



HAL
open science

Caractérisation d'un effecteur de résistance du pommier à *Erwinia amylovora* induit par un stimulateur de défenses des plantes (ASM), et étude de l'impact de la chaleur sur l'efficacité du traitement

Erwan Chavonet

► To cite this version:

Erwan Chavonet. Caractérisation d'un effecteur de résistance du pommier à *Erwinia amylovora* induit par un stimulateur de défenses des plantes (ASM), et étude de l'impact de la chaleur sur l'efficacité du traitement. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0002 . tel-03721334

HAL Id: tel-03721334

<https://theses.hal.science/tel-03721334>

Submitted on 12 Jul 2022

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'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : Sciences agronomiques

Par

Erwan CHAVONET

Caractérisation d'un effecteur de résistance du pommier à *Erwinia amylovora* induit par un stimulateur de défenses des plantes (ASM), et étude de l'impact de la chaleur sur l'efficacité du traitement

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 20/01/2022
Unité de recherche : UMR 1345 IHRS

Rapporteurs avant soutenance :

Alia Dellagi Professeur, AgroParisTech, Paris
Marc Bardin Directeur de recherche, INRAE, Avignon

Composition du Jury :

Examineur : Philippe Simoneau	Professeur, Université d'Angers, Angers
Examinatrice : Elsa Ballini	Maitre de conférence, Institut Agro – SupAgro, Montpellier
Directrice de thèse : Marie-Noëlle Brisset	Directeur de recherche, INRAE, Angers
Co-encadrant de thèse : Alexandre Degrave	Maitre de conférence, Institut Agro - Agrocampus Ouest, Angers
Co-encadrant de thèse : Matthieu Gaucher	Ingénieur de recherche, INRAE, Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, mes remerciements s'adressent à Alia Dellagi et Marc Bardin qui ont accepté d'être mes rapporteurs de thèse, ainsi qu'à Elsa Ballini et Philippe Simoneau d'avoir bien voulu être examinateurs de mon travail.

Mes remerciements s'adressent ensuite tout naturellement à l'équipe ResPom sans qui tout ce travail n'aurait pu être accompli. Ces 3 ans (presque 4, avec mon stage) ont été une fantastique expérience pour moi, et m'ont permis de forger le futur scientifique que je suis. Vous m'avez offert toutes les clés pour ma réussite et de simples remerciements ne seront jamais suffisants pour exprimer ma profonde gratitude.

Mille mercis à ma directrice de thèse Marie-Noëlle Brisset, pour son aide inestimable durant ces 3 ans et notamment pour l'écriture de ce manuscrit. Tu as su me transmettre de précieux conseils sur le métier de chercheur qui me seront utiles tout au long de ma carrière. Ta disponibilité malgré les nombreuses tâches qui t'incombent et ton implication ont été une véritable chance. J'admire réellement toute l'énergie que tu mets à contribution pour les autres. J'ai notamment apprécié nos nombreux échanges de fin de journée ainsi que les manipes qu'on a pu réaliser ensemble. Enfin, je salue ta patience envers ma grammaire... finalement, l'analphabète va sûrement finir diplômé.

Je remercie tout autant mon encadrant de thèse Alexandre Degrave pour sa contribution pour l'écriture du manuscrit et l'avancée de mes travaux. Sans toi, tout ce travail sur les agglutinines n'aurait pas eu la même envergure (Saint-Agglutinines !). Ton soutien et ta sérénité à toute épreuve m'ont permis de surmonter les nombreux aléas de la thèse de manière plus apaisée. Encore merci de m'avoir accordée ta confiance pour cette thèse et pour m'avoir laissé te remplacer pour tes cours, ce qui fut une excellente opportunité d'aborder l'univers de l'enseignement (pendant que tu nageais avec les requins en N-Z).

De même, un énorme merci à l'incroyable encadrant Dr Matthieu Gaucher. Incroyable car vous avez été sur le front, à tous les niveaux de ma thèse, et su m'apporter de nombreux conseils de qualité que ce soit pour la réalisation de mes expériences, l'analyse des résultats et l'écriture (il y a des moments où j'aurais été perdu sans vous). Vous avez fait preuve d'une grande patience et pédagogie avec moi, ce dont je vous serai éternellement reconnaissant. Vos innombrables calembours et plaisanteries m'auront fait rire aux éclats (zizi !!!). Je garde d'excellents souvenirs de nos sessions pêche, durant lesquelles vous avez su me transmettre votre passion pour attraper le brochet (j'en suis qu'à la perche pour l'instant).

Merci à Anthony Juillard que j'ai eu la chance de retrouver durant quasiment les 3 années de mon doctorat. Tu as été un réel soutien durant cette épreuve du feu. On se sera bien marrer quand même (#SouthPark). Les parties de football du midi (fruits de notre amour) resteront gravées dans le marbre (une saison de folie, mais sans but pour moi). Je remercie aussi ton garde-manger sans qui j'aurais fait quelques hypoglycémies.

Merci à Antoine Bodelot, mon unique stagiaire. Tes nombreuses qualités ont été un atout dans la réalisation de ce travail de thèse. Je suis vraiment content que tu aies pu reprendre le flambeau sur les agglutinines qui je l'espère, te portera très loin (il faut un Nature maintenant). Je te souhaite ainsi une excellente réussite pour ta thèse et ta carrière scientifique.

Merci à Brice Marolleau, toujours prêt à m'aider quand j'étais dans le besoin. Tes goûts musicaux plus que certains auront été forts agréables au labo'. D'ailleurs, tes faux pétages de câble m'auront bien diverti pendant mes manipes. Je te remercie grandement pour ta participation au football, et ce malgré tes blessures.

Merci à Christelle Heintz, pour toute l'aide apportée. En effet, tu as toujours été prête à m'aider notamment durant le rush de la fin de thèse. Ce fut un réel plaisir de partager le même bureau que toi durant ces 3 ans. Je te suis également reconnaissant pour ton aide durant les cours de TP qui, sans toi, n'auraient pas pu être abordés aussi sereinement.

Merci à Raphaël Cournol, qui a dû supporter ma passion pour Céline Dion (en opposition avec ton Bob Marley). Tu as toujours été disponible pour m'apporter ton aide. Merci de m'avoir guidé durant mes premiers pas au labo. Nos nombreuses conversations (sportives, etc.) auront été forts enrichissantes et agréables.

REMERCIEMENTS

Je remercie toutes les autres personnes de passage dont j'ai pu faire l'agréable connaissance (Youenn, Arthur, etc.) notamment Lilian Marchant, qui fut notre meilleur buteur durant la saison footballistique et Mylène Ruh, qui a pu partager de nombreux conseils pour appréhender la thèse (et qui fait d'excellents gâteaux). Je remercie aussi mon cher collègue thésard du dessus Guillaume Chesneau, pour me rappeler mes nombreuses obligations de doctorant, les magnifiques buts marqués et ta sympathie. De même, je remercie Coralie Marais, notamment pour les after-work nécessaires à ma santé mentale.

Je remercie aussi sincèrement toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à mes travaux. Je remercie Philippe Guérif, Bernard Petit et Sylvain Hanteville, de m'avoir guidé en verger et aidé pour le prélèvement de greffons ou de fleurs. Sylvain, je te remercie tout particulièrement pour avoir réussi à me trouver des greffons pour ma dernière année, puisque sans toi, je n'aurais pas eu de matériel végétal nécessaire pour finaliser mes expérimentations. Je remercie aussi le plateau ImHorPhen dirigé par Rémi Gardet, et tout particulièrement Christian Cattaneo pour le soin accordé à la culture du matériel végétal. Je remercie David Macherel pour ses conseils pour l'optimisation des extractions protéiques. Je remercie les membres du plateau IMAC, Aurélia Rolland et Fabienne Simonneau, pour la prise en main des microscopes et leurs aides fréquentes pour m'aider à réaliser les meilleures prises de vue possibles. Je remercie aussi Muriel Bahut du plateau ANAN pour son aide apportée à la réalisation des microarray. Je remercie aussi Cyril Hamiaux et Joanna Bowen, pour l'accueil réservé à Alex' en N-Z et leur aide pour la caractérisation biochimique des agglutinines. De même, je remercie aussi Göran Widmalm pour son expertise sur les EPS bactériens.

Je remercie également les membres de mes comités de thèse, Fabienne Baillieul, Jean-Marc Celton et Etienne Bucher, qui ont su juger mon travail de manière critique et qui m'ont apporté de judicieux conseils pour finaliser au mieux ma thèse.

Je remercie plus personnellement les membres de ma famille qui m'ont apporté un soutien moral indispensable. Je remercie infiniment ma compagne Charlène Le Gendre, qui m'a supporté et pris grand soin de moi, notamment durant la rédaction de ce manuscrit (ta relecture fut une aide précieuse). Tu auras été une clé de voute à ma motivation et tu sais ô combien tu m'as été essentielle à la réalisation de cette thèse

Abbreviations

ABA : ABsiscic Acid	DFO : DesFerriOxamine
ABAg : <i>Agaricus Bisporus</i> Agglutinin	DHC : DiHydroChalcones
AcAm : Acétate d'Ammonium	diAGGs : di-AGGlutinins
ADR : Activated Disease Resistance	DIR : Defective in Induced Resistance
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	DTT : DiThioThréitol
ARA : ARAbinose kinase	dUTPase : dUTP-pyrophosphatase-like
ARN : Acides RiboNucléique	EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique
AGGs : AGGlutinins	EDS : Enhanced Disease Susceptibility
AHL : predicted AT-hook DNA-binding family protein	EF-Tu : Elongation Factor thermal unstable Tu
AIM1 : Abnormal Inflorescence Meristem	EIN : Ethylene INsensitive
Ams : Amylovorane synthase	ENODL : Early NODulin-Like protein
ANK : ANKyrines	EPS : ExoPolySaccharides
AOC : Allene Oxide Cyclase	EREBP : Ethylene Responsive Element Binding Factors
AOS : Allene Oxide Synthase	ERS : Ethylene Response Sensor
AP : APetala	ET : EThylène
APX : Ascorbates PeroXydases	ETI : Effector-Triggered Immunity
ATAF : <i>Arabidopsis</i> Transcription Activation Factor	ETR : EThylene Resistant
ASM : Acibenzolar-S-Methyl	ETS : Effector-Triggered Susceptibility
Avr : Avirulence	EUL : <i>EUonymus europaeus</i> Lectin
AzA : Azélaïc Acid	ExCaNa : sodium/calcium Exchanger family protein / calcium-binding EF hand family protein
AZAI : Azélaïc Acid Induced	FADH : Flavine Adenine Finucleotide réduite
BA : Benzoïc Acid	FI : Fleurs
BA2H : BA 2-Hydrolase	FLA : Fascilin-Like Arabinogalactan-protein
BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate	FM : Feuille Mature
BGAL : Beta-GALactosidase	G3P : Glycérol-3-Phosphate
BIS : BIphenyl-Synthase	G6P : Glucose-6-Phosphate
BRCA : Breast Cancer Susceptibility	G76E2 : UDP-Glucosyl transferase 76E2
BTB/POZ : Broad complex, Tramtrack, and Bric-a-brac/Pox virus and Zinc finger	G3PDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate DésHydrogénase
BXL : Beta-XyLosidase	GAL : D-mannose binding lectin protein with Apple-Like carbohydrate-binding domain
bZIP : basic leucine ZIPper containing domain proteins	GDDH : Golden Delicious double haploid
CaM : CalModuline	GibOx : <i>Arabidopsis</i> thaliana Gibberellin 2-Oxidase
CAMTA : CAIModulin-binding Transcription Activators	GK : Glycérol Kinase
CAST : Clustering Affinity Search Technique	GNA : <i>Galanthus Nivalis</i> Agglutinin
CAT : CATalase	GR : Glutathiones Réductases
CBL : Calcineurin B-Like protein	GST : Glutathione S-transferase tau
CBP60g : Calmodulin-Binding Protein 60-like	HD2C : Histone DeaCetylase 2
CC : Coiled-Coil	HSE : Heat Stress Element
CCaMK : Ca ²⁺ -CaM dependent Kinase	HSF : Heat Shock transcription Factor
CCr : CCr-NBS-LRR	HR : Hypersensitivity Response
CDC : Cell Division Control	Hrp : Harpine
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	HSP : Heat Shock Protein
CDNAJ : Chaperone DnaJ-domain	IC : IsoChorismate
CDPK : Calcium-Dependent Protein Kinases	ICS : IsoChorismate Synthase
CIPK : CBL-Interacting Protein Kinases	IRE1 : Inositol-Requiring Enzyme 1
CLV : CLAVATA	IRHS : Institut de Recherche en Horticulture et Semences
CNL : CC-NBS-LRR	ISR : Résistance Systémique Induite
CNGC : Cyclic Nucleotide-Gated ion Channels	IP3 : Inositol triPhosphate
COI : COronatine-Insensitive	IPP : Isopentényl diPhosphate
ConA : Concanavaline A	JA : Jasmonic Acid
COR : CORonatine	JA-Ile : JA conjugué à l'IsoLeucine
COV : Composés Organiques Volatiles	JAZ : JAsmonate-Zim domain
CRA : class V Chitinase-Related Agglutinin	JF : Jeune Feuille
Crypt : Cryptdin protein-related	KAC : ε-amino-α-Ketocaproic ACid
Cq : Cycle quantification	KHP : Phosphonate de potassium
CTS : ComaToSe	LACC : LACCase
CTR : Compromised for recognition of TuRnip Crinkle Virus	LecRLKs : Lectin Receptor-Like Kinases
CUC : CUp-shaped Cotyledon	LKR/SDH : Lysine-Ketoglutarate Reductase/Saccharopine DeHydrogenase bifunctional enzyme
DA : DéhydroAbiétinal	LOX : LipOXYgénase
DAG : DIAGlycerol	LPS : LipoPolySaccharides
DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns	LRR : Leucine Rich-Repeat
DDM : chromatin remodeling	LTP : Lipid Transfert Protein
DMAPP : DiMethylAllyl-diPhosphate	LysM : Lysine Motif
DMF : N-N-DiMéthylFormamide	
DEL : DP-E2F-like	

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MBF : Multiprotein Bridging Factor
MBP : Maltose Binding Protein
MeJA : MÈthyl-JASmonate
MeSA : MÈthyl-SAlicylate
miR : Micro-ARN
MLO : Mildew resistance Locus O
MLP : Major Latex Protein-like protein
MTA : 5'-MethylThioAdénosine
MYB : protéines liées à la MYéloBlastose
MYC : protéines liées à la MYéloCytomatose
NAC : NAM, ATAF, CUC
NAM : No Apical Meristem
NBS : Nucleotide-Binding Site
NBT : Nitro Blue Tetrazolium
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NDR : Nonspecific Disease Resistance
NHP : Acide N-hydroxy-Pipecolique
 Nictaba : *Nicotiana tabacum* Agglutin homologue
NIMIN : NIM-Interacting
NLR : Nucleotide-binding-Leucine-Rich repeat
NO : Nitric Oxyde
NPR : Non-expressor of Pathogenesis-Related genes
NRG : N Requirement Gene
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
ONSEN : ty1/copia-like retrotransposon
OPDA : *cis*-12-OxoPhytoDienoique
P2C : Δ1-Pipéridine-2-Carboxylique
PA : Partie Apicale
PAD : PhytoAlexin Deficient
PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAT : PATatin
PBS : Phosphate Buffer Saline
PBS3 : avrPphB Susceptible 3
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pf : Peau du fruit
phyB : Phytochrome B
PIF : Phytochrome Interacting Factor
Pip : acide Pipecolique
POX : PérOxydase
PR : Pathogenesis Related
PRP : Protéines Riches en Proline
PRR : Pattern Recognition-Receptor
PRX : PeRoXydase
PTI : PAMPs-Triggered Immunity
PSII : PhotoSystème II
PVDF : PolyVinylidène DiFluoride
R : Resistance
RBOH : Respiratory Burst Oxidase Homologue
RdDM : RNA-directed DNA Methylation
RIP : Ribosome-Inactivating Protein
RK : Receptor Kinases
RNL : CCr-NBS-LRR
ROS : Reactive Oxygen Species
RLP : Receptor-Like Proteins
RPW : Resistance to Powdery Mildew
RT : Rétro-Transcription
Rubisco : RibUlose -1, 5- BÌphoSphate Carboxylase Oxygenase
SA : Salicylic Acid
SABP : SA-Binding Protein
SAG : Senescence Associated Gene
SAR : Systemic Acquired Resistance
SARD : SAR-Seficient
SDP : Stimulateurs de Défenses des Plantes
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE : SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SKP : S-phase Kinase-associated Protein
SNP : Single Nucleotide Polymorphisme
SOD : SuperOxydes Dismutases
SPL : Squamosa-Promoter binding-Like
SR : Systemin Receptor
StMC : Structural Maintenance of Chromosomes
SyA : Syringoline A
T : Tige
T3SS : Type III Secretion System
TALE : Transcription Activator-Like Effectors
TAE : Tris, Acétate, EDTA
TCA : Acide TriChloroacétique
t-CA : trans-Cinnamic Acid
TEV : *Tobacco Etch Virus*
TE : Transposable Element
TEMED : TÈtraMÈthyléthylèneDiamine
TGA : TGACG-Binding
ThyK : Thymidine Kinase
TIR : Toll-InteRleukin
TNL : TIR-NBS-LRR
TPS : TerPene Synthase
TRX : ThioRedoXine
TuA : Tubuline-Alpha
UPR : Unfolded Protein Response
UV : UltraViolet
UVH : UV-Hypersensitive
WGA : Wheat Germ Agglutinin
WRKY : protéines avec une séquence d'acides aminés WRKYGQK

Sommaire

1 INTRODUCTION

1.1 Généralités sur l'immunité végétale

- 1.1.1 Mécanismes de défense passifs
 - 1.1.1.1 Barrières physiques
 - 1.1.1.2 Composés antimicrobiens préformés
 - 1.1.2 Reconnaissance et mécanismes de défense actifs
 - 1.1.2.1 Immunité basale déclenchée par la reconnaissance de PAMPs/DAMPs
 - 1.1.2.2 Immunité basale réprimée par les effecteurs
 - 1.1.2.3 Immunité spécifique déclenchée par la relation *R/avr*
 - 1.1.2.4 Modèle de co-évolution en zig-zag
 - 1.1.3 Voies de signalisation impliquées dans les défenses
 - 1.1.3.1 Signalisation intracellulaire
 - 1.1.3.1.1 Accumulation de ROS
 - 1.1.3.1.2 Signalisation calcique
 - 1.1.3.1.3 Kinases et facteurs de transcription
 - 1.1.3.2 Signalisation intercellulaire
 - 1.1.3.2.1 Biosynthèse du SA
 - 1.1.3.2.2 Régulation de la biosynthèse du SA
 - 1.1.3.2.3 Perception et activation des gènes SA-dépendants
 - 1.1.3.2.4 Définition de la SAR
 - 1.1.3.2.5 Les acteurs de la SAR
 - 1.1.3.3 Autres phytohormones impliquées dans les défenses
 - 1.1.3.3.1 Acide jasmonique (JA)
 - 1.1.3.3.2 Ethylène (ET)
 - 1.1.3.3.3 Interaction du JA et de l'ET avec le SA
 - 1.1.4 Réponses de défense
 - 1.1.4.1 Isolement du bioagresseur
 - 1.1.4.2 Production de protéines PR
 - 1.1.4.3 Synthèse de métabolites
- ### 1.2 Les stimulateurs de défenses des plantes
- 1.2.1 Définition et exemples de SDP
 - 1.2.2 Acibenzolar-S-methyl
 - 1.2.3 Efficacité des SDP
- ### 1.3 Cas particulier du pathosystème pommier-*E. amylovora*
- 1.3.1 Le pommier
 - 1.3.2 Le feu bactérien
 - 1.3.3 Facteurs de virulence et d'agressivité
 - 1.3.4 Sensibilité et résistance au feu bactérien
 - 1.3.4.1 QTL de résistance à *Erwinia amylovora*
 - 1.3.4.2 Les défenses du pommier face à *E. amylovora*

2 CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU FACTEUR DE RÉSISTANCE INDUIT PAR L'ASM, LES MDAGGS

2.1 Généralités sur les lectines végétales

- 2.1.1 Historique et définition des lectines
- 2.1.2 Classification des lectines végétales
 - 2.1.2.1 Classification selon le nombre de sites de fixation et leur spécificité
 - 2.1.2.2 Classification selon leur séquence nucléotidique et leur structure tertiaire
 - 2.1.2.3 Classification selon leur localisation et leur inductibilité
- 2.1.3 Fonction des lectines chez les plantes
 - 2.1.3.1 Rôle lié au stockage protéique
 - 2.1.3.2 Rôle de senseur cellulaire
 - 2.1.3.3 Rôle dans les symbioses racinaires
 - 2.1.3.4 Rôle dans les défenses

2.2 Découverte de lectines induites par l'ASM chez le pommier

- 2.2.1 Les MdAGGs, une nouvelle famille de protéines induites par l'ASM
- 2.2.2 Modélisation de la structure tridimensionnelle de la MdAGG10
- 2.3 Développement méthodologique pour étudier le comportement des MdAGGs**
- 2.3.1 Méthodes antérieures d'analyse transcriptionnelle et protéique
- 2.3.2 Evaluation de différentes méthodes d'extraction des MdAGGs
- 2.3.3 Optimisation de l'extraction phénolique des MdAGGs
- 2.4 Comportement transcriptionnel et protéique des MdAGGs**
- 2.4.1 Comportement basal dans les parties aériennes
- 2.4.2 Expression des MdAGGs et efficacité de différents SDP candidats
- 2.4.3 Cinétique d'induction et d'accumulation dans la jeune feuille (JF) traitée à l'ASM
- 2.4.4 Comportement systémique après une élicitation locale à l'ASM
- 2.4.5 Détection apoplastique des protéines dans les feuilles traitées à l'ASM
- 2.4.6 Etude du comportement des MdAGGs au regard de la la persistance d'action de l'ASM vis-à-vis du feu bactérien
- 2.4.7 Induction des *MdAGGs* par l'ASM dans différents organes de l'arbre en verger
- 2.4.8 Expression basale des *MdAGGs* dans les fleurs et les pédoncules floraux de différentes variétés
- 2.5 Modulation de l'expression des MdAGGs en réponse à l'infection par *E. amylovora***
- 2.5.1 Modulation T3SS-dépendante après infection de génotypes résistants ou sensibles
- 2.5.2 Rôle des facteurs de pathogénicité dans la répression des *MdAGGs* dans un génotype sensible
- 2.6 Etude fonctionnelle du rôle des MdAGGs *in vitro***
- 2.6.1 Synthèse de la MdAGG10 recombinante
- 2.6.2 Tests d'agglutination bactérienne *in vitro*
- 2.6.3 Tests d'inhibition de croissance bactérienne
- 2.6.4 Oligomérisation de la MdAGG10 selon le pH
- 2.6.5 Implication des charges électriques dans l'interaction de MdAGG10 avec les ligands
- 2.7 Discussion**

