, Wang L, Zhang B, Ma J, Hettenhausen C, Cao G, Sun G, Wu J, Wu J** (2014) Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4305–4315
- Sundur S, Shrivastava B, Sharma P, Raj SS, Jayasekhar** (2014) A REVIEW ARTICLE OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES AND BIOLOGICAL IMPORTANCE OF *CALOPHYLLUM INOPHYLLUM*. *International Journal of Advanced Research* **2**: 5
- Syed Ab Rahman SF, Singh E, Pieterse CMJ, Schenk PM** (2018) Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science* **267**: 102–111



- Tai HH, Worrall K, Pelletier Y, De Koeyer D, Calhoun LA** (2014) Comparative Metabolite Profiling of *Solanum tuberosum* against Six Wild *Solanum* Species with Colorado Potato Beetle Resistance. *J Agric Food Chem* **62**: 9043–9055
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK** (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 260–270
- The Potato Genome Sequencing Consortium** (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**: 189–195
- Thevenet D, Pastor V, Baccelli I, Balmer A, Vallat A, Neier R, Glauser G, Mauch-Mani B** (2017) The priming molecule  $\beta$ -aminobutyric acid is naturally present in plants and is induced by stress. *New Phytologist* **213**: 552–559
- Tholl D** (2015) Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *In* J Schrader, J Bohlmann, eds, *Biotechnology of Isoprenoids*. Springer International Publishing, Cham, pp 63–106
- Thomas C** (2019) Interactions entre résistance induite chez *Solanum tuberosum* et traits d’histoire de vie et effecteurs de *Phytophthora infestans*. Agrocampus-Ouest, Rennes
- Thomas C, Le Boulch P, Andrivon D, Val F** (2019a) Potato genotypes differentially alter the expression of *Phytophthora infestans* effectors during PAMP-mediated resistance induction. bioRxiv. doi: 10.1101/547984
- Thomas C, Mabon R, Andrivon D, Val F** (2019b) The Effectiveness of Induced Defense Responses in a Susceptible Potato Genotype Depends on the Growth Rate of *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**: 76–85
- Trapet P, Kulik A, Lamotte O, Jeandroz S, Bourque S, Nicolas-Francès V, Rosnoblet C, Besson-Bard A, Wendehenne D** (2015) NO signaling in plant immunity: A tale of messengers. *Phytochemistry* **112**: 72–79
- Treutter D** (2010) Managing Phenol Contents in Crop Plants by Phytochemical Farming and Breeding—Visions and Constraints. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 807–857
- Ueno Y, Yoshida R, Kishi-Kaboshi M, Matsushita A, Jiang C-J, Goto S, Takahashi A, Hirochika H, Takatsuji H** (2015) Abiotic Stresses Antagonize the Rice Defence Pathway through the Tyrosine-Dephosphorylation of OsMPK6. *PLOS Pathogens* **11**: e1005231
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL** (2007) The Phytotoxin Coronatine Contributes to Pathogen Fitness and Is Required for Suppression of Salicylic Acid Accumulation in Tomato Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 955–965
- van Aubel G, Buonatesta R, Van Cutsem P** (2014) COS-OGA: A novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. *Crop Protection* **65**: 129–137

- van Aubel G, Serderidis S, Ivens J, Clinckemaillie A, Legrève A, Hause B, Van Cutsem P** (2018) Oligosaccharides successfully thwart hijacking of the salicylic acid pathway by *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Plant Pathology* **67**: 1901–1911
- Vargas P, Farias GA, Nogales J, Prada H, Carvajal V, Barón M, Rivilla R, Martín M, Olmedilla A, Gallegos M-T** (2013) Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system: Flavonoids affect Pto DC3000 virulence. *Environmental Microbiology Reports* **5**: 841–850
- Vera J, Castro J, Gonzalez A, Moenne A** (2011) Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. *Marine Drugs* **9**: 2514–2525
- Veronico P, Paciolla C, Pomar F, De Leonardis S, García-Ulloa A, Melillo MT** (2018) Changes in lignin biosynthesis and monomer composition in response to benzothiadiazole and root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infection in tomato. *Journal of Plant Physiology* **230**: 40–50
- Vogel-Adghough D, Stahl E, Návarová H, Zeier J** (2013) Pipecolic acid enhances resistance to bacterial infection and primes salicylic acid and nicotine accumulation in tobacco. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e26366
- Wan J, Zhang X-C, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim S, Stacey MG, Stacey G** (2008) A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**: 471–481
- Wang J, Bi Y, Zhang Z, Zhang H, Ge Y** (2011a) Reduction of Latent Infection and Enhancement of Disease Resistance in Muskmelon by Preharvest Application of Harpin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 12527–12533
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell* **14**: S131–S151
- Wang N, Xiao B, Xiong L** (2011b) Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice. *Journal of Plant Physiology* **168**: 2212–2224
- Want E, Masson P** (2011) Processing and Analysis of GC/LC-MS-Based Metabolomics Data. *In* TO Metz, ed, *Metabolic Profiling*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 277–298
- Wasternack C, Strnad M** (2019) Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites — Pathways, transcription factors and applied aspects — A brief review. *New Biotechnology* **48**: 1–11
- Wei Z, Betz FS** (2006) Messenger®: An Environmentally Sound Solution for Crop Production and Protection. *In* AS Felsot, KD Rucke, eds, *Crop Protection Products for Organic Agriculture*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 195–211
- Winkel-Shirley B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 218–223
- Wittstock U, Gershenson J** (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 300–307