3 ETUDE DE L'EFFET DE LA CHALEUR SUR L'EFFICACITÉ DE L'ASM

3.1 Généralités sur les stress biotiques combinés aux stress abiotiques : exemple de la chaleur

- 3.1.1 Défenses des plantes faces aux contraintes environnementales
 - 3.1.1.1 Rôle du statut physiologique dans la pathogénie
 - 3.1.1.2 Impact des stress abiotiques sur les défenses
- 3.1.2 Impact de la chaleur sur la physiologie et les défenses
 - 3.1.2.1 Impacts négatifs d'un stress chaleur sur la plante
 - 3.1.2.2 Perception de la chaleur
 - 3.1.2.3 Régulation de la réponse à la chaleur
 - Régulation épigénétique
 - Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle
 - Régulation hormonale
 - 3.1.2.4 Acteurs de la tolérance à la chaleur
 - HSP
 - Antioxydants et osmoprotectants
 - Dégradation des protéines
 - Modification de la composition lipidique
 - Thermorégulation
 - 3.1.2.5 Réchauffement et thermotolérance
 - 3.1.2.6 Impact de la chaleur dans les interactions plante- pathogène

3.2 Mise au point des conditions thermiques impactant l'efficacité de l'ASM

- 3.2.1 Etude préliminaire vérifiant un effet de la chaleur sur l'ASM
- 3.2.2 Etude des conditions environnementales en verger
- 3.2.3 Effet de vagues de chaleur « naturelles » sur l'efficacité de protection de l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora*

3.3 Reprogrammation transcriptomique du pommier en réponse à l'ASM et/ou à la chaleur

- 3.3.1 Expériences et comparaisons réalisées pour l'analyse transcriptomique
- 3.3.2 Effectifs des transcrits différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons
- 3.3.3 Ontologie des gènes différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons

Catégories fonctionnelles modulées par l'ASM dans les deux modalités de température
Catégories fonctionnelles modulées par la température dans les plantes traitées à l'eau d'une part et à l'ASM d'autre part
Catégories fonctionnelles modulées par l'ASM en condition normale, mais au comportement modifié par la chaleur

3.3.4 Partitionnement des données par la méthode CAST

3.3.5 Validation des marqueurs issus de l'analyse transcriptomique

3.4 Analyse ciblée de quelques marqueurs chez le pommier en réponse à l'ASM et/ou la chaleur

3.4.1 Comportement transcriptionnel et protéique de MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10

3.4.2 Comportement des marqueurs pré-sélectionnés dans différentes situations d'application d'un stress chaleur

3.5 Discussion

Marqueurs moins induits par l'ASM en condition de chaleur

Marqueurs moins réprimés par l'ASM en condition de chaleur

4 CONCLUSION GÉNÉRALE

5 MATÉRIELS ET MÉTHODES

5.1 Matériel végétal et conditions de culture

5.1.1 Matériel végétal

5.1.2 Conditions de culture semi-contrôlées

5.1.3 Conditions de culture contrôlées

5.2 SDP candidats et procédures d'application

5.3 Souches bactériennes et procédures d'inoculation

5.3.1 Souches bactériennes et dosages des inocula

5.3.2 Méthodes d'inoculation

5.4 Évaluation de l'incidence et de la sévérité du feu bactérien

5.5 Mesure du pH apoplastique et des fuites d'électrolytes

5.6 Échantillonnage dédié à l'analyse des défenses

5.7 Analyse transcriptionnelle

5.7.1 Extraction d'ARN

5.7.2 Rétrotranscription (RT)

5.7.3 PCR quantitative (qPCR)

5.8 Analyse transcriptomique par microarray

5.8.1 Extraction, amplification et marquage

5.8.2 Hybridations et scans des puces

5.9 Analyse protéique

5.9.1 Extraction protéique des tissus

5.9.2 Extraction des fluides apoplastiques

5.9.3 Dosage et migration SDS-PAGE

5.9.4 Transfert et immunodétection

5.10 Production et caractérisation de la protéine MdAGG10 recombinante

5.10.1 Production de la MdAGG10

5.10.2 Chromatographie d'exclusion stérique

5.10.3 Spectrophotométrie par fluorescence

5.10.4 Modélisation de la structure tridimensionnelle *in silico*

5.11 Tests d'agglutination

5.12 Tests d'inhibition de croissance bactérienne

5.13 Analyse de données et statistiques

6 BIBLIOGRAPHIE

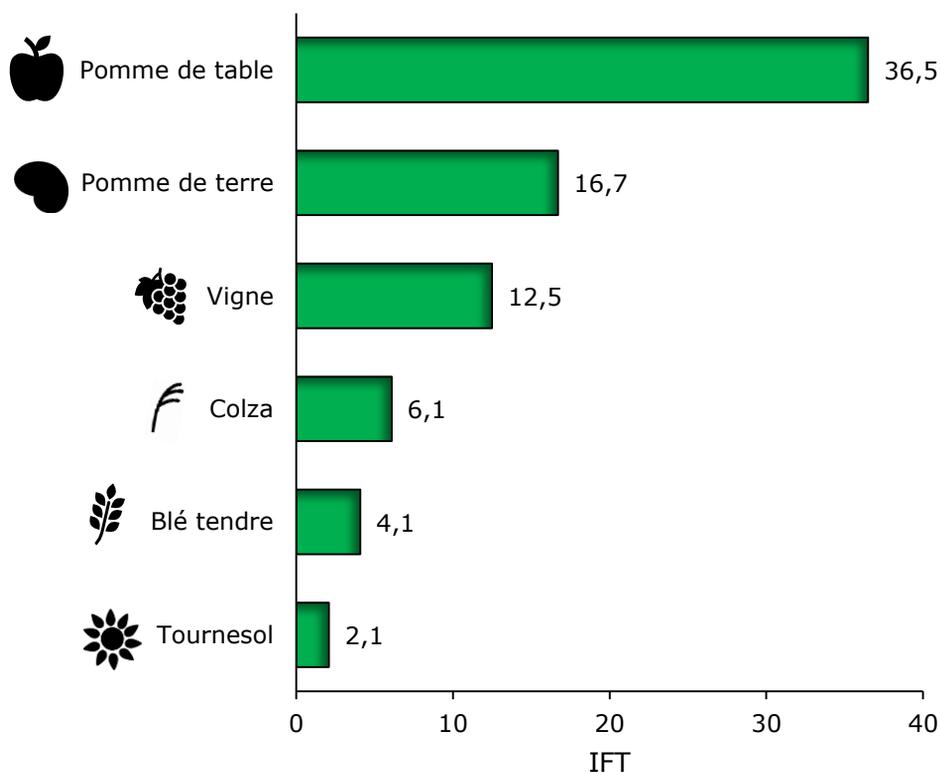


Figure 1 : Comparaison des Indices de Fréquence de Traitement (IFT) de différentes cultures (données 2006). L'IFT est calculé selon la formule : $IFT = \frac{\text{Dose appliquée}}{\text{Dose homologuée}} \times \frac{\text{Surface traitée}}{\text{Surface parcelle}}$ (d'après Butault *et al.*, 2010).

1 Introduction

La modernisation agricole d'après-guerre, appelée révolution verte, a permis de fournir jusqu'à aujourd'hui la nourriture nécessaire à une population humaine en constante augmentation (Taiz, 2013). Cette modernisation est caractérisée par la croissance de la productivité en favorisant les monocultures (Matson et al., 1997) et en bénéficiant de l'amélioration du machinisme agricole, de l'apport de fertilisants (Matson et al., 1997) et de la sélection de nouvelles variétés plus productives (Khush, 2001). Cependant, les monocultures étant très propices à la propagation des bioagresseurs des plantes, la révolution verte s'est accompagnée de l'amélioration des moyens de protection des cultures et de l'intensification de leur usage (Khush, 2001 ; Taiz, 2013). Parmi eux, l'utilisation des pesticides a permis d'éliminer directement les ravageurs et agents pathogènes (Pimentel, 1996), ainsi que les adventices pouvant servir de réservoir à des ravageurs (Capinera, 2018). De plus, les progrès de la sélection ont permis l'introgession de gènes de résistance dans de nouvelles variétés et donc de participer à la lutte contre les maladies (Khush, 2001). Néanmoins, au fil des années, la plupart des bioagresseurs ont acquis des résistances aux pesticides (Hawkins et al., 2018) ou ont contourné les résistances variétales (Kiyosawa, 1982). Cette évolution adaptative permanente des bioagresseurs oblige un renouvellement régulier de ces moyens de luttés afin de se prémunir des nouvelles menaces (Gould et al., 2018 ; Karasov et al., 2020). De plus, l'usage intensif des pesticides a des effets néfastes sur l'environnement, les écosystèmes et la santé humaine, notamment celle de l'applicateur et des consommateurs (Rani et al., 2021).

En 2006, la commission européenne élabore une nouvelle politique sur l'usage des produits phytosanitaires, obligeant les États membres à prendre des mesures de restriction de leur utilisation. Cette réglementation cherche à réduire l'impact de l'agriculture sur la santé humaine et l'environnement (Parlement européen et Conseil de l'Union européenne, 2009 ; Guichard *et al.*, 2017). La France décide donc de mettre en application un 1^{er} plan en 2008, nommé Ecophyto 2018, visant à réduire de 50% l'usage des pesticides en 10 ans. L'échec de ce dernier oblige à revoir les objectifs à la baisse, en mettant en œuvre un 2nd plan Ecophyto en 2015, qui propose de réduire de 25% d'ici 2020 et de 50% à l'horizon 2025 le recours aux produits phytosanitaires. Ce plan encourage la recherche de solutions alternatives de gestion des bioagresseurs, capables de remplacer les pesticides (MAAF et MEDDE, 2015 ; Guichard *et al.*, 2017). Pour les filières françaises très consommatrices en produits phytosanitaires, la réduction de ces intrants constitue un réel défi. L'équipe ResPom (UMR1345 IRHS) dans laquelle j'effectue ma thèse s'intéresse à cette problématique chez le pommier (*Malus domestica*), culture la plus consommatrice en produits phytopharmaceutiques sur le territoire métropolitain (Figure 1 ; Butault et al., 2010). Le pommier est une espèce pérenne attaquée par de nombreux ravageurs, les insectes piqueurs-suceurs comme le puceron vert (*Aphis pomi* ; Stoeckli et al.,

2008) ou cendré (*Dysaphis plantaginea* ; Blommers et al., 2004), les phytophages tels que les acariens (par exemple, *Panonychus ulmi* ; Kumral et al., 2007) ou les fructivores tels que le carpocapse (*Laspeyresia pomonella* ; Cisneros et Barnes, 1974). Il fait également face à de nombreuses maladies cryptogamiques dont la principale est la tavelure (*Venturia inaequalis*), mais aussi l'oïdium (*Podosphaera leucotricha*) et certains chancres (par exemple, *Nectria galligena* ; Turechek, 2004). Les maladies bactériennes sont aussi présentes au verger, en particulier le feu bactérien (*Erwinia amylovora*), difficilement contrôlable et aboutissant parfois à la mort de l'arbre (Thomson, 2000). En effet, pour éviter l'apparition d'antibiorésistance, notamment à la streptomycine pour *E. amylovora* (Jones et Schnabel, 2000), la France interdit l'usage des antibiotiques dans les cultures, bannissant la seule solution réellement efficace à court terme contre cette bactériose (Ridé, 1981). D'autres maladies fongiques altérant la conservation du fruit touchent également la filière, telles que les pourritures grises (*Botrytis cinerea*) ou bleues (*Penicillium expansum* ; Jijakli et Lepoivre, 2004).

La limitation des méthodes de lutte conventionnelles, par l'interdiction des antibiotiques ou la diminution du panel des pesticides autorisés, oblige à trouver des alternatives capables de maintenir une qualité sanitaire adéquate pour ne pas impacter économiquement la filière. En effet, la pomiculture constitue un enjeu économique important en France, en termes de production (3^e producteur européen ; 1,5 million t.an⁻¹) et d'exportation (20 % en Union Européenne, 9% dans le monde ; Butault et al., 2010 ; Bernadette 2016). Ainsi, l'équipe de ResPom travaille sur la résistance génétique et induite du pommier à ses principaux bioagresseurs (tavelure, feu bactérien et puceron cendré), dans un objectif de gestion durable. L'une des activités du groupe est d'identifier les mécanismes moléculaires associés à la résistance, la détection d'effecteurs de résistance pouvant améliorer les programmes de sélection ou le criblage de molécules élicitrices. Leur détection peut être réalisée en comparant la réponse de génotypes sensibles ou résistants en situation d'infection, ou d'un génotype sensible traité ou non par un stimulateur de défense des plantes (SDP) conférant une protection. Une première partie de mes travaux de thèse est consacrée à l'étude d'un nouvel effecteur de résistance du pommier vis-à-vis d'*E. amylovora*, le pathosystème historique du laboratoire. Ce marqueur a été détecté en explorant les défenses induites par un SDP modèle, dont la matière active est l'acibenzolar-S-méthyl (ASM), qui apporte d'excellents niveaux de protection contre le feu bactérien, mais aussi la tavelure et le puceron cendré. Cependant, même si l'ASM confère une protection élevée et répétable en conditions semi-contrôlées, celle-ci est beaucoup plus variable en verger, probablement en partie à cause des nombreux stress biotiques et abiotiques qu'un arbre peut percevoir. Une seconde partie de ma thèse aborde donc l'impact de vagues de chaleur sur l'efficacité de l'ASM, un stress environnemental qui risque de s'intensifier avec le réchauffement climatique.

1.1 Généralités sur l'immunité végétale

La première partie de ce manuscrit aborde brièvement des notions générales d'immunité végétale pour mieux appréhender les mécanismes de défense et de résistance du pommier décrits dans nos résultats.

Deux issues sont possibles au cours d'une interaction entre un agent pathogène et son hôte, conduisant à une situation de résistance ou de sensibilité. Un état de sensibilité correspond au succès infectieux de l'agent pathogène, et se caractérise donc par l'apparition de la maladie (la relation est dite compatible). Un état de résistance, sans maladie, peut être la conséquence d'une résistance hôte ou non-hôte (la relation est dite incompatible ; Keen, 1990). Dans le cas de la résistance non-hôte, les défenses préformées peuvent suffire à contenir l'agent pathogène. Si ce dernier arrive à contourner cette première ligne de défense, la plante peut déclencher des mécanismes de défense basale par la reconnaissance de motifs communs aux agents pathogènes (PAMPs pour « pathogen-associated molecular patterns ») ou des motifs endogènes à la plante suite aux dommages occasionnés par l'attaque (DAMPs pour « Damage-Associated Molecular Patterns »). Ce système de défense primitif, qui peut être assimilé à de la reconnaissance du « non-soi » ou du « soi modifié », aboutit à la résistance si celui-ci est suffisamment efficace (Niks et Marcel, 2009 ; Uma et al., 2011) mais le cas échéant, à une relation compatible. En effet, le pathogène peut être insensible aux défenses déployées ou être capable de contourner ces défenses, notamment à l'aide d'effecteurs (Métraux et al., 2009). Toutefois, les plantes disposent dans certains cas d'une dernière ligne de défense déclenchant une réponse plus rapide et intense par la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène. Cette résistance qualitative est qualifiée de résistance hôte et est gouvernée par l'interaction de « gène pour gène » conceptualisée par Flor (Flor, 1971).

1.1.1 Mécanismes de défense passifs

Les plantes sont des organismes sessiles qui ne peuvent pas échapper à leurs prédateurs ou agents pathogènes. Cependant, elles disposent de mécanismes de défense préformés qui constituent un premier obstacle à la prédation ou aux succès infectieux des bioagresseurs. Cette première ligne de défense permet d'éviter que les plantes soient systématiquement en proie à leur environnement.

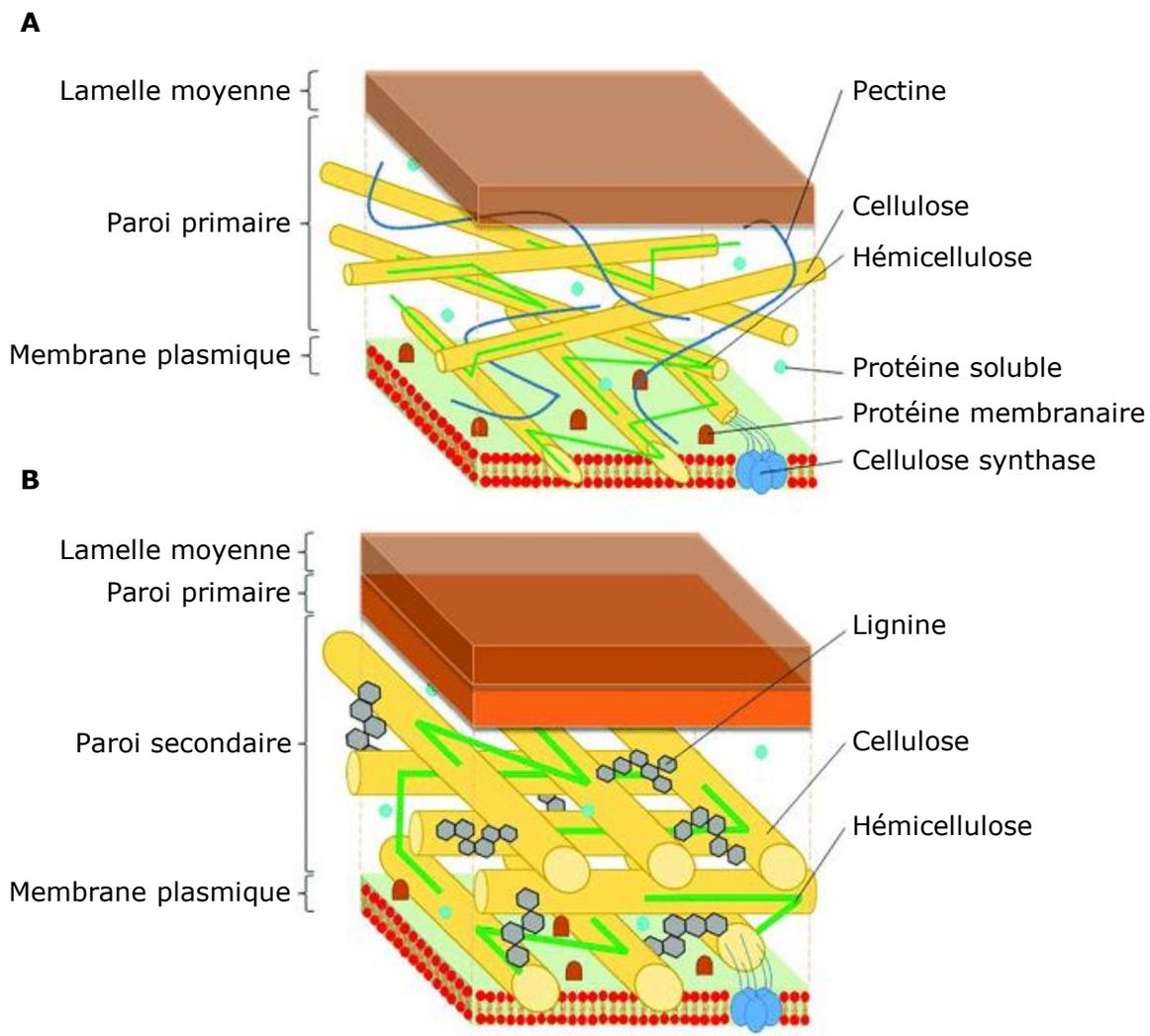


Figure 1.1.1.1 : Structure de la paroi primaire (A) et secondaire (B ; Loix et al., 2017)

1.1.1.1 Barrières physiques

Les plantes disposent de barrières physiques qui les protègent à la fois des stress abiotiques et biotiques. Dans le cas de stress causés par les bioagresseurs, ces barrières empêchent l'accès aux nutriments cellulaires (Serrano et al., 2014 ; Malinovsky et al., 2014).

La couche lipidique hydrophobe, appelée cuticule, recouvre l'épiderme de certaines espèces végétales (Fernández et al., 2016)). Outre le fait que la cuticule protège des stress abiotiques, tels que la déshydratation (Goodwin et Jenks, 2005) et les rayons UV (Krauss et al., 1997), celle-ci constitue une première barrière défensive contre les bioagresseurs (Serrano et al., 2014). La cuticule est subdivisée en deux parties, la cutine et les cires, dont la composition diffère selon le génotype, l'organe et les conditions environnementales (Fernández et al., 2016). La cutine est constituée d'un réseau d'acides gras estérifiés (C16 ou C18) qui peuvent être hydroxylés ou époxyhydroxylés (Heredia, 2003 ; Nawrath, 2006). Ce réseau est assemblé de manière covalente conférant une certaine rigidité mais aussi un support pour le dépôt de cires (Fich et al., 2016). Les cires sont plus complexes et diversifiées, puisqu'elles sont composées de molécules à longues chaînes de carbone (C24 à C36) telles que des alcools, aldéhydes, alcanes et composés cycliques comme les triterpènes et acides hydroxycinnamiques (Heredia, 2003 ; Nawrath, 2006). D'autres composés chimiques nocifs pour les bioagresseurs peuvent intégrer cette couche tels que les composés phénoliques (Karabourniotis et Liakopoulos, 2006 ; Treutter, 2006). Cependant, certains agents pathogènes fongiques sont capables de traverser la cuticule en la dégradant à l'aide de lipases ou de cutinases (Hématy et al., 2009) ou par pression mécanique exercée avec leur appressoria (Ryder et Talbot, 2015). A l'inverse, les bactéries phytopathogènes ne possèdent pas d'enzymes capables d'hydrolyser la cuticule, les obligeant à passer par les ouvertures naturelles ou par les blessures pour atteindre les cellules végétales (Dutta et al., 2009).

Après passage de la cuticule, un agent pathogène sera confronté à une seconde barrière physique qui entoure la cellule végétale, la paroi (Figure 1.1.1.1). En plus d'être une barrière défensive (Malinovsky et al., 2014), la paroi a principalement un rôle structural pour la plante (Hoson et Wakabayashi, 2015). Sa composition, principalement polysaccharidique, peut être différente selon les tissus (Knox, 2008) ou les conditions abiotiques et biotiques (Sasidharan et al., 2011). Les cellules végétales sont généralement entourées d'une paroi primaire flexible et certaines cellules spécialisées, telles que les cellules du xylème, d'une paroi secondaire plus rigide. La paroi primaire est constituée majoritairement de cellulose, d'hémicellulose et de pectine (Keegstra, 2010). La cellulose est organisée en microfibrille (β -1,4-glucane) et participe à l'organisation de la paroi en étant agencée parallèlement au plasmalemme (Somerville, 2006). Les pectines sont constituées d'homo- ou hétéro- polymères d'acide galacturonique plus ou moins ramifiés avec d'autres polysaccharides (Harholt et al., 2010). Principalement localisées au niveau de la lamelle moyenne, les pectines jouent le rôle de ciment cellulaire en se liant entre

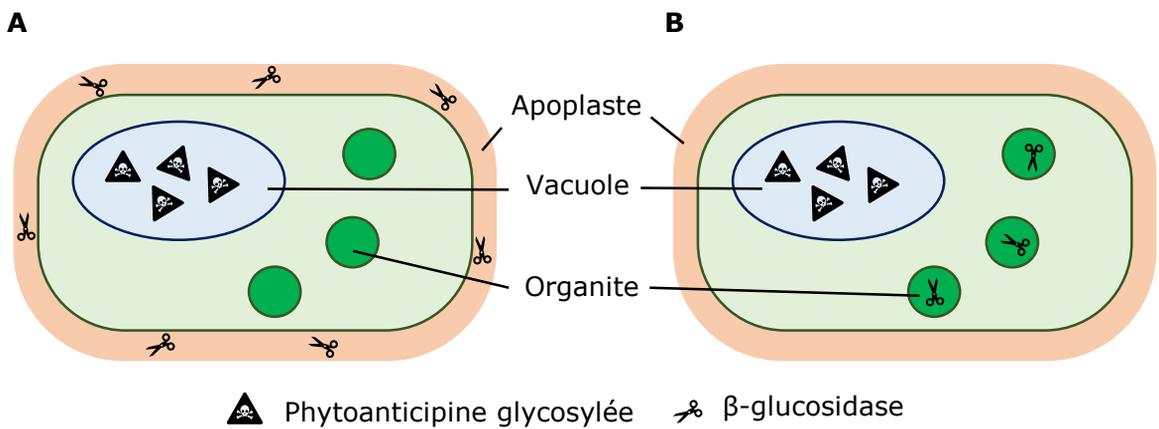


Figure 1.1.1.2 : Représentation simplifiée de la compartimentation des β -glucosidases et des phytoanticipines glycosylées chez les dicotylédones (A) et monocotylédones (B). D'après Morant et al., 2008.

elles au niveau de leur groupe carboxylique, par l'intermédiaire d'ions calcium (Cosgrove, 2005). Les hémicelluloses sont des β -1,4-glycanes (squelette de xyloses, glucoses et mannoses) avec une configuration équatoriale. Les hémicelluloses participent au renforcement des parois secondaires en jouant le rôle d'intermédiaire dans l'interaction entre la cellulose et d'autres composés phénoliques tels que la lignine (Scheller et Ulvskov, 2010). La lignification est essentielle pour l'adaptation des plantes à la vie terrestre, notamment en assurant une rigidité et résistance structurale. La lignine est issue de la polymérisation de monolignols, dérivés de la voie des phénylpropanoïdes et faisant intervenir des laccases et des peroxydases (Boerjan et al., 2003). Cependant, certains nématodes, champignons et bactéries phytopathogènes sont capables d'hydrolyser la paroi, notamment à l'aide de cellulases ou de pectinases libérées dans le milieu (Walton, 1994).

1.1.1.2 Composés antimicrobiens préformés

Les composés chimiques préformés peuvent aussi être impliqués dans les défenses contre les bioagresseurs. Ces métabolites secondaires, préformés ou formés par les dommages occasionnés par l'attaque à partir d'éléments préexistants, sont nommés phytoanticipines, en opposition avec les phytoalexines qui sont induites suite à l'agression. Les phytoanticipines les plus connues sont dérivées de 4 familles de métabolites : les benzoxazinoïdes, les glycosides cyanogènes, les glucosinolates et les saponines. Alors que les glycosides cyanogènes et les saponines sont produites par diverses espèces, les benzoxazinoïdes et les glucosinolates sont respectivement plus spécifiques aux Poaceae et aux Brassicaceae (Pedras et Yaya, 2015). Les saponines sont des hétérosides accumulés en grande quantité dans les plantes saines, et constituent des composés avec des propriétés insecticides et anti-microbiennes (Osborn, 1996 ; Qasim et al., 2020). Les benzoxazinoïdes, les composés cyanogènes et les glucosinolates, ont une forme aglycone nocive pour les insectes et les microorganismes, tels le cyanure d'hydrogène pour les composés cyanogènes ou les isothiocyanates pour les glucosinolates. Cependant, ces produits sont aussi phytotoxiques, ce qui oblige un stockage cellulaire sous forme glycosylée et inactive. La libération des aglycones est réalisée lorsque les formes glycosylées et les glucosidases, stockées dans des compartiments cellulaires ou tissulaires différents (Figure 1.1.1.2), entrent en contact après rupture des tissus causée par l'attaque du bioagresseur (Vetter et al., 2000 ; Halkier and Gershenzon, 2006 ; Niculaes et al., 2018). De manière plus marginale, d'autres composés peuvent être classifiés comme des phytoanticipines tels que des dérivés d'acides gras et des polycétides, des terpénoïdes, des shikimates et phénylpropanoïdes, et des alcaloïdes de type benzyloquinoléine et pyrrolizidine (Pedras et Yaya, 2015).

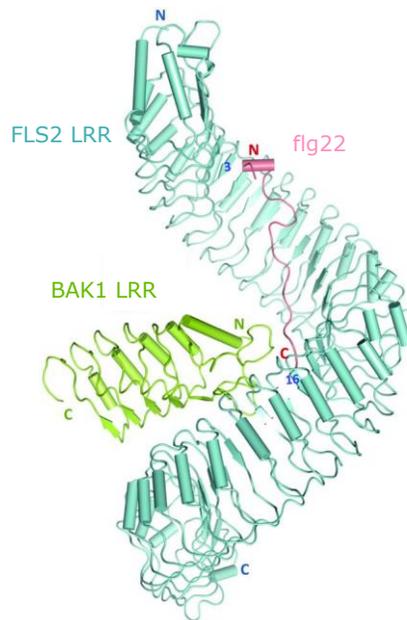
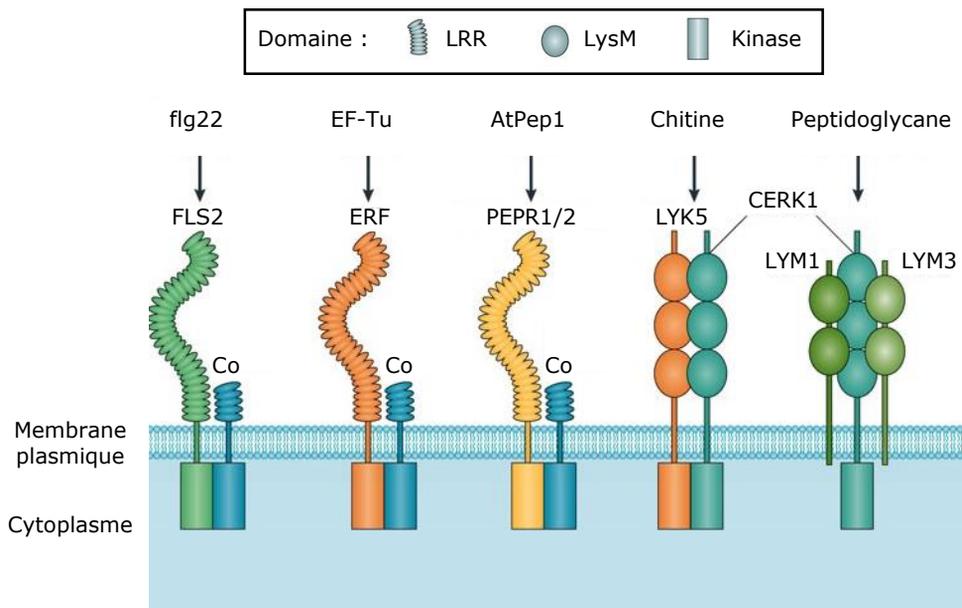
A**B**

Figure 1.1.2.1 : Structure des récepteurs de type PRR. (A) Structure résolue à 3.06 Å de FLS2 associée au co-récepteur BAK1. Les domaines C- et N-terminaux de chaque structure sont représentés. Le domaine LRR de FLS2 fixe les 22 acides aminés conservés de la flagelline (flg22). (B) Exemples de PRR et de leur PAMP respectif chez *A. thaliana*. Co : co-récepteur (BAK1/SERKs). Modifié d'après Sun et al., 2013 ; Couto et Zipfel, 2016.

1.1.2 Reconnaissance et mécanismes de défense actifs

Pour faire face aux bioagresseurs qui traversent les premières défenses constitutives, les plantes ont acquis la capacité de mobiliser activement leurs défenses. Le déclenchement de ces défenses nécessite la détection du bioagresseur, par la reconnaissance de leur PAMPs, des DAMPs ou d'un effecteur spécifique (Dodds et Rathjen, 2010).

1.1.2.1 Immunité basale déclenchée par la reconnaissance de PAMPs/DAMPs

Les bioagresseurs disposent de motifs structuraux communs entre eux mais absents chez les eukaryotes. Ces motifs sont la plupart du temps des constituants cellulaires, essentiels à leur survie, et peuvent constituer des PAMPs (Nürnbergger and Kemmerling, 2009). C'est le cas par exemple de la chitine (Wan et al., 2008) et de l'ergostérol (Klemptner et al., 2014) qui constituent respectivement la paroi et la membrane des champignons. D'autres PAMPs sont identifiés chez les bactéries comme le facteur d'élongation Tu (EF-Tu pour « Elongation factor thermal unstable Tu ») qui est la protéine bactérienne la plus abondante (Kunze et al., 2004), la flagelline qui constitue le flagelle nécessaire à leur mobilité (Chinchilla et al., 2007), ou les constituants de surface comme les peptidoglycanes (Gust et al., 2007) et les lipopolysaccharides (LPS ; Kutschera et Ranf, 2019). Des PAMPs présents chez d'autres bioagresseurs ont plus récemment été découverts comme les composants salivaires ou les fluides d'oviposition des insectes (Rashid et al., 2018), les phéromones des nématodes (Manosalva et al., 2015), ou encore des séquences nucléotidiques virales (Amari et Niehl, 2020). Ainsi, les plantes ont acquis la capacité de reconnaître une large gamme de bioagresseurs par le biais de ces PAMPs après pénétration (Nürnbergger and Kemmerling, 2009). Par ailleurs, cette pénétration au travers des barrières physiques peut également engendrer des dommages cellulaires et libérer des constituants endogènes (DAMPs), telle que la cellulose, pouvant être reconnus par la plante comme un signal des dommages occasionnés par l'attaque (Tanaka et Heil, 2021).

Les PAMPs/DAMPs constituent des motifs généraux qui peuvent être perçus par la plante via des récepteurs reconnaissant ces motifs (PRR pour « pattern recognition-receptor »). Les récepteurs PRR sont des récepteurs transmembranaires disposant d'un site de liaison extracellulaire aux PAMPs/DAMPs (Figure 1.1.2.1). Les domaines de liaison sont aussi diversifiés que les PAMPs/DAMPs qu'ils reconnaissent. Par exemple :

- Les domaines de liaison riches en leucine (LRR pour « leucine rich-repeat ») se lient préférentiellement aux protéines et aux peptides tels que la flagelline ou le EF-Tu.
- Les domaines de liaison avec un motif lysine (LysM) se lient préférentiellement aux carbohydrates tels que la chitine fongique ou le peptidoglycane.
- Les domaines de liaison de type lectine se lient aussi préférentiellement à des carbohydrates, notamment les LPS.

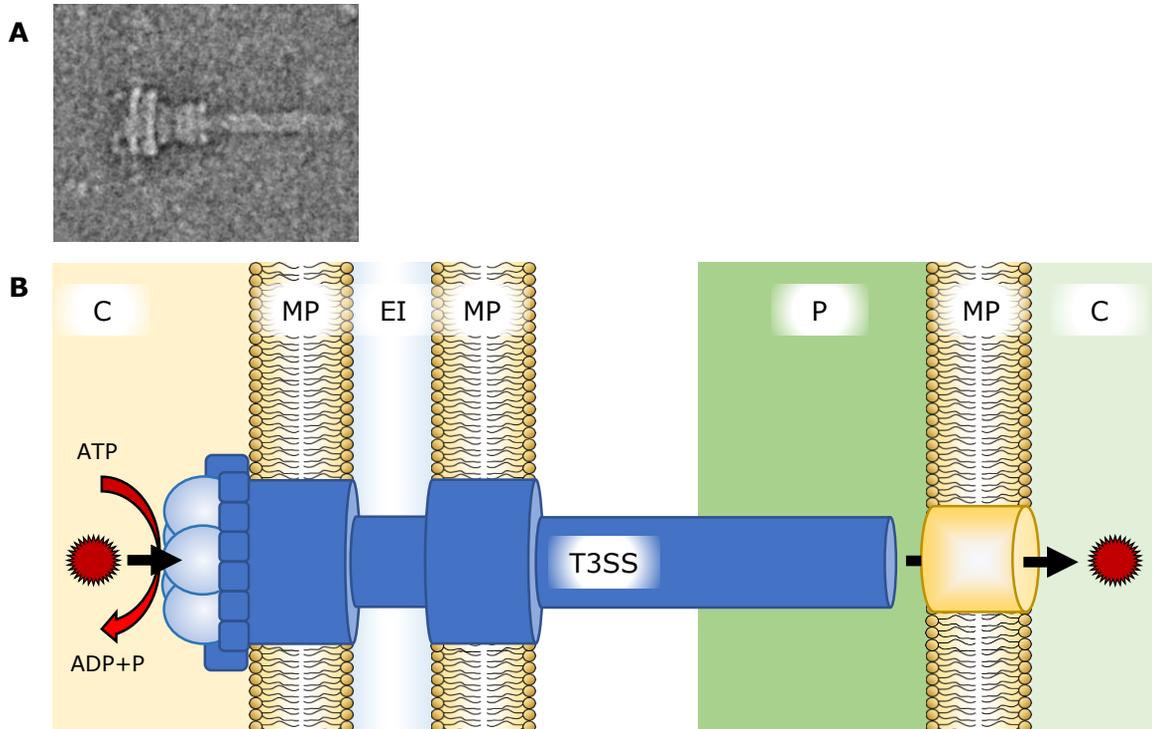


Figure 1.1.2.2 : Photo obtenue par microscopie électronique du T3SS de *Salmonella enterica* (A ; Puhar et Sansonetti, 2014) et représentation schématique de l'injection active d'effecteurs (oursin rouge) par le T3SS (B ; Ji et Dong, 2015). C : cytoplasme ; MP : membrane plasmique ; EI : espace intermembranaire ; P : paroi.

Il existe deux catégories de récepteurs PRR : les récepteurs de type protéique (RLP pour « receptor-like proteins ») qui possèdent seulement un domaine transmembranaire et extracellulaire, et les récepteurs kinases (RK pour « receptor kinases ») qui possèdent un troisième domaine intracellulaire de type kinase. Sachant que le domaine kinase est nécessaire à l'activation de la signalisation de défense, les RLP interagissent avec les RK en cas de reconnaissance d'un PAMPs/DAMPs (Zipfel, 2014).

1.1.2.2 Immunité basale réprimée par les effecteurs

Pour contrer cette immunité basale, certaines espèces de bioagresseurs ont développé des effecteurs capables de réprimer ces défenses (Göhre and Robatzek, 2008). Pour délivrer des effecteurs dans la cellule végétale, les bactéries Gram- ont développé des systèmes de sécrétion de type III (T3SS pour « type III secretion system ») qui correspondent à un flagelle modifié permettant d'injecter des effecteurs depuis le cytoplasme bactérien (Puhar et Sansonetti, 2014). Ces effecteurs, délivrés par le T3SS à travers la matrice pariétale, traversent la membrane plasmique de l'hôte à l'aide de pores formés par des protéines translocatrices (Figure 1.1.2.2 ; Ji et Dong, 2015). D'autres systèmes de sécrétion chez certaines bactéries permettent l'injection d'effecteurs, comme par exemple le type IV d'*Agrobacterium tumefaciens* (Lee et al., 2009) ou le type II de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Szczeny et al., 2010). Les champignons et oomycètes utilisent des organes spécialisés dans l'acquisition des nutriments, les haustoria, qui pénètrent la paroi et invaginent la membrane cellulaire de l'hôte, pour y délivrer les effecteurs (Dodds et al., 2009). Les effecteurs peuvent également être injectés dans les cellules végétales par le stylet des nématodes (Mitchum et al., 2013) ou des insectes piqueurs-suceurs. Pour les insectes phytophages, les effecteurs salivaires sont délivrés par les blessures causées lors de la prise alimentaire (Hogenhout et Bos, 2011). Les cellules végétales infectées par des virus peuvent produire des protéines codées par le matériel génétique viral qui peuvent représenter des effecteurs (Leisner et Schoelz, 2018). Cependant, certains effecteurs sont sécrétés directement dans les espaces intercellulaires pour agir dans l'apoplasme, ne nécessitant pas de structure spécialisée pour le bioagresseur (Göhre et Robatzek, 2008), c'est notamment le cas pour certains champignons et oomycètes (Rocafort et al., 2020). Qu'ils soient sécrétés dans l'apoplasme ou le cytoplasme de l'hôte, les effecteurs peuvent interférer avec les défenses basales à de multiples niveaux, notamment en réprimant ou en manipulant la signalisation des défenses activée par les PRR. Un même effecteur peut avoir différentes cibles dans différents hôtes, affectant ainsi simultanément différentes voies de défenses (Göhre et Robatzek, 2008). Les effecteurs réprimant les défenses peuvent aussi moduler les fonctions physiologiques de la plante en faveur de l'infection. C'est le cas des effecteurs de type activateur de transcription (TALE pour « Transcription activator-like effectors ») du genre *Xanthomonas* qui se lient à l'ADN et activent des gènes de sensibilité, notamment liés au transport de sucre (Xu et al., 2017).

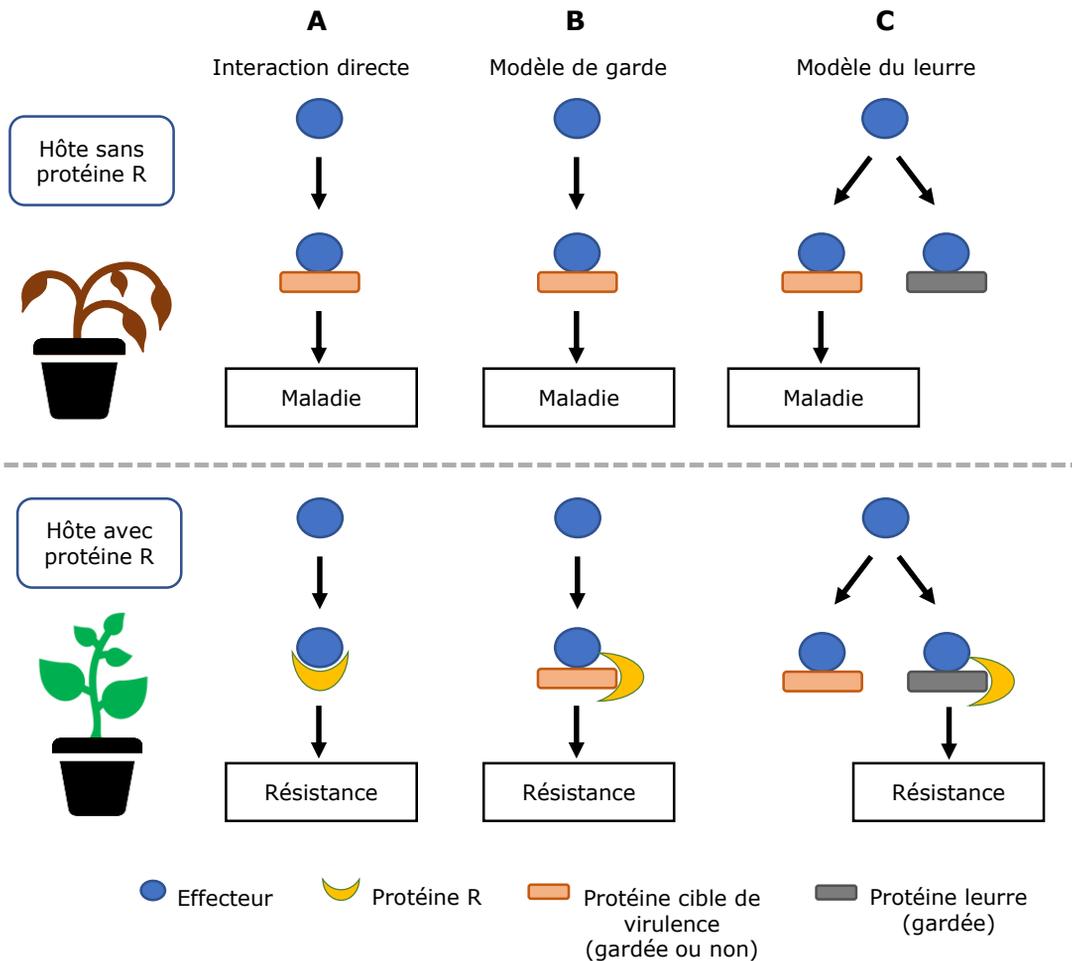


Figure 1.1.2.3 : Modèle d'interaction R/avr : interaction directe (A), modèle de garde (B) et modèle du leurre (C). (A) L'interaction directe de l'effecteur avec la protéine cible ou la protéine R déclenche respectivement la maladie ou la résistance. (B) La modification de la protéine ciblée, dite de garde, par l'effecteur est perçue par la protéine R des hôtes résistants. (C) La modification d'une protéine leurre, en plus de la protéine cible, par l'effecteur est reconnue par la protéine R des hôtes résistants (Gaucher, 2012).