- Wu C-H, Derevnina L, Kamoun S** (2018) Receptor networks underpin plant immunity. *Science* **360**: 1300–1301
- Yamada Y, Sato F** (2016) Tyrosine phosphorylation and protein degradation control the transcriptional activity of WRKY involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep31988
- Yan S, Dong X** (2014) Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 64–68
- Yang W, Xu X, Li Y, Wang Y, Li M, Wang Y, Ding X, Chu Z** (2016) Rutin-Mediated Priming of Plant Resistance to Three Bacterial Pathogens Initiating the Early SA Signal Pathway. *PLOS ONE* **11**: e0146910
- Yao L, Zhong Y, Wang B, Yan J, Wu T** (2019) BABA application improves soybean resistance to aphid through activation of phenylpropanoid metabolism and callose deposition. *Pest Management Science*. doi: 10.1002/ps.5526
- Yin H, Du Y, Dong Z** (2016) Chitin Oligosaccharide and Chitosan Oligosaccharide: Two Similar but Different Plant Elicitors. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.00522
- Yogendra KN, Dhokane D, Kushalappa AC, Sarmiento F, Rodriguez E, Mosquera T** (2017) StWRKY8 transcription factor regulates benzylisoquinoline alkaloid pathway in potato conferring resistance to late blight. *Plant Science* **256**: 208–216
- Yogendra KN, Kumar A, Sarkar K, Li Y, Pushpa D, Mosa KA, Duggavathi R, Kushalappa AC** (2015) Transcription factor *StWRKY1* regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato. *Journal of Experimental Botany* **66**: 7377–7389
- Yogendra KN, Kushalappa AC** (2016) Integrated transcriptomics and metabolomics reveal induction of hierarchies of resistance genes in potato against late blight. *Functional Plant Biology* **43**: 766
- Yogendra KN, Kushalappa AC, Sarmiento F, Rodriguez E, Mosquera T** (2014a) Metabolomics deciphers quantitative resistance mechanisms in diploid potato clones against late blight. *Functional Plant Biology*. doi: 10.1071/FP14177
- Yogendra KN, Pushpa D, Mosa KA, Kushalappa AC, Murphy A, Mosquera T** (2014b) Quantitative resistance in potato leaves to late blight associated with induced hydroxycinnamic acid amides. *Functional & Integrative Genomics* **14**: 285–298
- Yoshida K, Schuenemann VJ, Cano LM, Pais M, Mishra B, Sharma R, Lanz C, Martin FN, Kamoun S, Krause J, et al** (2013) The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.00731
- Yuan Y, Chung J-D, Fu X, Johnson VE, Ranjan P, Booth SL, Harding SA, Tsai C-J** (2009) Alternative splicing and gene duplication differentially shaped the regulation of isochorismate synthase in *Populus* and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 22020–22025

- Yun B-W, Feechan A, Yin M, Saidi NBB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang J-G, Kwon E, Spoel SH, et al** (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**: 264–268
- Zaynab M, Fatima M, Abbas S, Sharif Y, Umair M, Zafar MH, Bahadar K** (2018) Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis* **124**: 198–202
- Zhang C, Wang X, Zhang F, Dong L, Wu J, Cheng Q, Qi D, Yan X, Jiang L, Fan S, et al** (2017a) Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-07832-2
- Zhang X, Francis MI, Dawson WO, Graham JH, Orbović V, Triplett EW, Mou Z** (2010) Over-expression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *European Journal of Plant Pathology* **128**: 91–100
- Zhang Y, Butelli E, De Stefano R, Schoonbeek H, Magusin A, Pagliarani C, Wellner N, Hill L, Orzaez D, Granell A, et al** (2013) Anthocyanins Double the Shelf Life of Tomatoes by Delaying Overripening and Reducing Susceptibility to Gray Mold. *Current Biology* **23**: 1094–1100
- Zhang Y, Yan H, Wei X, Zhang J, Wang H, Liu D** (2017b) Expression analysis and functional characterization of a pathogen-induced thaumatin-like gene in wheat conferring enhanced resistance to *Puccinia triticina*. *Journal of Plant Interactions* **12**: 332–339
- Zhao Q, Dixon RA** (2014) Altering the Cell Wall and Its Impact on Plant Disease: From Forage to Bioenergy. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 69–91
- Zhong Y, Wang B, Yan J, Cheng L, Yao L, Xiao L, Wu T** (2014) DL- $\beta$ -Aminobutyric Acid-Induced Resistance in Soybean against *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE* **9**: e85142
- Zhou M, Wang W** (2018) Recent Advances in Synthetic Chemical Inducers of Plant Immunity. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2018.01613
- Ziegler J, Facchini PJ** (2008) Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 735–769
- Zimmerli L, Jakab G, Metraux J-P, Mauch-Mani B** (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 12920–12925
- Zipfel C** (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **20**: 10–16
- Zipfel C** (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 414–420
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G** (2006) Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* **125**: 749–760