1.1.2.3 Immunité spécifique déclenchée par la relation R/avr

Les effecteurs injectés dans l'hôte sont perçus spécifiquement par des récepteurs avec des répétitions riches en leucine se liant aux nucléotides (NLR pour « nucleotide-binding-leucine-rich repeat ») et qui peuvent jouer un rôle complémentaire de celui des récepteurs PRR. La majorité des NLR sont structurés de façon stéréotypée, avec un domaine C-terminale à répétitions riches en leucine (LRR pour « leucine rich repeat »), un domaine central liant les nucléotides (NBS pour « nucleotide-binding site ») et un domaine N-terminale variable. Ce dernier peut être un domaine récepteur Toll-interleukin-1 (TIR) ou un domaine superhélice (CC pour « coiled-coil ») formant avec les deux autres domaines des récepteurs TIR-NBS-LRR (ou TNL) et CC-NBS-LRR (ou CNL) respectivement. Concernant le domaine CC, un sous-ensemble est décrit sur la base d'une similarité avec le gène de résistance à l'oïdium 8 (RPW8 pour « resistance to powdery mildew 8 ») noté CCr (pour les récepteurs CCr-NBS-LRR ou RNL) (Monteiro et Nishimura, 2018). Les RNL peuvent constituer des auxiliaires de NLR et contribuer à la signalisation de défense, en aval de la reconnaissance de l'effecteur. A l'heure actuelle, deux familles de RNL sont identifiées : les NRG1 (pour « N requirement gene 1 ») et les ADR1 (pour « activated disease resistance 1 » ; Jubic et al., 2019). Les NLR peuvent se trouver dans différents compartiments cellulaires tels que le cytoplasme, le noyau ou les systèmes endomembranaires (membrane plasmique, vacuole, appareil de Golgi ; Qi et Innes, 2013). La reconnaissance spécifique par la partie C-terminale LRR des NLR entraîne de multiples réponses de résistance, notamment une réponse caractéristique d'hypersensibilité (HR pour « hypersensitivity response ») se traduisant par une mort cellulaire programmée (Monteiro et Nishimura, 2018 ; Coll et al., 2011).

L'interaction spécifique entre les NLR et les effecteurs traduit le concept de la relation « gène pour gène » (Flor, 1971 ; Dodds et Rathjen, 2010), c'est-à-dire la reconnaissance du produit d'un gène d'avirulence (*avr* ; effecteur) avec le produit d'un gène de résistance (*R* ; NLR). La relation R/avr peut s'établir de 3 manières différentes (Figure 1.1.2.3) :

- Une interaction physique directe entre effecteurs *avr* et récepteurs NLR. Ce type de perception est facilement contournable puisqu'une mutation non synonyme de l'effecteur *avr* peut empêcher la liaison spécifique avec le récepteur NLR et entraîner une interaction compatible (Van Der Biezen et Jones, 1998).
- Deux interactions indirectes, décrites chacune par un modèle :
 - Le modèle de garde : les NLR perçoivent les changements de certaines protéines dites « de garde », provoqués par l'action des effecteurs *avr*. Sans le gène *R*, cette modification de la protéine de garde est nécessaire à la virulence du bioagresseur dans une relation compatible. Ce modèle démontre comment un nombre limité de gènes *R* permet à la plante de percevoir une diversité de produits de gènes *avr*, pour peu que ces derniers agissent sur les mêmes protéines-cibles végétales (Dangl et Jones, 2001).

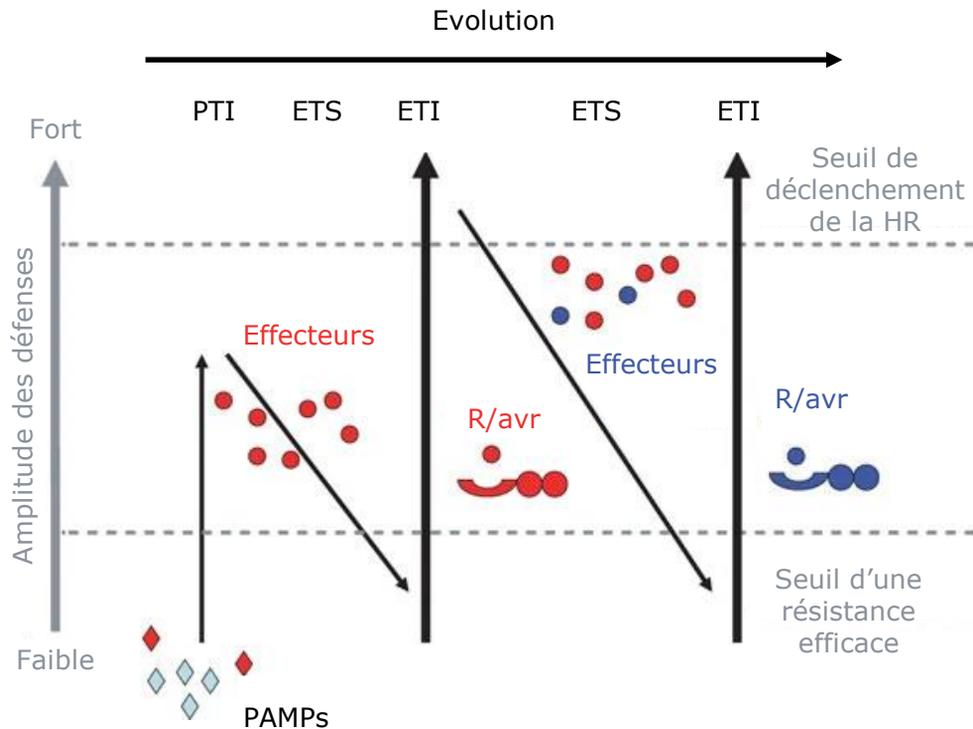


Figure 1.1.2.4 : Modèle de co-évolution entre un hôte végétal et un agent pathogène décrit par Jones et Dangl (2006). La plante va se défendre contre un large spectre de bioagresseurs en déclenchant la PTI par la détection de PAMPs. Dans une logique co-évolutive, l'agent pathogène va contourner cette résistance à l'aide d'effecteurs et rétablir une situation de sensibilité. La plante peut acquérir la possibilité de reconnaître, à l'aide des produits des gènes *R*, les effecteurs comme étant des protéines d'avorulence (*avr*) et déclencher une résistance ETI plus spécifique et intense que la PTI. L'ETI peut dans certains cas être contournée par l'acquisition de nouveaux effecteurs (modifié d'après Jones et Dangl, 2006).

- Le modèle du leurre : certaines protéines modifiées par l'effecteur avr ne contribuent pas à la virulence du bioagresseur en l'absence du gène R correspondant. La modification de ces protéines dites « leurres » est reconnue par le NRL. Ce modèle suppose une production de protéines leurres proches des protéines ciblées par les effecteurs avr pour les percevoir spécifiquement (van der Hoorn et Kamoun, 2008).

1.1.2.4 Modèle de co-évolution en zig-zag

Le modèle en zig-zag décrit la course à l'armement entre la plante et un agent pathogène dans un contexte évolutif (Jones et Dangl, 2006 ; Figure 1.1.2.4). Les plantes ont développé un système immunitaire basal qui permet de reconnaître les PAMPs à l'aide de récepteur PRR pour déclencher une réponse de défenses globales contre un large spectre d'agents pathogènes. Cette réponse, qualifiée d'immunité déclenchée par les PAMPs (PTI pour « PAMPs-triggered immunity »), peut suffire à protéger contre certains agents pathogènes mais d'autres disposent d'effecteurs qui permettent de la contourner. Dans cette dernière situation, il apparaît alors une sensibilité à la maladie déclenchée par les effecteurs (ETS pour « effector-triggered susceptibility »). Les plantes peuvent acquérir au cours de l'évolution des récepteurs NLR capables de reconnaître spécifiquement certains de ces effecteurs pour contrecarrer l'ETS. Cette réponse, appelée immunité déclenchée par les effecteurs (ETI pour « effector-triggered immunity ») permet une résistance spécifique de plus haute intensité que la PTI. Ainsi, la pression de sélection conduit soit à l'élimination ou à la modification de l'effecteur avr reconnu, soit à l'acquisition de nouveaux effecteurs supprimant l'ETI, ce qui conduit de nouveau à une ETS. Ainsi, au cours de l'évolution, la sélection naturelle dotera les plantes de nouveaux récepteurs NLR capables de reconnaître de nouveaux effecteurs et de déclencher l'ETI alors que les agents pathogènes se verront continuellement contraints d'acquérir de nouveaux effecteurs capables de la supprimer.

1.1.3 Voies de signalisation impliquées dans les défenses

La reconnaissance de l'agent pathogène à partir des récepteurs PRR et NLR entraîne l'élicitation des défenses. Cette induction est permise par une transduction du signal depuis le récepteur. La réponse peut s'effectuer d'une part de manière intracellulaire pour faire face localement à l'attaque et d'autre part, se prolonger par des voies de signalisation intercellulaires afin d'engager les défenses de manière systémique (Sun et Zhang, 2020).

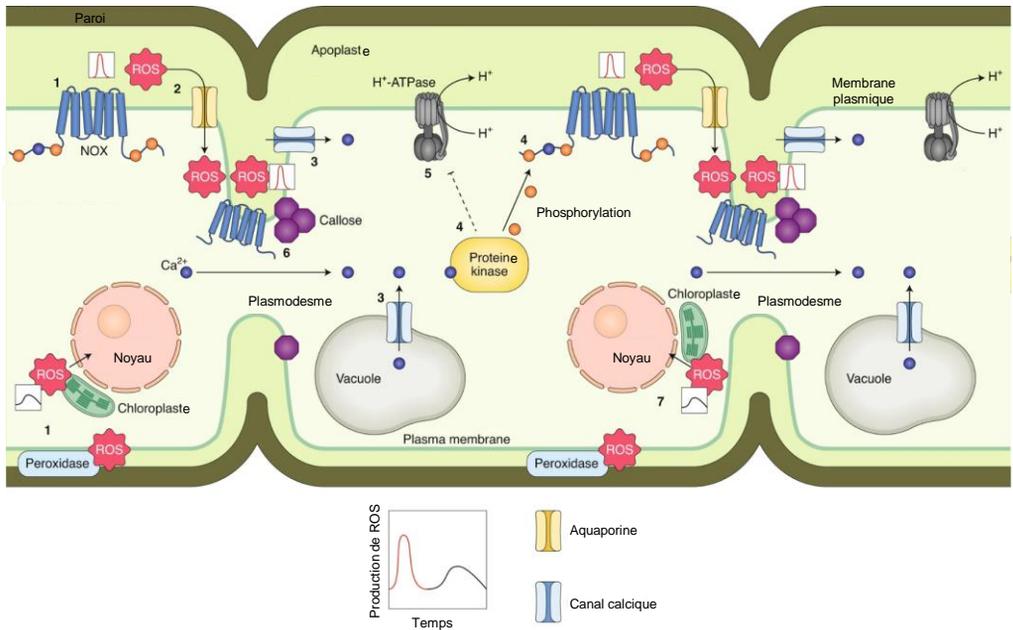
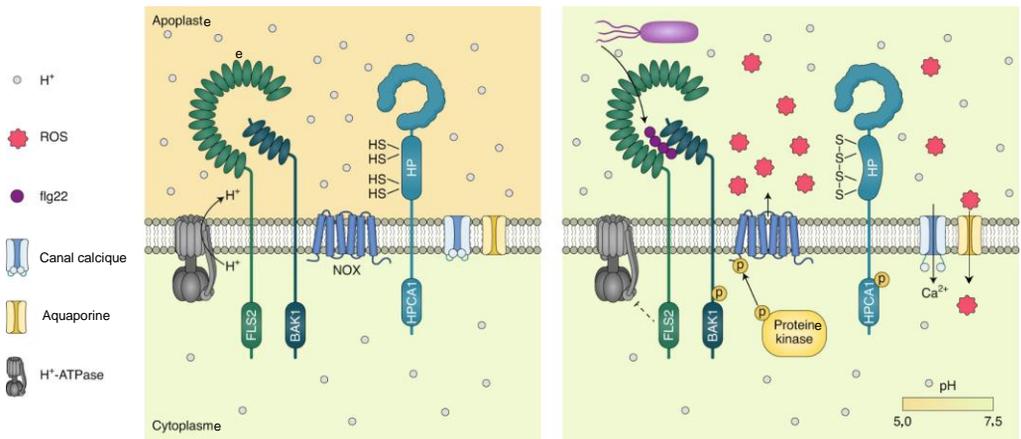
A**B**

Figure 1.1.3.1.1 : Production de ROS et induction de la RBOH par la perception des PAMPs.

(A) Les stress induisent une production apoplastique initiale rapide de ROS par les RBOH et les peroxydases (1), qui peuvent ensuite pénétrer dans le cytosol via des aquaporines (2). Les ROS activent un influx de Ca²⁺ depuis l'apoplaste ou la vacuole (3) qui amplifie directement l'activité des RBOH ou par l'intermédiaire de protéines kinases (4). L'accumulation de ROS apoplastiques coïncide avec l'inhibition de H⁺-ATPases qui provoque une alcalinisation extracellulaire (5). Les ROS RBOH-dépendants induisent des dépôts de callose (6). Après une signalisation systémique rapide initiale, une seconde vague de production de ROS d'origine chloroplastique peut affecter l'expression du génome (7). (B) Complexe FLS2-BAK1 et récepteur de ROS HPCA1 chez *A. thaliana* en absence (à gauche) ou présence (à droite) d'un agent pathogène bactérien. La perception de flg22 inhibe les H⁺-ATPases et active le complexe FLS2-BAK1 qui va à son tour activer par phosphorylation le complexe RBOH. L'augmentation du pH extracellulaire modifie les cystéines du domaine HP de HPCA1 qui active l'entrée d'ion Ca²⁺ et la signalétique des ROS par son activité kinase (Castro et al., 2021).

1.1.3.1 Signalisation intracellulaire

La transduction du signal au niveau cellulaire mobilise majoritairement des flux calciques, des voies de phosphorylation et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species »). Les mécanismes sont déclenchés à la fois dans la PTI et l'ETI mais de manière plus intense et rapide pour cette dernière (Yuan et al., 2021b).

1.1.3.1.1 Accumulation de ROS

L'une des premières réponses à l'attaque d'un agent pathogène, notamment suite à une reconnaissance par les PRR/NLR, est une importante modification des conditions redox de la cellule liée à l'accumulation de ROS (Figure 1.1.3.1.1 ; Torres et al., 2006). La PTI est caractérisée par une accumulation rapide et transitoire de ROS alors que l'ETI induit plutôt une accumulation biphasique avec second pic plus intense et soutenu que le premier (Yuan et al., 2021b). Dans les deux cas, les ROS incluent majoritairement du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), son précurseur l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$; Apel and Hirt, 2004). Durant l'interaction plante-pathogène, les ROS sont produits essentiellement dans l'apoplaste par diverses enzymes, telles que les peroxydases de la paroi cellulaire (PRX), ainsi que les homologues de l'oxydase respiratoire (RBOH pour « respiratory burst oxidase homolog ») transmembranaires. La majeure partie des ROS sont générés par les RBOH, en transférant les électrons du NADPH ou du FADPH cytosolique à l'oxygène apoplastique, formant ainsi des $O_2^{\bullet-}$. L' $O_2^{\bullet-}$ est ensuite converti spontanément ou par l'action catalytique de la superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 (Qi et al., 2017). La reconnaissance de PAMPs par les PRR induit l'activation par phosphorylation de la RBOH (Lee et al., 2020). De plus, une première étude montre que l'ETI nécessite la phosphorylation de RBOH par la perception des PAMPs pour être pleinement efficace (Yuan et al., 2021a). Une seconde étude indique que la reconnaissance d'effecteurs par certains récepteurs NLR est susceptible de conduire à l'activation de RBOH par la phosphorylation des mêmes résidus que ceux phosphorylés en réponse à la PTI (Kadota et al., 2018). Ces deux études suggèrent que la deuxième phase d'accumulation de ROS déclenchée par l'ETI emprunte les mêmes voies de signalisation que la PTI (Yuan et al., 2021b). Les RBOH sont aussi activés par phosphorylation de kinases régulées par la signalisation calcique, qui seront décrites dans la section suivante (Kadota et al., 2015 ; Qi et al., 2017). Une partie de l' H_2O_2 généré peut être catalysée par les cations ferreux (Fe^{2+}) pour créer des $\bullet OH$ par la réaction de Fenton. Les $\bullet OH$ peuvent provoquer la peroxydation des lipides membranaires et conduire à la mort cellulaire (Herlihy et al., 2020). Ce phénomène fer-dépendant, appelé ferroptose (Distéfano et al., 2020), est suggéré pour certains pathosystèmes comme une réponse caractéristique de mort cellulaire induite par l'ETI (Herlihy et al., 2020). Les PRX de type III de la paroi cellulaire contribuent aussi à l'accumulation de ROS, notamment dans la génération de H_2O_2 et de $O_2^{\bullet-}$ durant la PTI. D'ailleurs, la production de ROS par les PRX peut contribuer à l'activation de RBOH. Les ROS

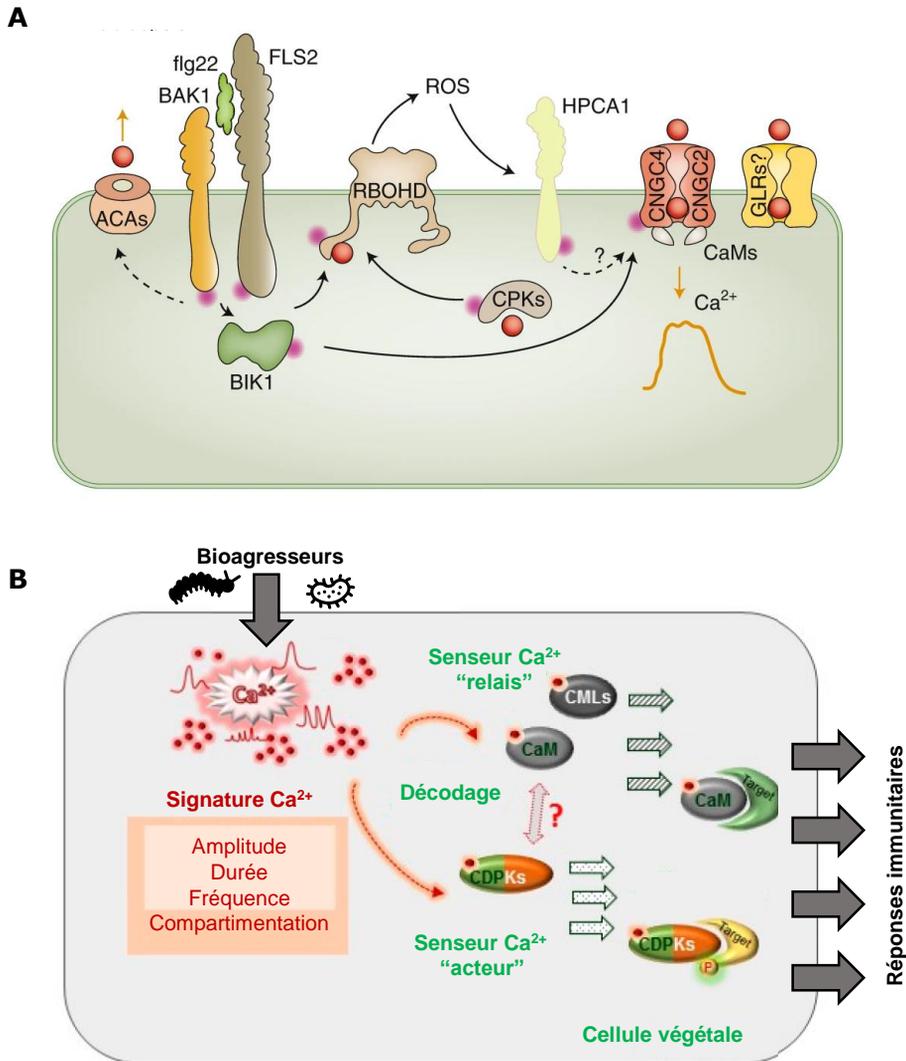


Figure 1.1.3.1.2 : Influx calcique suite à la reconnaissance de PAMPs (A) et étapes clés du déclenchement des défenses calcium dépendantes (B). (A) La liaison de flg22 au complexe récepteur FLS2-BAK1 entraîne la phosphorylation de BIK1 qui à son tour phosphoryle directement la sous-unité CNGC4 du complexe de canaux CNGC2-CNGC4, conduisant à un influx de Ca²⁺. Les protéines BIK1 et CPK phosphorylent RBOHD lié au Ca²⁺ pour stimuler la production de ROS. Ces derniers sont perçus par HPCA1, ce qui entraîne une activation supplémentaire du complexe CNGC2-CNGC4, déclenchant une élévation soutenue du Ca²⁺ cytosolique. D'autres canaux Ca²⁺ tels que les GLR (pour "glutamate receptor-like"), pourraient se coordonner avec les CNGC pour induire l'immunité Ca²⁺-dépendante en formant une signature calcique spécifique. (B) Les signatures calciques induites sont spécifiques au type de bioagresseur détecté, et diffèrent entre elles par leurs caractéristiques spatio-temporelles. Le décodage est ensuite réalisé par une multitude de capteurs du Ca²⁺ tels que les CaM, les protéines de type CaM (CML) ou les CDPK qui activent les protéines cibles soit par liaison directe, soit par phosphorylation (P ; Aldon et al., 2018 ; Tian et al., 2020).

produits par les RBOH sont plutôt impliqués dans la mort cellulaire alors que ceux produits par le PRX semblent davantage impliqués dans la modification de la paroi (Camejo et al., 2016). La production de ROS peut avoir un effet antimicrobien sur le pathogène mais participe aussi à la signalisation défensive (Kadota et al., 2015 ; Torres et al., 2006). En effet, la diffusion de l' H_2O_2 apoplastique à travers la membrane peut moduler le transcriptome, notamment par l'activation de kinases ou de facteurs de transcription sensibles au potentiel rédox (Kovtun et al., 2000 ; Frederickson Matika and Loake, 2014 ; Torres et al., 2010). La production de ROS contribue enfin à la formation d'acide salicylique (SA) et d'oxyde d'azote (NO) qui sont aussi impliqués dans l'activation des défenses (Klessig et al., 2000).

1.1.3.1.2 Signalisation calcique

L'import d'ions calciums (Ca^{2+}) dans le cytoplasme constitue l'une des réponses précoces vis-à-vis des stress biotiques et permet l'activation d'une multitude de mécanismes de défense (Lecourieux et al., 2006). L'import dans le cytoplasme du Ca^{2+} est régulé par des transports passifs (canaux) et actifs (antiports, ATPases, etc.) depuis des compartiments riches en Ca^{2+} , comme le milieu apoplastique et/ou des organites cellulaires (Figure 1.1.3.1.2 ; Sanders et al., 2002). Les entrées calciques apoplastiques sont permises par une activation des transporteurs intégrés à la membrane plasmique et déclenchés par la perception d'éliciteurs (Lecourieux et al., 2006 ; Seybold et al., 2014 ; Tian et al., 2020). Celles-ci sont associées à un influx de proton H^+ qui conduit à une acidification du cytoplasme (Westphal et al., 2019). Des résultats récents mettent en évidence l'importance des canaux ioniques dépendant des nucléotides cycliques (CNGC pour « cyclic nucleotide-gated ion channels ») dans la PTI. La reconnaissance de PAMPs par les récepteurs PRR active l'influx calcique par la phosphorylation de CNGC (Tian et al., 2020). L'activation des récepteurs PRR crée aussi une dépolarisation membranaire, régulée en partie par des efflux anioniques, qui permet d'activer des transporteurs calciques voltage-dépendants (Lecourieux et al., 2006). Les PRR activent aussi indirectement les transporteurs calciques par l'intermédiaire des ROS ou de nucléotides cycliques. L'accumulation de ROS et de Ca^{2+} cytosolique constitue une boucle rétroactive positive qui amplifie l'influx calcique (Yuan et al., 2017). L'accumulation du Ca^{2+} cytosolique est aussi observée dans le cas d'une perception par des NLR, mais les transporteurs calciques ciblés restent encore méconnus (Peng et al., 2018). Certains récepteurs NLR, après reconnaissance d'effecteurs, deviennent des pores membranaires laissant passer le Ca^{2+} apoplastique (Bi et al., 2021 ; Chen et al., 2021). Bien que les flux calciques depuis l'apoplaste soient les principales sources d'entrées de calcium, cela n'exclut pas l'entrée de calcium depuis les réservoirs internes que constituent les organites, tels que la vacuole ou le réticulum endoplasmique. Les transporteurs membranaires de ces organites peuvent être activés notamment par l'inositol triphosphate (IP3) ou l'ADP ribose cyclique (Garcia-Brugger et al., 2006 ; Lecourieux et al., 2006 ; Seybold et al., 2014).

Les accumulations de Ca^{2+} sont transitoires et peuvent avoir plusieurs profils, tels que des élévations spatialement dispersées ou regroupées (pics) pouvant former des oscillations (pics répétés) ou des vagues (pics se déplaçant vers les cellules voisines ; Ng et McAinsh, 2003). Ces profils peuvent être interprétés comme une signature type d'un éliciteur ou d'une agression et nécessitent l'action coordonnée des transporteurs de Ca^{2+} (Lecourieux et al., 2006 ; Tian et al., 2020). L'herbivorie ou les blessures mécaniques induisent des vagues calciques, alors que les interactions avec des micro-organismes symbiotiques ou pathogènes engendrent plutôt des pics et des oscillations respectivement (Tian et al., 2020). Les signaux calciques peuvent être décodés par des senseurs possédant un ou plusieurs motifs hélice-boucle-hélice appelés domaine EF-hand un se liant au calcium (Lewit-Bentley and Réty, 2000 ; Lecourieux et al., 2006). Parmi ces senseurs, on trouve les calmodulines (CaM) qui possèdent quatre domaines EF-hand capables de s'associer au Ca^{2+} provoquant un changement de conformation de la protéine (Chin and Means, 2000 ; Lecourieux et al., 2006), ce qui va leur permettre d'activer des kinases ou des facteurs de transcription associés aux défenses (Bouché et al., 2005 ; Kim et al., 2020). Le Ca^{2+} cytosolique va aussi engendrer des cascades de phosphorylation dépendantes de protéines kinases disposant d'un domaine EF-hand, présentées ci-après (Garcia-Brugger et al., 2006 ; Lecourieux et al., 2006). D'autres protéines ne possédant pas de domaine EF-hand sont aussi sensibles au calcium, comme celles possédant un domaine C2 qui est un site de liaison au Ca^{2+} et aux phospholipides. La phospholipase D est une enzyme disposant d'un domaine C2 activé en réponse d'une élévation du Ca^{2+} cytosolique associée au défenses (Lecourieux et al., 2006). La phospholipase D rompt les liaisons phosphodiester des phospholipides pour produire par exemple de l'IP3 et du diacylglycerol (DAG ; Wang, 1999 ; Seybold et al., 2014) qui activent respectivement les transporteurs calciques IP3-dépendant (Sanderson, 2007) ou des kinases (Spitaler et Cantrell, 2004 ; Canonne et al., 2011).

1.1.3.1.3 Kinases et facteurs de transcription

La transduction du signal peut se réaliser par phosphorylation en cascade de protéines kinases jusqu'à l'activation transcriptionnelle de gènes (Graves et Krebs, 1999). Les plus conservées chez les eukaryotes sont les protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK pour « mitogen-activated protein kinase »). Après activation des PRR/NLR, la phosphorylation des MAPKKK, entraîne celle des MAPKK et finalement celle des MAPK (Meng et Zhang, 2013). Les ROS et le NO activent aussi des cascades de phosphorylation modulées par les MAPKKK (Kovtun et al., 2000 ; Torres, 2010 ; Frederickson Matika et Loake, 2014). La MAPK en bout de chaîne active des réponses de défense, notamment par la phosphorylation de facteurs de transcription ou d'enzymes. A noter que pour inhiber la signalisation défensive, certains agents pathogènes disposent d'effecteurs avec une activité phosphatase capable de déphosphoryler ces kinases (Meng et Zhang, 2013). Le calcium peut aussi déclencher des cascades de phosphorylation, notamment en se liant aux domaines EF-hand de certaines

kinases, CaM kinases dépendantes du calcium (CCaMK pour « Ca²⁺-CaM dependent kinase ») et les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPK pour « calcium-dependent protein kinases » ; Lecourieux et al., 2006). Les CDPK et les CCaMK disposent d'un domaine kinase respectivement associé à 4 ou 3 domaines EF-hand (Ranty et al., 2006 ; Klimecka et al., 2007). D'autres kinases ne possédant pas de domaine EF-hand interagissent avec des protéines en possédant telles que la calcineurine de type B (CBL pour « calcineurin B-like protein ») qui est exclusif aux plantes. Les CBL jouent le rôle de senseurs calciques et s'associent avec des protéines kinases (CIPK pour « CBL-interacting protein kinases ») pour activer des réponses de défense (Luan, 2009 ; Seybold et al., 2014).

Les facteurs de transcription jouent un rôle central dans le contrôle de la transcription. Ils permettent d'induire ou de réprimer l'expression de certains gènes, en se fixant sur leur région promotrice (Meshi et Iwabuchi, 1995). Parmi les facteurs de transcriptions impliqués dans les défenses, 6 familles classées selon leur site de liaison à l'ADN sont prépondérantes (Singh, 2002 ; Alves et al., 2014) :

- Les protéines à fermeture leucine basique (bZIP pour « basic leucine zipper containing domain proteins » ; Dröge-Laser et al., 2018).
- Les protéines avec une séquence d'acides aminés WRKYGQK (WRKY ; Rushton et al., 2010).
- Les protéines liées à la myélocytomatose (MYC ; Alves et al., 2014).
- Les protéines liées à la myéloblastose (MYB ; Ambawat et al., 2013).
- Les facteurs de liaison à des éléments sensibles à l'éthylène (EREBP pour « ethylene responsive element binding factors ») / *apetala 2* (AP2).
- Un regroupement de 3 familles appelées facteurs de transcription NAC (NAM, ATAF, CUC ; Alves et al., 2014) : des protéines liées à l'absence de méristème apical (NAM pour « no apical meristem »), des facteurs ATAF (pour « Arabidopsis transcription activation factor ») ou liés aux cotylédons en forme de tasse (CUC pour « cup-shaped cotyledon »).

En plus de réguler les réponses de la PTI/ETI, la plupart de ces facteurs de transcription sont aussi impliqués dans la tolérance au stress abiotique et dans des processus du métabolisme primaire traduisant leur rôle large et leur redondance dans différentes voies liées à des stimuli environnementaux ou endogènes (Singh, 2002 ; Alves et al., 2014).

1.1.3.2 Signalisation intercellulaire

Après reconnaissance de l'agent pathogène au niveau local, le déploiement des défenses peut s'effectuer au-delà du site d'infection. La transmission du signal intercellulaire peut être réalisée par la propagation de phytohormones, petites molécules pouvant avoir un rôle endogène ou de réponse aux stress abiotiques et biotiques. Trois phytohormones sont largement impliquées dans les défenses, l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET) et l'acide jasmonique (JA)

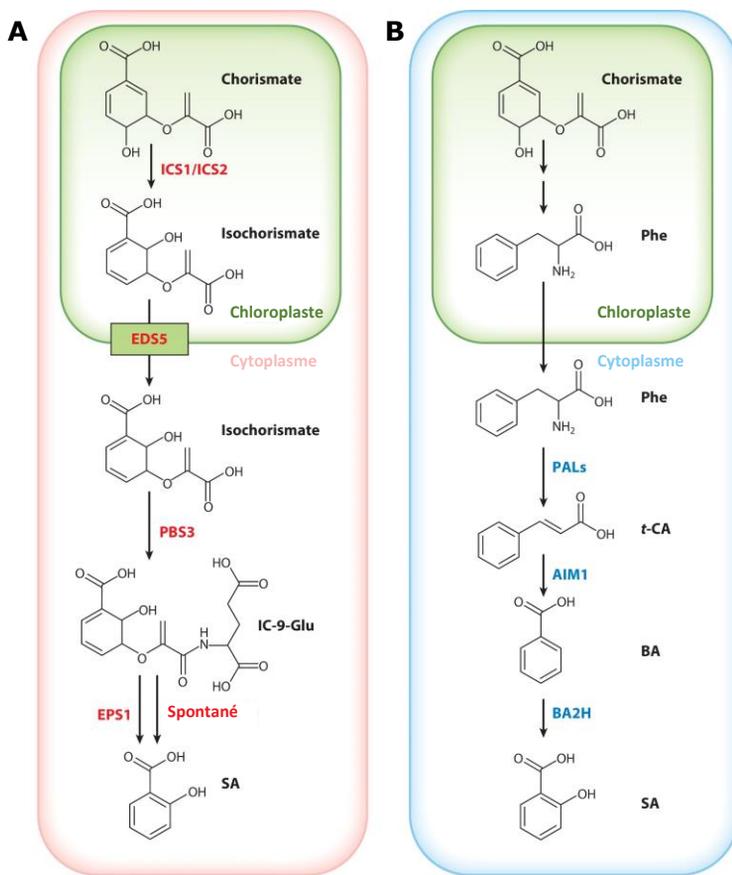


Figure 1.1.3.2.1 : Voies de biosynthèse du SA : voie de l'isochorismate (A) et de l'acide benzoïque (B). ICS : isochorismate synthase; EDS : enhanced disease susceptibility; PBS: AvrPhpB susceptible; IC-9-Glu : isochorismate-9-glutamate; Phe : phenylalanine; PAL : phenylalanine ammonia lyase; t-CA: *trans*-cinnamic acid; AIM : abnormal inflorescence meristem; BA: benzoic acid; BA2H : BA-2-hydroxylase (Peng et al., 2021).

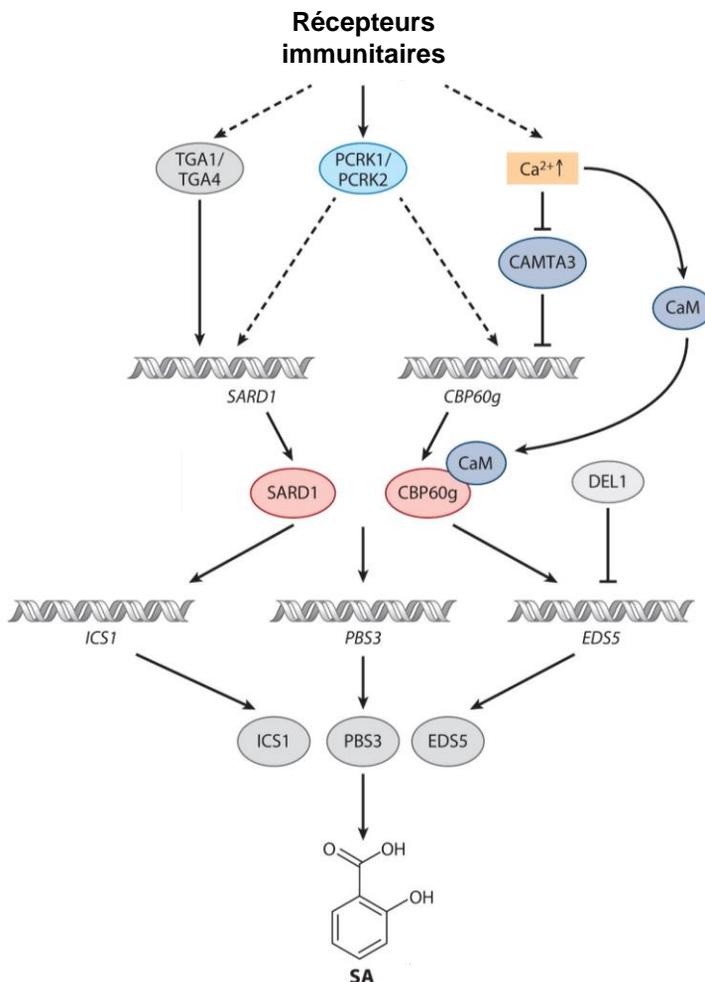


Figure 1.1.3.2.2 : Mécanismes de régulation de la biosynthèse du SA par la voie de l'IC. Après contact avec les bioagresseurs, les récepteurs immunitaires conduisent à des niveaux élevés de Ca²⁺ cytosolique, qui favorisent la production de SA en induisant l'expression de SARD1 et CBP60g en libérant la répression transcriptionnelle de CAMTA3 et par l'activation de CBP60g par des CaM. En parallèle, l'activation des facteurs de transcription TGA1 et TGA4 et des kinases cytoplasmiques de type récepteur (PCRK1/2) contribue à la biosynthèse du SA en induisant l'expression de SARD1 et CBP60g. Les gènes de biosynthèse du SA (*ICS1*, *EDS5* et *PBS3*) sont régulés de manière coordonnée par les facteurs de transcription SARD1 et CBP60g (Peng et al., 2021).

; Checker et al., 2018). Dans cette partie, nous nous focaliserons davantage sur la signalisation SA ainsi que sur la résistance systémique acquise (SAR).

1.1.3.2.1 Biosynthèse du SA

Le SA est l'une des premières phytohormones synthétisées lors de la PTI/ETI. La synthèse du SA peut s'effectuer à partir de deux précurseurs dérivés de la voie du shikimate, l'isochorismate (IC) et l'acide benzoïque (BA), impliquant ainsi deux voies de biosynthèse différentes dont l'importance varie selon les espèces (Figure 1.1.3.2.1 ; Lefevre et al., 2020 ; Peng et al., 2021) :

- La voie de l'IC : Le chorismate dérivé du shikimate est transformé par l'isochorismate synthase (ICS) en IC dans le chloroplaste (Wildermuth et al., 2001). Ce dernier migre dans le cytosol via un transporteur (EDS5 pour « enhanced disease susceptibility 5 » ; Serrano et al., 2013). L'IC est ensuite conjugué au glutamate par une aminotransférase (PBS3 pour « AvrPphB susceptible 3 ») pour former IC-9-glutamate, qui se décompose spontanément en SA (Rekhter et al., 2019).
- La voie du BA : La phénylalanine, dérivée du chorismate, passe dans le cytoplasme et est transformée en acide trans-cinnamique (t-CA) par la phénylalanine ammonia lyase (PAL). Le t-Ca est transformé en acide benzoïque puis en SA (Yalpani et al., 1993) par une enzyme catalysant la β -oxydation de t-CA (AIM1 pour « Abnormal Inflorescence Meristem » ; Bussell et al., 2013) et une BA 2-hydrolase (BA2H ; Léon et al., 1995), respectivement.

Lors d'une infection, la synthèse du SA s'effectue principalement par la voie de l'IC chez *A. thaliana* (Wildermuth et al., 2001) alors que c'est la voie du BA qui est privilégiée chez le tabac (*Nicotiana tabacum* ; Ogawa et al., 2006). Chez d'autres espèces comme le soja (*Glycine max*), les deux voies coopèrent pour faire face à une infection (Shine et al., 2016).

1.1.3.2.2 Régulation de la biosynthèse du SA

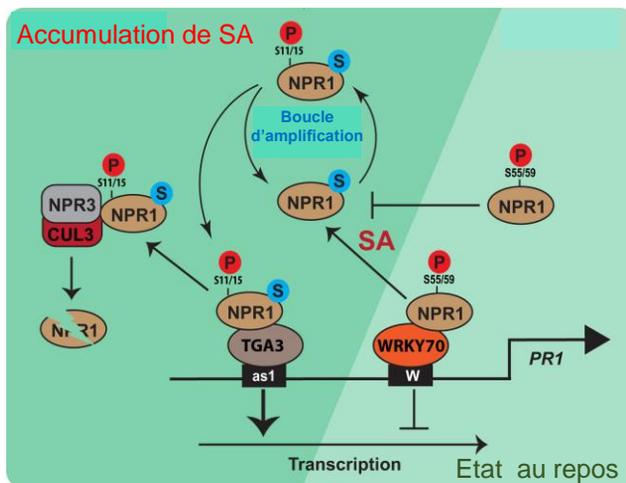
La régulation transcriptionnelle de la biosynthèse du SA est complexe et est liée à l'activation de facteurs de transcription et de kinases multiples (Zhang et Li, 2019 ; Peng et al., 2021). Chez *A. thaliana*, les facteurs de transcription appartenant à la famille des CBP60, SARD1 (pour « SAR-deficient 1 ») et CBP60g (pour « calmodulin-binding protein 60-like »), sont fortement induits après infection et permettent la régulation coordonnée des gènes *ICS1*, *EDS5* et *PBS3* (Figure 1.1.3.2.2 ; Zhang et al., 2010 ; Wang et al., 2011a ; Sun et al., 2015). A l'opposé, le transporteur EDS5 est modulé négativement par un facteur de transcription E2F atypique DEL1, en faveur de l'activation de gènes de croissance et de développement (pour « DP-E2F-like 1 » ; Chandran et al., 2014). Il semblerait que les facteurs SARD1 et CBP60g soient importants à la fois pour la PTI et l'ETI, ainsi que pour la propagation systémique de

l'activation de défenses SA-dépendantes (Peng et al., 2021). De même, ils s'avèrent que certaines kinases (CDK8 pour « Cyclin-Dependent Kinase 8 ») sont associées à l'accumulation du SA en activant les gènes *ICS1* et *EDS5* (Huang et al., 2019). A l'inverse, des activateurs de transcription CaM (CAMTA pour « CaM-binding transcription activators ») sont impliqués dans la répression de *SARD1* et *CBP60g* en l'absence d'agents pathogènes (Sun et al., 2020a). La dynamique des niveaux de SA est aussi régulée par des modifications chimiques telles que les hydroxylations ou glycosylations. En absence d'infection, le SA est converti par une hydroxylase en acide 2,3- ou 2,5-dihydroxybenzoïque (Zhang et al., 2013 ; Zhang et al., 2017b). Ces produits de dégradation peuvent être de nouveau mobilisés en SA lors d'une infection par glycosylation (Huang et al., 2018). Pour interférer avec les défenses SA-dépendantes, certains agents pathogènes disposent d'enzymes capables de dégrader le SA, notamment par des hydroxylases (Lowe-Power et al., 2016 ; Qi et al., 2018). Chez *A. thaliana*, certains PRR sont identifiés comme des activateurs de *ICS1* en induisant des événements de phosphorylation (Kong et al., 2016). De même, certains NLR sont impliqués dans la biosynthèse du SA, par des intermédiaires différents selon leur domaine N-terminal. Les CNL activent un régulateur *NDR1* (pour « Nonspecific disease resistance 1 ») alors que les TNL activent le dimère *EDS1* (« Enhanced disease susceptibility 1 ») et *PAD4* (« Phytoalexin deficient 4 » ; Vlot et al., 2009). *EDS1* est un nœud important dans l'immunité d'*A. thaliana*, puisqu'il conduit à différentes réponses selon les RNL auxiliaires activés par les NLR. Alors que les dimères *EDS1-PAD4* activés par le RNL *ADR1* activent les gènes de défense SA-dépendants (Bhandari et al., 2019 ; Dongus and Parker, 2021), le RNL *NRG1* provoque l'association de *EDS1* avec *SAG101* (« Senescence associated gene 101 ») et active une réponse ETI liée à la mort cellulaire (Sun et al., 2021 ; Dongus and Parker, 2021). Des PRR peuvent aussi moduler les défenses SA-dépendantes par l'activation des complexes *ADR1-EDS1-PAD4* (Dongus et Parker, 2021).