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



**Titre:** Induction de la PAMP-Triggered Immunity par des éliciteurs d'origine différente chez *Solanum tuberosum* par **Rafaela Lopes Martin**

**Mots clés:** BABA, composés antimicrobiens, extrait d'*Ulva*, PAMPs de *P. infestans*, pomme de terre

**Résumé:** L'induction de réponses de défense via la Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)-Triggered Immunity fournit à toutes les plantes un arsenal de composés antimicrobiens contre les agents pathogènes. La stimulation de ces défenses par des éliciteurs exogènes serait une stratégie pour réduire les pesticides mais nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de l'induction qui pourrait dépendre de l'éliciteur et du génotype. Deux génotypes de pomme de terre partiellement résistants à *Phytophthora infestans* ont été traités avec un PAMPs de *P. infestans*, un filtrat de culture concentré (CCF), une molécule synthétique, l'acide  $\beta$ -aminobutyrique (BABA) et un extrait d'*Ulva* spp. Les métabolites induits dans les folioles, 48h plus tard, ont été comparés par une approche de métabolomique non ciblée (UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>) puis par des approches ciblées de

métabolomique et transcriptomique. Les résultats ont montré que (i) chaque éliciteur induit une reprogrammation spécifique du métabolome confirmée partiellement par les transcrits : BABA et CCF ont induit les benzylisoquinoléine alcaloïdes et l'extrait d'*Ulva*, les stérols alcaloïdes et les phénylpropanoïdes; (ii) la signalisation dépend de la voie du JA pour l'extrait d'*Ulva*, et de celle du SA pour BABA et CCF ; (iii) l'abondance de certains métabolites est génotype-dépendant. Nos résultats suggèrent que l'induction des composés antimicrobiens dépend de la perception spécifique de l'éliciteur et de l'interaction éliciteur/génotype. Afin d'améliorer leur efficacité sur le terrain, une attention particulière doit être portée à la signature métabolique de défense générée par chaque éliciteur.

**Title:** Induction of PAMP-Triggered Immunity by elicitors of different origin in *Solanum tuberosum* by **Rafaela Lopes Martin**

**Keywords:** BABA, antimicrobial compounds, *Ulva* extract, PAMPs of *P. infestans*, potato

**Abstract:** The induction of response defences via the Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)-Triggered Immunity provides all plants an arsenal of antimicrobial compounds against pathogens. Stimulation of these defences by exogenous elicitors could be a strategy to reduce the pesticides but this requires a better understanding of the induction mechanisms. This induction could depend on both the origin of the elicitor and the genotype. Two potato genotypes partially resistant to *Phytophthora infestans* were treated with a PAMPs from *P. infestans*, the Concentrated Culture Filtrate (CCF), a synthetic molecule, the  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA); and an *Ulva* spp extract. 48h after treatment, the induced metabolites in the leaflets were first compared by a non target metabolomic using a UPLC-qTOF-MS<sup>e</sup>, then through targeted metabolomic and transcriptomic approaches.

The results showed that (i) each elicitor induced a specific metabolic profile reprogramming, partially confirmed by transcript analysis: the BABA and the CCF induced the benzylisoquinoline alkaloids and the *Ulva* extract, the alkaloid sterols and phenylpropanoids; (ii) the signalling depended on the JA pathway for the *Ulva* extract while it is rather SA pathway-dependent for the BABA and CCF; (iii) the abundance of several antimicrobial metabolites was genotype-dependent. Our results suggest that the induction of the antimicrobial compounds depends on the elicitor/genotype interaction and on the specific perception of the elicitor. In order to improve their efficiency in the field, special attention should be paid on the defence-related metabolic print generated by each elicitor.