1.1.3.2.3 Perception et activation des gènes SA-dépendants

La perception du SA est principalement médiée par *NPR1* (« non-expressor of pathogenesis-related (PR) genes 1 ») qui active les défenses (Wu et al., 2012). Les séquences nucléotidiques et protéiques de *NPR1* montrent une forte conservation dans différentes espèces végétales suggérant un rôle prépondérant de ce régulateur dans les mécanismes de défense (Withers et Dong, 2016). Cette protéine dispose d'un domaine C-terminal transactivateur associé à deux domaines de liaison aux protéines : un domaine central de répétitions ankyrines (ANK) et un domaine N-terminal BTB/POZ (« Broad complex, Tramtrack, and Bric-a-brac/Pox virus and Zinc finger »). Le domaine ANK est essentiel pour l'activation de facteurs de transcription TGA (« TGACG-Binding »), membres de la famille des bZIP (Cao et al., 1997 ; Rochon et al., 2006). *NPR1* forme des homopolymères dans le cytoplasme reliés par des ponts disulfures au niveau de leur résidu cystéine. L'accumulation du SA modifie le potentiel rédox cellulaire entraînant la réduction enzymatique (thioredoxine, glutaredoxine, etc.) des polymères en monomères, et

A



B

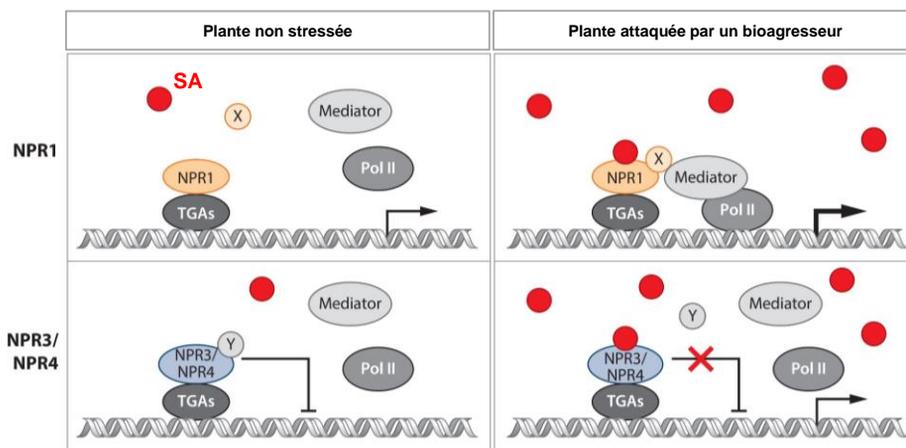


Figure 1.1.3.2.3 : Modèle d'activation et de perception du SA par NPR1 (A, B) et NPR3/4 (B). (A) L'accumulation de SA favorise la déphosphorylation (P) des sérines 55/59 et induit la sumoylation de NPR1, résultant de la dissociation du facteur WRKY70 et l'inactivation de ce répresseur. La modification de NPR1 par SUMO3 (S) est requise pour sa phosphorylation sur les sérines 11/15 pour former une boucle d'amplification du signal et générer plus de NPR1 activé. Cette forme activée interagit avec le facteur de transcription TGA3 pour induire l'expression du gène *PR1*. Ensuite, le NPR1 modifié est ubiquitiné et ciblé pour sa dégradation par le protéasome 26S, médiée par l'interaction avec NPR3 pour assurer la nature transitoire de l'induction immunitaire. (B) Quand le niveau de SA est faible (plante non stressée), NPR1 est inactif, et NPR3 et NPR4 répriment l'expression des gènes de défense en interagissant avec un cofacteur hypothétique Y. Quand le niveau de SA augmente (plante stressée), le SA s'associe à NPR3 et NPR4 pour induire la dissociation au cofacteur Y, aboutissant à la dérégulation des gènes cibles. Pendant ce temps, l'association du SA à NPR1 facilite l'interaction entre NPR1 et un cofacteur inconnu X, qui le connecte au médiateur, recrutant l'ARN polymérase II (Pol II) pour activer les gènes cibles. (Saleh et al., 2015 ; Peng et al., 2021).

permettant ainsi à NPR1 d'accéder au noyau (Mou et al., 2003). La réduction seule des ponts disulfures est néanmoins insuffisante pour libérer les monomères. La monomérisation de NPR1 nécessite également un changement de conformation de la protéine, qui se produit par l'association du SA avec les ions cuivre présents à proximité de certains résidus cystéine (521 et 529) du domaine C-term transactivateur, ce qui réduit son affinité avec le domaine N-term BTB/POZ (Wu et al., 2012). NPR1 va induire les défenses en se liant à des facteurs de transcription TGA (Zhang et al., 1999b). L'activité de ce dernier est finement régulée dans le noyau par des mécanismes de phosphorylation et de sumoylation. En condition normale, la protéine NPR1 peut être associée au facteur WRKY70 ce qui ne permet pas l'induction de gènes de défense SA-dépendants, tel que le gène *SARD1*. Une accumulation de SA provoque une déphosphorylation de certaines sérines (55 et 59) et dissocie NPR1 de WRKY70, pour activer les défenses SA-dépendantes. NPR1 subit ensuite une sumoylation provoquant une phosphorylation sur de nouvelles sérines (11 et 15). Ces transformations rendent NPR1 actif et permettent son interaction avec des facteurs de transcription TGA. Il est également supposé que cet état actif rend NPR1 plus sensible à l'ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome 26S (Figure 1.1.3.2.3A ; Saleh et al., 2015). Cette séquence d'activation suivie d'une dégradation de NPR1 serait nécessaire pour assurer le caractère transitoire de l'induction intense des gènes de défenses (Spoel et al., 2009 ; Withers and Dong, 2016).

NPR1 semble être impliqué dans l'établissement de la PTI, l'ETI et l'activation systémique des défenses (Zhang et Li, 2019 ; Peng et al., 2021). Durant l'ETI, un gradient de concentration en SA s'établit depuis le point d'infection (Enyedi et al., 1992 ; Dorey et al., 1997), où la forte concentration de SA est associée à une réponse HR (Torres et al., 2005 ; Lu et al., 2009). Cependant, l'accumulation de NPR1 inhiberait la réponse HR induite par l'ETI suggérant que NPR1 serait inactif lors de la HR (Rate et Greenberg, 2001). Un modèle propose que les mécanismes de dégradation de NPR1 sumoylés sont régulés par la concentration de SA et deux orthologues, NPR3 et NPR4, qui serviraient d'adaptateurs à l'ubiquitination. NPR3 et NPR4 auraient respectivement une faible et forte affinité avec le SA. Lorsque la concentration en SA est faible, NPR1 est dégradé suite à son association avec NPR4. En cas d'élévation modérée de SA, NPR4 se conjugue au SA et se dissocie de NPR1 qui peut alors déclencher les défenses. Par contre, une forte concentration de SA entraîne l'association de NPR1 avec NPR3, ce qui conduit à sa dégradation. Ce modèle suppose que NPR1 est notamment impliqué dans l'activation des défenses SA-dépendant dans des tissus à distance du point d'infection (Fu et al., 2012 ; Yan et Dong, 2014). Cependant, une étude récente montre que NPR3 et NPR4 ne modifieraient pas la concentration en NPR1, auraient la même affinité pour le SA et joueraient plutôt un rôle de co-répresseur des gènes de défenses SA-dépendant, par l'intermédiaire des TGA. Ce nouveau modèle suggère que le SA s'associerait avec NPR3/NPR4 et lèverait leur répression transcriptionnelle (Figure 1.1.3.2.3B ; Ding et al., 2018).

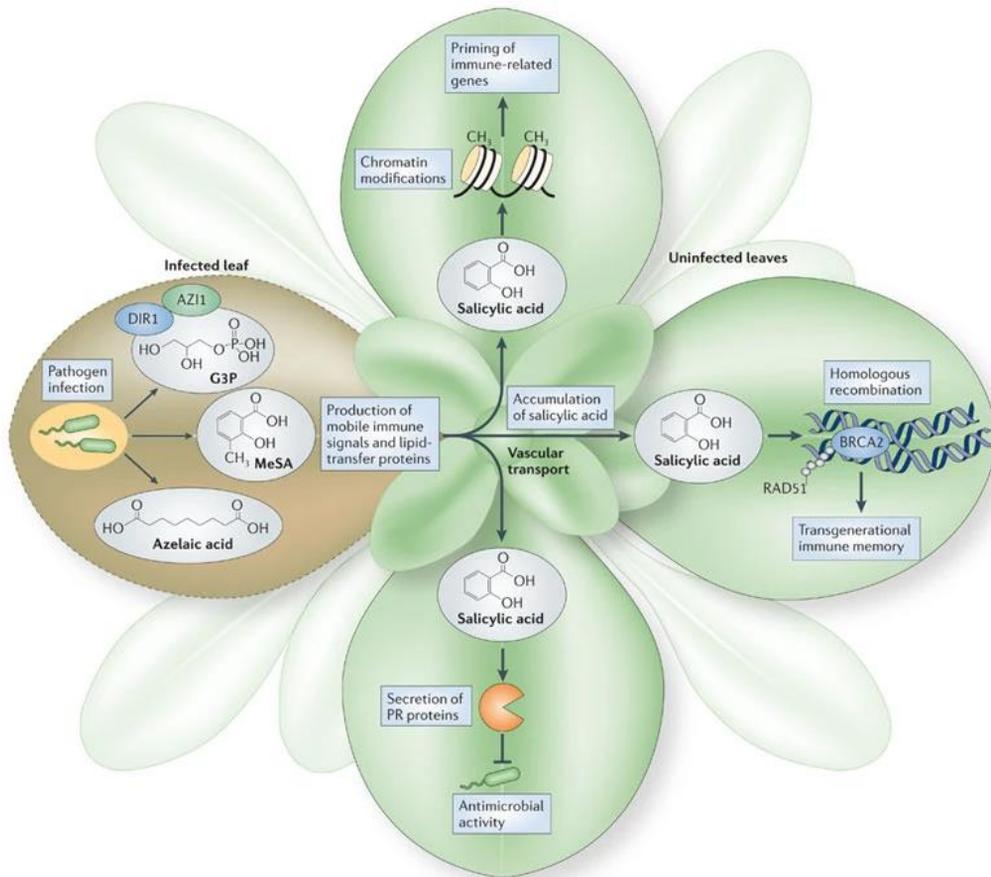


Figure 1.1.3.2.4 : Translocation des signaux de la SAR et induction d'une mémoire immunitaire chez *A. thaliana*. L'infection locale par un agent pathogène entraîne la production de signaux immunitaires mobiles tels que le MeSA, le G3P, ainsi que les protéines de transfert des lipides DIR1 et AZI1. Ces signaux mobiles sont transportés par le système vasculaire vers les parties distales non infectées de la plante, où, par un mécanisme inconnu, ils induisent l'accumulation du SA, qui déclenche lui-même la production de protéines PR, la méthylation des histones et d'autres modifications de la chromatine. Ces dernières préparent les gènes liés à l'immunité à une expression accrue et favorisent la recombinaison homologue somatique par l'intermédiaire des actions de BRCA2 et RAD51, ce qui pourrait contribuer à établir une mémoire transgénérationnelle de l'immunité (Spoel et Dong, 2012).

De nombreux mécanismes constituent des boucles de rétro-action positives dans l'accumulation du SA. Le SA induit sa propre accumulation et celle de NPR1, notamment par l'induction de SARD1 et CBP60g qui à leur tour conduisent à l'induction de la voie de biosynthèse du SA (ICS1, EDS5 et PBS3). Cependant, l'accumulation de SA stimule aussi sa propre conversion en forme glycosylée ou sa dégradation en induisant respectivement les gènes codant pour des glycotransférases et des hydroxylases. De même, il semblerait que NPR3/NPR4 soient impliqués dans la répression du SA à la suite d'une accumulation (Peng et al., 2021). D'autres facteurs de transcription, tel que NIMIN1 (pour « NIM1-interacting 1 »), sont induits par l'accumulation du SA et conduisent à la répression des gènes impliqués dans la biosynthèse de SA (Weigel et al., 2005). Ainsi, le SA est non seulement impliqué dans l'activation d'une multitude de gènes de défense via des boucles de rétroaction positives finement régulées, mais est également impliqué via des boucles de rétro-action négatives dans le freinage de la réponse immunitaire (Zhang et Li, 2019 ; Peng et al., 2021).

1.1.3.2.4 Définition de la SAR

La résistance systémique acquise (SAR) est une forme de « mémoire immunitaire » stimulée par un éliciteur ou une première agression, qui confère une meilleure résistance systémique à une seconde infection (Figure 1.1.3.2.4). La SAR est un mécanisme conservé dans le règne végétal, permettant parfois une résistance sur le long-terme voire transgénérationnelle selon certains auteurs (Conrath, 2006 ; Spoel et Dong, 2012). Le SA, ainsi que certains acteurs de sa régulation (SARD1, CBP60g, etc.) sont impliqués dans l'établissement de la SAR (Peng et al., 2021). Cette « mémoire immunitaire » semble reposer sur des modifications épigénétiques (Luna et al., 2011a ; Spoel et Dong, 2012), tels que le remodellement de chromatine (Jaskiewicz et al., 2010), des modifications d'histones (Spoel et Dong, 2012) et la méthylation de l'ADN (López Sánchez et al., 2016). Ces mécanismes permettent de rendre plus accessible le promoteur de gènes de défense pour que ces derniers soient transcrits de manière plus rapide et efficace. Ce mécanisme traduit l'importance de la rapidité du déploiement des réponses défensives dans la résistance (Spoel et Dong, 2012). D'autre part, la SAR arme les défenses sans consommation d'énergie excessive, ce qui implique un coût de fitness moindre qu'une induction massive et soutenue des défenses (Heidel et al., 2004 ; Reynolds et al., 2019). La SAR peut être décrite en trois étapes distinctes : (i) la production d'un signal au niveau du site de la première infection, (ii) le transport systémique de ce signal et (iii) la perception de ce signal dans les tissus distaux permettant d'amorcer les défenses (Conrath, 2006 ; Spoel et Dong, 2012). A l'heure actuelle, aucun signal universel à toutes les espèces n'est identifié, mais différents composés semblent impliqués dans ce phénomène.

1.1.3.2.5 Les acteurs de la SAR

Le SA et son dérivé méthylé volatile (MeSA) font partie des premiers acteurs identifiés dans la SAR (Gao et al., 2021). Le SA est accumulé au niveau du site d'infection et retrouvé dans la sève élaborée de manière systémique (Malamy et al., 1990 ; Métraux et al., 1990). Les plantes sur-exprimant une enzyme dégradant le SA (hydroxylase d'origine bactérienne : NahG convertissant le SA en catéchol) sont incapables de mettre en place la SAR (Gaffney et al., 1993 ; Delaney et al., 1994) sauf lorsque le SA est appliqué de manière exogène (Delaney et al., 1994). Chez *A. thaliana*, les mutants déficients dans l'activation de la biosynthèse du SA sont incapables d'induire la SAR (mutants SARD1 et CBP60g ; Zhang et al., 2010 ; Wang et al., 2011). Cependant, des expériences de greffage montrent que l'accumulation de SA n'est pas critique dans l'induction de la SAR et qu'il ne constitue pas le seul signal possible à son induction. Par contre, son accumulation distale semble nécessaire dans la mise en place de la SAR (Vernooij et al., 1994 ; Pallas et al., 1996). Ainsi, la SAR impliquerait la synthèse *de novo* du SA de manière systémique (Gao et al., 2021). Le MeSA semble aussi impliqué dans l'établissement de la SAR. Des études montrent que la méthylation du SA au site d'infection et sa déméthylation dans les organes plus éloignés contribuent à la mise en place de la SAR, suggérant que le MeSA est une molécule signal (Park et al., 2007 ; Vlot et al., 2008 ; Park et al., 2009 ; Manosalva et al., 2010). Cependant, ce n'est pas la déméthylation du MeSA en SA au niveau du site-cible qui permet l'activation distale des défenses puisqu'une accumulation *de novo* de SA au niveau distal est nécessaire à la SAR (Attaran et al., 2009).

D'autres composés, dérivés des lipides, sont potentiellement des signaux de la SAR, tels que le glycérol-3-phosphate (G3P) et l'acide azélaïque (AzA ; Gao et al., 2021). La SAR induite par ces deux dérivés lipidiques nécessite une protéine DIR1 (« Defective in induced resistance 1 »), de la famille des transporteurs de lipides (LTP « Lipid transfert protein ») chez *A. thaliana* (Maldonado et al., 2002) mais aussi chez le tabac (*N. tabacum* ; Liu et al., 2011) et le concombre (*Cucumis sativus* ; Isaacs et al., 2016). Des plantes mutantes affectées dans la biosynthèse de DIR1 sont incapables d'induire la SAR, mais voient cette capacité rétablie lorsque des exsudats de pétiole issus de plantes non-transformées et préalablement élicitées sont infiltrés dans les feuilles des mutants *dir1* (Maldonado et al., 2002). DIR1 est exprimé dans les tubes criblés et les cellules compagnes du phloème (Champigny et al., 2011), et est susceptible de se mouvoir au travers des plasmodesmes (Carella et al., 2014). DIR1 est capable de s'associer avec d'autres LTP, comme AZAI1 (« Azélaïque induced 1 ») pour induire la SAR G3P-dépendante (Chanda et al., 2011 ; Yu et al., 2013). La réduction du phosphate du dihydroxyacétone par la G3P déshydrogénase (G3PDH ; Nandi et al., 2004) ou la phosphorylation du glycérol par la glycérol kinase (GK ; Kang et al., 2003) permet la synthèse de G3P qui est le précurseur de la plupart des triglycérides végétaux mais aussi du signal de la SAR. L'invalidation génétique de la G3PH et de la GK impacte négativement la SAR, mais celle-ci peut être restaurée par l'application exogène de G3P. Par contre, il semble que ce n'est pas le G3P qui est directement transporté

par DIR1 vers les organes distaux, mais que ce soit l'un de ses dérivés (Chanda et al., 2011). L'AzA est issu de la peroxydation lipidique et participe aussi à la SAR, notamment puisque son application exogène potentialise la production de SA et l'activation des gènes de défense associés (Jung et al., 2009). Enfin, l'application de d'AzA induit l'accumulation de G3P, mais est incapable d'induire la SAR chez des mutants déficients en G3PDH et GK, ce qui suggère que l'AzA induit la SAR en modulant des taux de G3P (Yu et al., 2013).

Il existe d'autres signaux impliqués dans la SAR, tels que des dérivés de la lysine et des terpénoïdes, comme l'acide pipecolique/l'acide N-hydroxy-pipecolique (Pip/NHP) et le déhydroabiétinal (DA). Ce dernier est un diterpène capable d'induire la SAR à très faibles doses de manière SA-dépendante (Chaturvedi et al., 2012), et est notamment accumulé chez les conifères en réponse aux ravageurs (Trapp et Croteau, 2001 ; Bohlmann et Keeling, 2008). D'autres terpénoïdes tels que des monoterpènes volatils (α - et β -pinene) sont capables d'induire la SAR de manière SA- et G3P-dépendante (Riedlmeier et al., 2017 ; Wenig et al., 2019). La lysine peut être convertie en acide Δ 1-pipéridine-2-carboxylique (P2C) par l'aminotransférase ALD1, et le P2C est ensuite converti en Pip par SARD4 (Hartmann et al., 2017). Il semblerait que Pip soit plutôt accumulé de manière systémique mais de façon moindre au niveau du point d'infection même si celui-ci est aussi indispensable dans la résistance locale et systémique. Son application exogène permet d'amorcer la SAR (Návarová et al., 2012). Il semblerait que SARD4 soit davantage nécessaire à la synthèse de Pip à distance du point d'infection (Ding et al., 2016). ALD1 et SARD4 sont positivement régulés par SARD1 et CBP60g, qui modulent ainsi de manière synergique le SA et le Pip par le biais de TGA (Sun et al., 2015 ; Sun et al., 2017). D'autres régulateurs du SA induisent la synthèse de Pip, tels que PAD4 et NPR1 (Návarová et al., 2012). De plus, l'accumulation de Pip constitue une boucle de rétro-action positive de l'induction du SA, en induisant les CBP60g, SARD1, PAD4 et EDS1. NPR1 traduit la relation étroite entre le SA et Pip, puisqu'il est requis pour potentialisation de la SAR Pip-dépendante et Pip semble impliqué dans la stabilisation de NPR1 en absence de SA (Kim et al., 2020). Pip peut être converti en NHP par FOM1 (pour « Flavin-dependent monooxygenase 1 » ; Hartmann et al., 2018). NHP constitue comme Pip une molécule intimement liée au SA et essentielle dans l'activation de la SAR (Hartmann et Zeier, 2019).

1.1.3.3 Autres phytohormones impliquées dans les défenses

D'autres phytohormones sont mobilisées dans les défenses suite à la reconnaissance des bioagresseurs, telles que le JA et l'ET qui agissent le plus souvent en synergie. Ces deux phytohormones sont impliquées dans la résistance systémique induite (ISR). L'ISR est une résistance induite par les microorganismes symbiotiques racinaires, qui permet d'éliciter les défenses de manière systémique. L'ISR se différencie de la SAR notamment par les phytohormones impliquées dans sa régulation et sa signalisation. La littérature fait état de

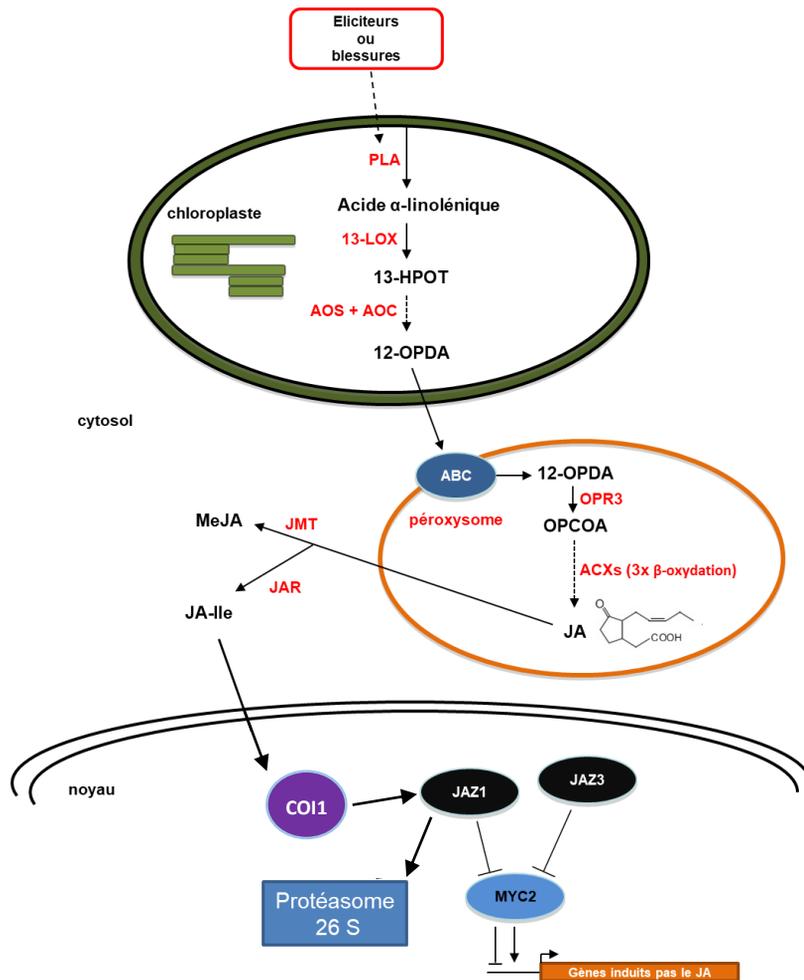


Figure 1.1.3.3.1 : Biosynthèse et voie de signalisation schématique du JA. PLA : phospholipase A ; 13-LOX : 13-lipoxygénase ; 13-HPOT : 13-hydroperoxy linolenic acid ; AOS: allène oxyde synthase ; AOC : allène oxyde cyclase ; 12-OPDA : 12-oxophytodienoate ; OPR3 : 12-oxophytodienoate réductase 3 ; OPCOA : 3-oxo-2-(2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid ; ACXs : acyl-CoA oxydases ; MeJA: méthyl-jasmonate ; JA-Ile : conjugué jasmonate-isoleucine (Gaucher, 2012).

nombreuses relations antagonistes entre le SA et le couple JA/ET même si ce n'est pas une règle absolue (Li et al., 2019).

1.1.3.3.1 Acide jasmonique (JA)

La biosynthèse du JA est initiée par la dégradation de la membrane lipidique des chloroplastes par des phospholipases (Figure 1.1.3.3.1 ; Ruan et al., 2019). Ces phospholipases sont activés par des molécules signales polypeptidiques comme la systémine chez la tomate (*Solanum lycopersicum* ; Ryan et Pearce, 2003) et PEP1 chez *A. thaliana* (Huffaker et al., 2006), issues de l'hydrolyse de leur précurseur respectif la prosystémine et PROPEP1, après dégradation des tissus (Ryan et Pearce, 2003 ; Huffaker et al., 2006). La systémine et PEP1 sont reconnus par un récepteur situé à la surface membranaire, nommé SR160 (« systemin receptor 160 » ; Scheer et Ryan, 2002 ; Li et al., 2003) et PEPR1 (Yamaguchi et al., 2006) respectivement. Plusieurs produits issus de l'activité phospholipase peuvent conduire à la formation de JA, dont l'acide α -linoléique (18:3). Chez *A. thaliana*, ce dernier est progressivement transformé en acide *cis*-12-oxophytodienoïque (OPDA) dans le chloroplaste par l'action de 3 enzymes : la 13-lipoxygénase (LOX), l'allène oxide synthase (AOS) et cyclase (AOC). L'OPDA est ensuite transféré vers le cytoplasme par un transporteur JASSY puis incorporé dans le péroxysome par un transporteur ABC (nommé CTS pour « COMATOSE »). L'OPDA est ensuite progressivement transformé en JA, par la réduction du cycle cyclopenténone et le raccourcissement de la chaîne latérale de l'acide carboxylique (Wasternack et Hause, 2019). Dans le cytoplasme, le JA peut être métabolisé en différents dérivés, tels que le méthyl-Jasmonate (MeJA) formé par la JA-méthyl-transférase (Farmer et al., 1992) ou le JA conjugué à l'isoleucine (JA-Ile) formé par JAR1 (Suza et Staswick, 2008). Dans le noyau, le JA-Ile entraîne l'activation de la protéine COI1 (« coronatine-insensitive 1 ») possédant un domaine d'interaction protéique F-box capable de se lier à une culline et la protéine SKP1 (« S-phase kinase-associated protein 1 ») pour former un complexe E3-ubiquitine ligase. Ce complexe entraîne la dégradation protéasomique des protéines JAZ (« Jasmonate-zim domain ») par ubiquitination. Les protéines JAZ permettent de réprimer constitutivement des protéines activatrices de la voie JA, comme le facteur de transcription MYC2 connu pour induire la synthèse des flavonoïdes, la production de protéines PR ainsi qu'un stress oxydant (Kazan et Manners, 2013). Leur dégradation par le protéasome permet donc d'enclencher les défenses JA-dépendantes (Chini et al., 2009).

1.1.3.3.2 Ethylène (ET)

L'ET est une petite phytohormone volatile ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) impliquée dans de nombreux processus développementaux (maturation, germination, etc.) mais qui agit en synergie avec le JA dans la mise en place des défenses. Elle est formée à partir de la méthionine dans le cycle de Yang qui permet de récupérer une 5'-methylthioadénosine (MTA) à chaque cycle. La MTA peut

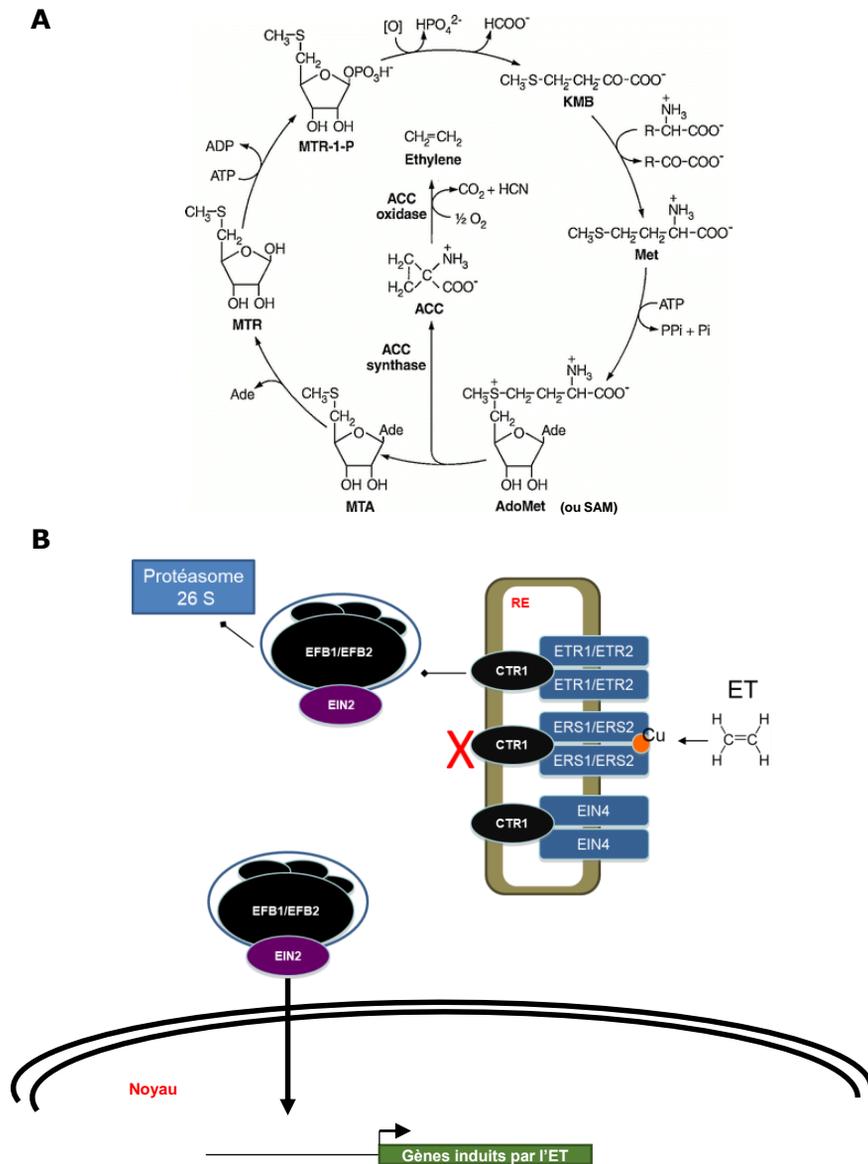


Figure 1.1.3.3.2 : Biosynthèse (A ; Bleecker et Kende, 2000) et voie de signalisation schématique de l'éthylène (B ; Gaucher, 2012). (A) ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid ; Ade : adénine ; AdoMet : S-adenosyl-L-méthionine ; KMB : 2-kéto-4-méthylthiobutyric acid ; Met : L-méthionine ; MTA : 5'-méthylthioadénosine ; MTR : 5'-méthylthioribose ; MTR-1-P : 5'-méthylthioribose-1-phosphate. (B) Cu : Cuivre.

être incorporée dans de nouveaux cycles ce qui permet de maintenir une production d'ET avec un pool réduit de méthionines (Figure 1.1.3.3.2A ; Miyazaki et Yang, 1987 ; Pattyn et al., 2020). L'ET se diffuse ensuite dans le milieu et est perçu par 5 récepteurs connus chez *A. thaliana* (ETR1/2 pour « ethylene resistant 1/2 », ERS1/2 pour « ethylene response sensor 1/2 » et EIN4 pour « ethylene insensitive 4 ») situés dans le réticulum endoplasmique (Figure 1.1.3.3.2B ; Shakeel et al., 2015). Ces récepteurs, par l'intermédiaire de la kinase CTR1 (« compromised for recognition of turnip crinkle virus »), inhibent de manière constitutive les gènes éthylène-dépendants. Cette répression s'effectue en dégradant les facteurs de transcription EIN2 par le protéasome (Ju et al., 2012). Ces récepteurs possèdent une poche hydrophobe capable de piéger l'ET ce qui lève la dégradation exercée sur EIN2, qui active les gènes de défense liés à l'ET, en concert avec le JA, tels que ceux codant des protéines PR (Xu et al., 1994 ; Adie et al., 2007), des protéines impliquées dans la rigidification de la paroi ou la production de phytoalexines (Adie et al., 2007).

1.1.3.3.3 Interaction du JA et de l'ET avec le SA

Le SA, JA et l'ET sont régulés de manière coordonnée, puisque pour de nombreuses espèces, le SA est antagoniste au JA (Li et al., 2019). Certaines exceptions sont néanmoins décrites dans la littérature, montrant une synergie entre le SA et le JA dans l'élicitation des défenses (Mur et al., 2005 ; Thaler et al., 2012). La plupart des cas décrits montrent que le SA module la résistance aux agents pathogènes biotrophes alors que le JA/ET permet plutôt la résistance à des agents pathogènes nécrotrophes (Grant et Jones, 2009). NPR1 est l'un des acteurs majeurs de l'antagonisme des voies puisqu'il participe à la répression de la voie du JA/ET depuis le cytoplasme (Spoel et al., 2003). A l'inverse, certains acteurs induits par le JA/ET peuvent réprimer ceux de la voie SA, telles que les protéines EIN3 (Kazan et al., 2012). L'antagonisme entre le SA et le JA/ET semble être régulé par de nombreux facteurs (Caarls et al., 2015), tels que les WRKY. Ces derniers sont souvent cités (WRKY70/50/51) car leur induction active les gènes de la voie SA mais réprime ceux de la voie JA (Li et al., 2004 ; Gao et al., 2011). Le potentiel redox joue aussi un rôle, puisque l'accumulation de glutathion à la suite d'un traitement SA coïncide exactement avec la fenêtre de répression de la voie JA (Koornneef et al., 2008). La balance redox du glutathion est modulée par le JA et le SA qui augmentent ou réduisent respectivement le ratio glutathion réduit/oxydé (Spoel et Loake, 2011). L'accumulation de glutaredoxine induite par le SA participe ainsi à la répression de gènes de la voie JA (Ndamukong et al., 2007 ; Zander et al., 2012).

1.1.4 Réponses de défense

L'attaque d'un bioagresseur peut conduire à la mobilisation des défenses. Cette réponse, lorsqu'elle n'est pas entravée par les effecteurs du bioagresseur, permet de contenir ce dernier

ou de l'éliminer. De multiples réponses défensives sont possibles, telles que la synthèse de protéines et de métabolites antimicrobiens. Nous aborderons certains de ces mécanismes pour établir une vue générale des défenses actives chez les végétaux.

1.1.4.1 Isolement du bioagresseur

L'une des premières réponses de défense actives est la création ou la modification de barrières physiques qui protègent les cellules de l'hôte. Certains agents pathogènes bactériens utilisent les ouvertures naturelles comme les stomates pour atteindre l'apoplaste et coloniser la plante hôte (Melotto et al., 2008 ; Melotto et al., 2017). La reconnaissance par les récepteurs PRR peut engendrer rapidement la fermeture des stomates pour empêcher l'entrée de microorganismes pathogènes. Suite à la reconnaissance des PAMPs, de nombreux acteurs de la signalisation de défense permettent la fermeture stomatique (Melotto et al., 2006 ; Desikan et al., 2008 ; Zeng et He, 2010). L'activation de MAPK, l'accumulation de ROS/NO ainsi que les flux calciques font partie des premiers signaux déclenchés (Arnaud et Hwang, 2015). Certaines phytohormones comme le SA et l'ABA sont aussi impliquées dans la fermeture des stomates, alors que le conjugué JA-Ile semble être au contraire un antagoniste de la défense stomatique (Acharya et Assmann, 2008). Néanmoins, certains agents pathogènes sont capables d'interférer avec cette signalisation pour rouvrir les stomates. Les exemples les plus cités sont la sécrétion de coronatine (COR), un analogue du JA-Ile, ou la syringoline A (SyA), toutes deux produites par certaines espèces du genre *Pseudomonas* (Melotto et al., 2008 ; Melotto et al., 2017). La COR permet d'activer la transcription des enzymes de synthèse du JA, normalement réprimée par certains médiateurs de la voie du SA (Zheng et al., 2012 ; Gimenez-Ibanez et al., 2016). La COR active l'export de H⁺ provoquant l'influx de K⁺, ce qui favorise l'ouverture stomatique (Zhang et al., 2008). SyA inhibe la dégradation de NPR1 par le protéasome, ce qui est susceptible de supprimer la signalisation SA (Schellenberg et al., 2010). Des effecteurs sont aussi impliqués dans l'ouverture des stomates (Wang et al., 2016b), en agissant notamment sur la limitation de l'accumulation de ROS (Lozano-Durán et al., 2013 ; Hurley et al., 2014), par polarisation de la membrane plasmique qui permet l'export de H⁺ (Lee et al., 2015a ; Zhou et al., 2015) et/ou en manipulant l'antagonisme JA/SA (Jiang et al., 2013 ; Zhou et al., 2015).

La paroi est une structure dynamique qui peut se remodeler pour mieux protéger les cellules vis-à-vis de l'attaque des bioagresseurs (Bellincampi et al., 2014). En effet, ces derniers peuvent employer des enzymes de dégradation qui vont altérer la paroi (Walton, 1994). Une des premières stratégies de la plante est de déployer des protéines inhibitrices de ces enzymes de dégradation (Juge, 2006), comme les polygalacturonases qui dégradent la pectine (D'Ovidio et al., 2004) ou les endoxylanases qui dégradent le composant majeur de l'hémicellulose, le xylane (Juge, 2006). En réponse aux dommages pariétaux, la paroi peut être renforcée par l'ajout de composés structuraux comme la lignine (Vance et al., 1980 ; Bhuiyan et al., 2009),

ou l'augmentation du degré de méthylesterification des pectines (Lionetti et al., 2007 ; Raiola et al., 2011). Les stress biotiques et abiotiques peuvent déclencher la synthèse d'un composé pariétal spécifique, la callose. Ce polymère, synthétisé par les calloses synthases, est constitué de β -1,3-glucanes avec des ramifications (β -1,6) (Chen et Kim, 2009). Le dépôt de callose au niveau du site d'infection, des plasmodesmes et des tissus vasculaires permet de limiter la colonisation des agents pathogènes (Bellincampi et al., 2014). Le dépôt de callose est élicité par des PAMPs notamment par le biais de l'accumulation de ROS (Gómez-Gómez et al., 1999 ; Galletti et al., 2008 ; Luna et al., 2011b). La voie du SA est sollicitée pour déclencher la synthèse de callose chez *A. thaliana* (Wang et al., 2013 ; Bellincampi et al., 2014). La callose constitue une barrière physique décisive vis-à-vis de certains agents pathogènes, dont le succès infectieux dépend de sa répression par des effecteurs (Hauck et al., 2003 ; Kim et al., 2005b ; Tomczynska et al., 2020).

Enfin, la HR est une mort cellulaire rapide et localisée au point d'infection qui permet de contenir certains agents pathogènes. Celle-ci permet de contenir certains agents biotrophes mais s'avère moins efficace voire bénéfique pour les agents nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts. Dans le cas des hémibiotrophes, la HR s'avère efficace seulement au début de l'interaction mais le passage à un mode vie nécrotrophe la rend inefficace (Balint-Kurti, 2019). La HR est induite par de multiples facteurs, tels qu'un stress oxydant causé par la production de ROS et de NO, l'accumulation de Ca^{2+} et de SA (Delledonne et al., 2001). Ce phénomène est assez conservé chez les plantes supérieures, et décrit finalement une mort cellulaire observée phénotypiquement qui peut découler de mécanismes différents. Par exemple, la plupart des ETI déclenche une HR (Balint-Kurti, 2019), mais celle-ci est aussi observée pour des relations non-hôtes (Mysore et Ryu, 2004).

1.1.4.2 Production de protéines PR

Les plantes produisent de nombreuses protéines qui s'avèrent délétères pour les agents pathogènes. Les protéines défensives les plus étudiées sont les protéines PR (« pathogenesis-related »). Elles sont initialement décrites comme induites dans une situation de pathogenèse ou similaire (van Loon et al., 1994). A l'heure actuelle, 19 familles de protéines PR sont identifiées et numérotées selon leur ordre de découverte et considérées en tant que telles selon leurs propriétés biologiques et biochimiques communes (Visser et al., 2018 ; Arora et al., 2020). La plupart de ces protéines sont solubles dans l'acide, ont un faible poids moléculaire et sont résistantes aux protéases. Selon leur point isoélectrique, les protéines PR acides sont majoritairement excrétées dans l'apoplaste et les basiques sont compartimentées dans la vacuole le plus souvent. Pour la majeure partie des protéines PR, leur rôle dans la résistance n'est pas encore complètement élucidé mais certaines possèdent des propriétés antimicrobiennes avérées. Leur induction a été rapportée dans différentes espèces, supposant

un rôle commun dans l'immunité végétale (van Loon et al., 2006 ; Jain et Khurana, 2018). Ces protéines peuvent être induites par le SA (Van Huijsduijne et al., 1986, Renault et al., 1996) l'ET, le JA et le MeJA (Xu et al., 1994 ; Rakwal et al., 2004). Ces protéines sont aussi mobilisées de manière systémique au cours de la SAR (Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2018).

PR-1 est la première protéine PR identifiée dans les années 70 à partir de plants de tabac infectés par le virus de la mosaïque du tabac. La fonction de PR-1 n'est pas encore bien déterminée mais celle-ci possède des propriétés antifongiques, en s'associant aux stéroïdes (Breen et al., 2017). De nombreuses chitinases (PR-3,4,8,11) et une β -1,3-glucanase (PR-2) ont ensuite été découvertes et classées comme protéines PR. Ces enzymes sont potentiellement capables de dégrader la paroi des champignons et des insectes (Ji et Kuć, 1996 ; Sharma et al., 2010 ; Balasubramanian et al., 2012 ; Jain et Khurana, 2018). PR-5 possède une séquence similaire aux thaumatococines, protéines antifongiques, impliquées notamment dans la perméabilisation de la paroi fongique (Vigers et al., 1992). PR-6 présente une activité inhibitrice de protéases pouvant altérer le processus infectieux des microorganismes ou les enzymes digestives des insectes (Koiwa et al., 1997 ; Sudisha et al., 2011). Cette famille regroupe des inhibiteurs de protéinase à sérine, à cystéine et à métallo/aspartate (Sudisha et al., 2011). La PR-7 est une endoprotéinase (van Loon et al., 2006) et à ce titre, est potentiellement capable d'avoir de multiples fonctions protéolytiques défensives (van der Hoorn et Jones, 2004 ; Schaller et al., 2017). PR-9 code pour une peroxydase (van Loon et al., 2006), enzyme notamment associée au renforcement de la paroi cellulaire (Passardi et al., 2007). Les PR-10 codent pour des homologues de protéines ribonucléasiques pouvant jouer un rôle de dégradation des virus (Park et al., 2003 ; Liu et Ekramoddoullah, 2006). PR-12 appartient à la famille des défensines (van Loon et al., 2006), connues pour inhiber la croissance des microorganismes (Broekaert et al., 1995). PR-13 est une thionine, protéine aux propriétés antimicrobiennes (van Loon et al., 2006), à priori sans impact sur les ravageurs (Rayapuram et al., 2008). PR-14 est une LTP (van Loon et al., 2006) qui assure le transfert des lipides à travers les membranes mais qui peut aussi avoir des propriétés antibiotiques (García-Olmedo et al., 1995). PR-15 et PR-16 sont des oxalates oxydases et des homologues d'oxalates oxydases de type germines (van Loon et al., 2006), capables de générer de l' H_2O_2 toxique pour les bioagresseurs (Dunwell et al., 2008). PR-17 possède une séquence proche des métalloprotéinases, une famille d'endopeptidases zinc-dépendante (Christensen et al., 2002), suspectée d'être impliquée dans le remodelage de la matrice pariétale (Marino et Funk, 2011). Deux nouvelles protéines PR ont été récemment ajoutées à la liste, PR-18 et PR-19, qui codent respectivement pour une carbohydre oxydase et un peptide antibactérien (Visser et al., 2018 ; Arora et al., 2020). PR-18 aurait la capacité de réduire les carbohydre, notamment des hexoses accumulés lors de l'infection pour produire de l' H_2O_2 (Custers et al., 2004). PR-19 possède des propriétés antifongiques en se liant aux β -1,3-glucanes de la paroi fongique (Marcus et al., 2004 ; Sooriyaarachchi et al., 2011).

1.1.4.3 Synthèse de métabolites

Les métabolites secondaires des plantes sont par définition supposés être non essentiels au métabolisme primaire, et peuvent être impliqués dans la réponse défensive vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques. Mais ces métabolites sont en réalité multifonctionnels et peuvent avoir un rôle au niveau hormonal ou dans le métabolisme primaire (Erb et al., 2020). Une partie des enzymes produites au cours d'un stress biotique ou abiotique servent à synthétiser de nouvelles molécules (phytoalexines ; Khare et al., 2020) mais certaines sont déjà présentes de manière constitutive (phytoanticipines ; Pedras et Yaya, 2015). Les métabolites secondaires défensifs peuvent être répartis en 3 familles : les produits phénoliques, les terpénoïdes et les composés azotés et sulfurés (Zaynab et al., 2018).

La voie des phénylpropanoïdes débute par la formation de 4-coumaroyl-CoA à partir de la phénylalanine, par l'action de 3 enzymes (Phénylalanine ammonia-lyase, acide cinnamique hydroxylase et 4-coumaryol-CoA ligase ; Ferrer et al., 2008). Le 4-coumaroyl-CoA est le précurseur central de nombreuses voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes, tels que les monolignols qui participent à la lignification des parois (Dixon et Barros, 2019). Cette voie participe aussi à la formation de stilbènes qui sont des composés répulsifs pour les insectes ou biocides pour les microorganismes, notamment le resveratrol vis-à-vis d'agents pathogènes fongiques (Jeandet et al., 2010). Parmi les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes regroupent 8 familles dispersées dans les plantes supérieures : les flavones, les isoflavones, les flavonols, les anthocyanes, les flavanones, les chalcones, les dihydrochalcones et les flavan-3-ols (Ferrer et al., 2008). La diversité des flavonoïdes caractérise la multifonctionnalité de cette famille, notamment essentielle pour la protection contre les UV et la reproduction (Koes et al., 1994). Ce sont aussi des phytoalexines antimicrobiennes induites lors de l'infection (Treutter, 2006). Par ailleurs, certains agents pathogènes peuvent bloquer l'accumulation de ces phénylpropanoïdes, comme par exemple les isoflavones bactéricides (daidzéine) dont l'enzyme de biosynthèse est réprimée par des effecteurs bactériens (Zhou et al., 2011 ; Bauters et al., 2021).

Les terpènes regroupent aussi une large famille de composés avec des structures très diversifiées. La voie de biosynthèse des terpénoïdes débute par deux précurseurs, l'isopentényl diphosphate (IPP) ou son isomère, le diméthylallyl-diphosphate (DMAPP), synthétisés par voie chloroplastique ou cytosolique. Les terpènes sont classés selon le nombre d'atomes de carbones qui composent leur squelette et dont la base unitaire est l'isoprène (C5). Les monoterpènes (C10), les diterpènes (C20) et les tetraterpènes (C40) sont synthétisés dans le chloroplaste alors que les sesquiterpènes (C15) et les triterpènes (C30) sont synthétisés dans le cytoplasme (Singh et Sharma, 2015 ; Zhou et al., 2020). Ces composés peuvent subir une cyclisation catalysée par des terpènes synthases (TPS) responsables de la diversité des structures présentes dans cette famille (Tholl, 2006 ; Singh et Sharma, 2015). La plupart des terpénoïdes sont des composés

volatils défensifs contre les insectes ravageurs, avec des propriétés insecticides ou répulsives (Unsicker et al., 2009 ; Boncan et al., 2020). Néanmoins, certains sesquiterpènes synthétisés suite à une infection bactérienne présentent une activité bactéricide (Delannoy et al., 2005).

Les composés azotés et sulfurés réunissent plusieurs familles de composés secondaires dont les alcaloïdes (Zaynab et al., 2018). Les alcaloïdes sont subdivisés en de nombreuses familles ayant pour chacune d'entre elles un précurseur commun, tel que la strictosidine pour les alcaloïdes indoliques monoterpéniques (Ziegler et Facchini, 2008). Ces composés sont majoritairement des phytoanticipines, mais certains peuvent être aussi considérés comme des phytoalexines (Ali et al., 2019). Ils peuvent en effet être accumulés dans des tissus blessés, et améliorer la protection contre l'herbivorie de certains insectes (Baldwin, 1988 ; Khan et Harborne, 1990). Bien que certaines accumulations d'alcaloïdes soient attribuées à une remobilisation des phytoanticipines et non à une synthèse *de novo* (Yazaki, 2006), des alcaloïdes préformés peuvent être modifiés en réponse à des éliciteurs hormonaux (phytomodificines ; Abouzeid et al., 2019).

1.2 Les stimulateurs de défenses des plantes

Les défenses décrites précédemment peuvent être utilisées comme moyens de lutte contre les bioagresseurs, notamment en utilisant des mécanismes comme la SAR. Certains intrants, appelés stimulateurs de défenses des plantes (SDP), activent le système immunitaire des plantes pour apporter une protection vis-à-vis des bioagresseurs (Walters et al., 2013 ; Gozzo et Faoro, 2013).

1.2.1 Définition et exemples de SDP

Les SDP confèrent généralement une résistance à une large gamme de bioagresseurs en induisant l'immunité innée, et ne possèdent pas d'activité biocide directe vis-à-vis des bioagresseurs au sens strict. Il existe plusieurs catégories de SDP (Walters et al., 2013 ; Gozzo et Faoro, 2013) :

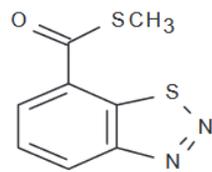
- des analogues de phytohormones de défense,
- des motifs moléculaires reconnus par les récepteurs PPR et issus d'organismes divers (microbes, plantes, ou autres),
- des microorganismes vivants non pathogènes,
- des composés inorganiques.

L'acibenzolar-s-methyl est l'analogue le plus connu d'une phytohormone de défense et sera détaillé ci-dessous, dans un paragraphe à part.

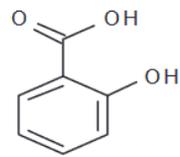
Des PAMPs sont souvent utilisés pour étudier les mécanismes de défense au niveau fondamental, tels que la flg22 ou EF-Tu (Wiesel et al., 2014). Certains PAMPs sont commercialisés en formulation, tel que le chitosane (Ex : Elexa® ; Sharathchandra et al., 2004) qui est un polymère de β -1,4-N-acétyl-D-glucosamine et l'un des constituants majeurs de la paroi fongique et de la cuticule des insectes. Ce dérivé de la chitine est capable d'induire les défenses caractéristiques de la PTI mais présente également des propriétés antimicrobiennes probablement du fait de sa nature qui déstabilise les membranes. Il est donc difficile de conclure sur l'origine de la protection apportée, toxicité directe et/ou résistance induite (El Hadrami et al., 2010). Un produit commercialisé utilise des effecteurs de type harpine (Ex : Messenger®) pour éliciter les défenses mais aussi pour des propriétés de biostimulation (Wei et Betz, 2007). Les harpines induiraient de manière synergique les gènes de défense associés au SA et à la SAR (protéines PR ; Dong et al., 1999), et au JA/ET (PDF1.2 ; Kariola et al., 2003). La laminarine (β -1,3 glucanes ; Ex : VacciPlant®) issue d'algues brunes (*Laminaria digitata*) confère une résistance à certains bioagresseurs en induisant des défenses de type protéines PR ou phytoalexines (Klarzynski et al., 2000 ; Aziz et al., 2003).

Des organismes vivants peuvent aussi contribuer à l'élicitation des défenses et constituer des agents de biocontrôle. Les champignons du genre *Trichoderma* font office d'exemple dans le domaine, dont certaines souches sont commercialisées (Ex : Bio-Trek T-22G® ; Wilson, 1997). La colonisation des racines par ces champignons protège la plante des agents pathogènes telluriques par compétition spatiale et nutritionnelle, et par production de composés antibiotiques. Mais ces champignons sont également des inducteurs de la SAR ou de l'ISR par reconnaissance de MAMPs lors de l'établissement de l'interaction, notamment les enzymes de dégradation de la paroi végétale (Nawrocka et al., 2013). Des agents de biocontrôle bactériens du genre *Pseudomonas* promeuvent également l'ISR (Weller, 2007), notamment via leur PAMPs, tels que les LPS (Leeman et al., 1995). Au sein de cette gamme d'agents de biocontrôle fongiques et bactériens, certaines souches peuvent aussi conférer une amélioration de croissance et du développement, leur conférant les propriétés doubles de biostimulant et de SDP (Stewart et Hill, 2014 ; David et al., 2018).

D'autres composés de nature minérale sont également capables de stimuler les défenses, comme le phosphonate de potassium par exemple (KHP ; Ex : Soriale® et LBG01F34®). Le KHP déclenche les défenses innées (Daniel et Guest, 2005), et potentialise l'expression des gènes impliqués dans la voie SA (Machinandiarena et al., 2012). Cependant, ce composé possède aussi des propriétés antifongiques, ce qui ne permet pas toujours d'évaluer la part des propriétés SDP dans la résistance observée contre les maladies fongiques (Ouimette et Coffey, 1989).



ASM



SA

Figure 1.2.2.1 : Représentation topologique de la formule chimique de l'ASM et du SA (Oostendorp et al., 2001).

1.2.2 Acibenzolar-S-methyl

L'acibenzolar-S-methyl (ASM ou BTH pour « S-methylbenzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothiate » ; Ex : Bion® 50WG) est l'une des matières actives élicitrices les plus étudiées. C'est un analogue fonctionnel du SA, qui active les défenses SA-dépendantes et déclenche la SAR (Figure 1.2.2.1). L'application d'ASM apporte une protection contre des bioagresseurs de plusieurs espèces cultivées, pouvant atteindre plus de 90 % (Vallad et Goodman, 2004). L'ASM induit une réponse similaire à l'application exogène de SA, puisqu'il rétablit l'induction des défenses SA-dépendantes dans des plantes transgéniques dégradant le SA endogène (NahG). De plus, l'ASM rétablit aussi les défenses dans des mutants *nim1* altérés dans la signalisation associée à la SAR (Lawton et al., 1996). Parmi les défenses SA-dépendantes induites par l'ASM, les protéines PR et les produits phénoliques sont rapportés dans une multitude d'espèces végétales (Mohan Babu et al., 2003 ; Baysal et al., 2005). De plus, l'induction de la SAR par l'ASM permet de potentialiser les défenses après le traitement (Beckers et Conrath, 2007), notamment chez le poirier (Faize et al., 2009).

L'ASM semble être actif *in planta* une fois déméthylé par la protéine SABP2 (« SA-binding protein 2 »), enzyme qui permet de déméthyliser naturellement le MeSA durant la SAR. En effet, l'ASM n'induit pas les défenses SA-dépendantes dans une plante ne produisant plus de SABP2, alors qu'une application de son dérivé déméthylé, l'acibenzolar, restaure cette capacité (Tripathi et al., 2010). Certains auteurs suggèrent que l'ASM est directement perçu par NPR1, même s'il est probable qu'il soit également perçu par d'autres senseurs similaires (Canet et al., 2010), puisqu'il existe une multitude de récepteurs du SA (Pokotylo et al., 2019). Certaines études sur la transmission du signal de défense montrent l'importance de certains acteurs de la signalisation SA dans les défenses ASM-dépendantes. La restriction du virus de la mosaïque du plantain asiatique par l'ASM n'est plus permise pour des mutants affectés dans la biosynthèse de NPR1, supposant un rôle à la fois dans la signalisation du SA et de l'ASM (Matsuo et al., 2019). Chez le riz, l'induction des défenses par l'ASM est compromise par des mutants altérés au niveau de WRKY75, ainsi que la résistance conférée à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Cependant, ce facteur de transcription induirait les défenses indépendamment de l'orthologue de NPR1 chez le riz (Shimono et al., 2007). Il s'avère qu'*in planta*, l'ASM est un inhibiteur de l'enzyme shikimate hydroxycinnamoyltransférase impliquée dans la biosynthèse de la lignine. Cependant, il est peu probable que cette inhibition impacte les défenses élicitées, puisque l'ASM n'est présent qu'en faible quantité par rapport à l'acibenzolar *in planta* (Negrel et al., 2021). Enfin, un changement du statut redox avec en particulier la production d'H₂O₂ pourrait être impliqué dans la signalisation de l'ASM. Divers travaux démontrent en effet l'inhibition de diverses d'enzymes antioxydantes telles que les catalases et ascorbates peroxidases (Wendehenne et al., 1998 ; van der Merwe et Dubery, 2006), ou encore l'activation de SOD, notamment chez la pomme (Cheng et al., 2020).

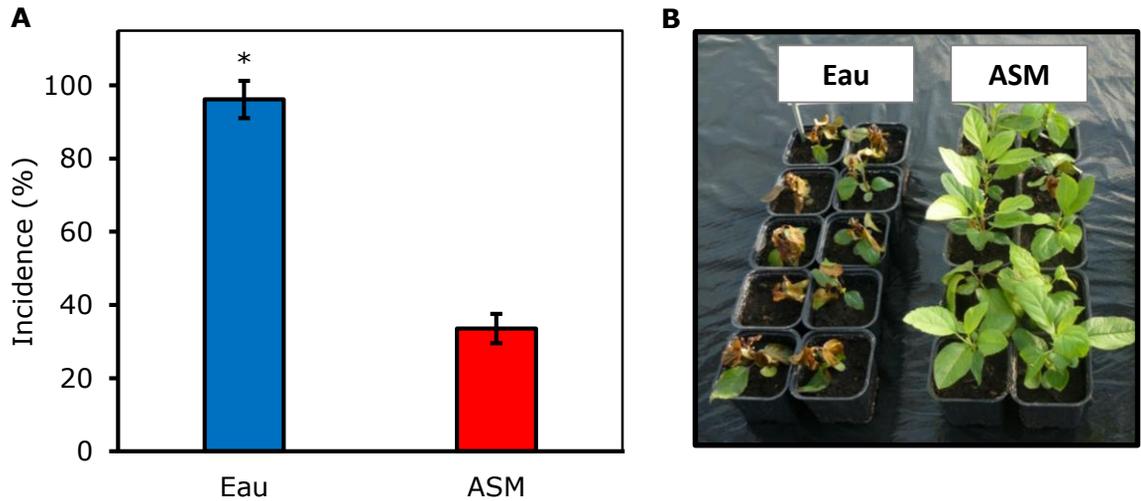


Figure 1.2.2.2 : Efficacité de protection de l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora*. L'application d'ASM sur des semis Golden Delicious diminue l'incidence du feu bactérien lorsque le traitement est effectué 3 jours avant l'inoculation (A). Cette efficacité de protection est évidente à l'œil nu (B). Les différences statistiques entre les traitements sont établies par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (* : $p < 0,05$).

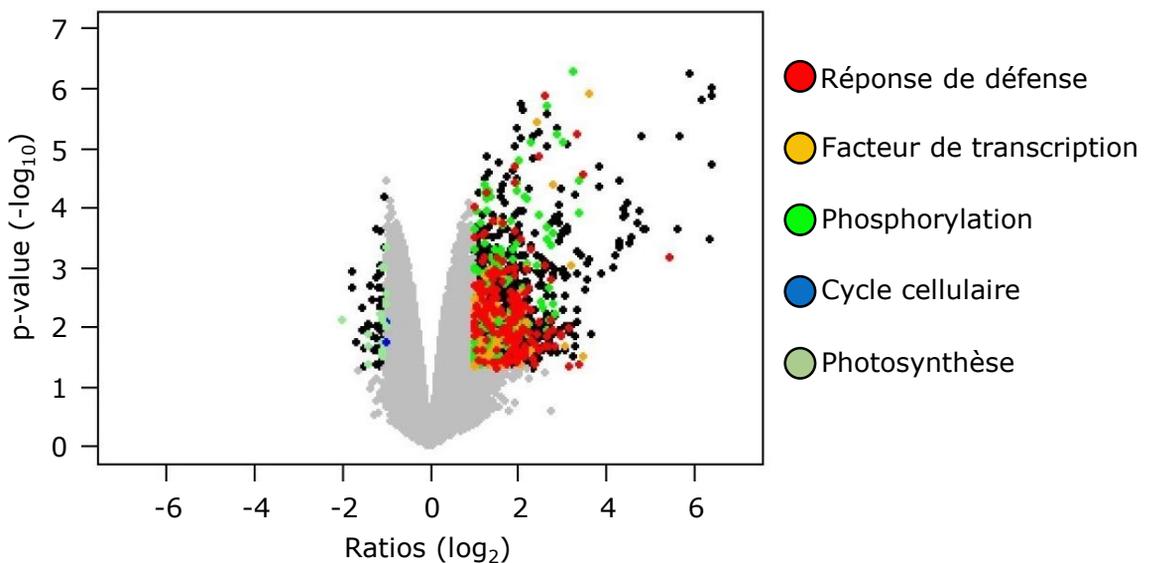


Figure 1.2.2.3 : Volcano plot représentant l'expression des gènes 3 jours après traitement à l'ASM par rapport à un traitement à l'eau dans des feuilles de semis Golden Delicious. Chaque point correspond à un gène dont certains appartiennent aux fonctions décrites dans la légende (Warneys et al., 2018).

L'ASM fait figure de SDP de référence pour le pommier, puisque ce composé induit une résistance significative vis-à-vis des 3 principaux problèmes phytosanitaires du pommier : le feu bactérien (Figure 1.2.2.2 ; Brisset et al., 2000 ; Maxson-Stein et al., 2002 ; Baysal et Zeller, 2004 ; Dugé de Bernonville et al., 2014 ; Aćimović et al., 2015 ; Marolleau et al., 2017), la tavelure (Bengtsson et al., 2009 ; Marolleau et al., 2017) et le puceron cendré (Warneys et al., 2018). L'ASM est connu pour activer des gènes de défense du pommier par la voie SA, notamment ceux codant pour des protéines PR (Brisset et al., 2000 ; Ziadi et al., 2001 ; Maxson-Stein et al., 2002 ; Dugé de Bernonville et al., 2014 ; Aćimović et al., 2015 ; Marolleau et al., 2017). Warneys et al., (2018) ont réalisé une analyse transcriptomique afin d'étudier la réponse pommier à l'ASM (Figure 1.2.2.3). Cette étude a révélé qu'une multitude de gènes liés aux défenses (y compris de nombreux homologues de PRR et des acteurs de la transduction des défenses de type MAPK) et de croissance sont respectivement induits et réprimés après traitement. Parmi les défenses aval induites, diverses protéines PR ont été identifiées mais l'analyse a révélé également d'autres effecteurs potentiellement impliqués dans la résistance, comme les agglutinines (MdAGG) qui font l'objet du premier chapitre de ce manuscrit, ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse de terpènes. Cette étude a ensuite démontré que l'un des composés volatiles organiques (COV) issus de cette dernière voie, le (E,E)- α -farnésène, a un effet répulsif contre le puceron, faisant de lui un candidat de la résistance du pommier contre ce ravageur.

1.2.3 Efficacité des SDP

L'immunité induite par les SDP est de moindre intensité que celle déclenchée par la relation R/avr traditionnellement utilisée en lutte génétique. Par exemple, sur 32 études montrant une efficacité de l'ASM en condition de culture, Vallad et Goodman ont recensé 28 études avec une protection extrêmement variable de 4 à 80% et 3 avec une protection de plus de 80% (Vallad et Goodman, 2004). Néanmoins, la résistance innée polygénique stimulée par les SDP a l'avantage d'être plus durable et à plus large spectre du fait des multiples acteurs défensifs déployés. En effet, la capacité évolutive des bioagresseurs à contourner les gènes de résistance monogéniques affecte la durabilité de ce moyen de lutte (Palloix et al., 2009). Romero et Ritchie (2004) montrent que l'application d'ASM réduit les populations de *X. axonopodis pv. vesicatoria* (*Xav*) capables de contourner les gènes R du poivron. Ainsi, les inducteurs de la SAR sont susceptibles d'améliorer la durabilité des résistances génétiques (Romero et Ritchie, 2004). De même, la variété des défenses induites par des SDP devrait limiter l'apparition de résistance chez les bioagresseurs, à l'inverse des pesticides (Hawkins et al., 2018).

Quelques travaux rapportent l'influence du génotype sur l'efficacité des SDP, suggérant que certains fonds génétiques sont plus inductibles que d'autres, sans forcément établir un lien

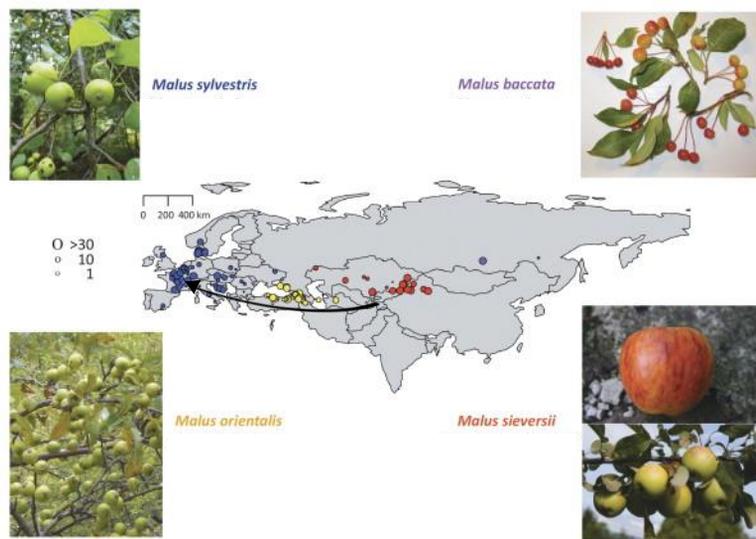


Figure 1.3.1 : Aire d'origine des espèces de *Malus* qui ont participé à l'histoire évolutive de *M. domestica* (Cornille et al., 2014).

avec le niveau de résistance (génétique) de la variété (Walters et al., 2005). Tous les cas de figures sont en effet observés selon les espèces et les bioagresseurs. La résistance induite du concombre (*Cucumis sativus*) contre l'oïdium est plus efficace pour les variétés présentant déjà une résistance partielle à cet agent pathogène (Hijwegen et Verhaar, 1995). Il en est de même chez le pommier, où la présence de QTL de résistance partielle à la tavelure améliore l'efficacité de protection de l'ASM (Benéjam et al., 2021). A l'inverse, il a été démontré dans d'autres pathosystèmes que ce sont des variétés plus sensibles que d'autres qui ont un meilleur gain de protection par l'ASM : c'est le cas de l'interaction soja/*Sclerotinia sclerotiorum* par exemple (Dann et al., 1998).

Dans la plupart des cas, les SDP montrent une efficacité moindre au champ qu'en conditions contrôlées. L'environnement auquel sont assujetties les plantes peut être un facteur de variabilité. Les facteurs abiotiques peuvent en effet affecter négativement ou positivement les défenses des plantes (Zarattini et al., 2021), et par déduction les défenses élicitées. Parmi ces facteurs, on peut citer la nutrition dont le rôle dans la résistance induite est complexe. Cette dernière représente d'une part un coût énergétique non négligeable pour la plante (Bolton, 2009) et une carence azotée par exemple, peut diminuer l'efficacité de SDP (Dietrich et al., 2004). Mais d'autre part, le statut azoté (et en particulier la balance $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) d'une plante peut favoriser ou non le bioagresseur, de même que le déploiement de défenses (Mur et al., 2017). L'autre grande source de variabilité de l'efficacité des SDP concernent les facteurs climatiques. Cependant, peu d'études s'intéressent à leur effet, alors que cette connaissance permettrait d'améliorer le positionnement des SDP dans les itinéraires de culture (Sandroni et al., 2020). Un chapitre de cette thèse est ainsi consacré à l'analyse de l'effet d'un stress de température sur l'efficacité de l'ASM sur pommier.

1.3 Cas particulier du pathosystème pommier-E. amylovora

1.3.1 Le pommier

Le pommier (*Malus domestica*) est une plante pérenne appartenant aux *Maloideae*, une sous-famille des Rosacées (Brown, 2012), dont les fruits consommables ont un fort intérêt économique, notamment pour ses 3 principaux producteurs, la Chine, les Etats-Unis et l'Europe respectivement 1^{er}, 2nd et 3^e sur le marché mondial. Le pommier est ainsi l'un des arbres les plus cultivés dans les zones tempérées du globe, et sa culture s'étend désormais dans les zones tropicales. *M. domestica* est originaire du Kazakhstan et a été initialement domestiqué à partir de pommiers sauvages *M. sieversii*. Sa diffusion à travers l'Europe s'est effectuée par la route de la Soie, le long de laquelle il subira des hybridations avec différentes espèces de pommier sauvage, *M. baccata*, *M. orientalis* et *M. sylvestris* (Figure 1.3.1 ; Cornille et al., 2014). Par la

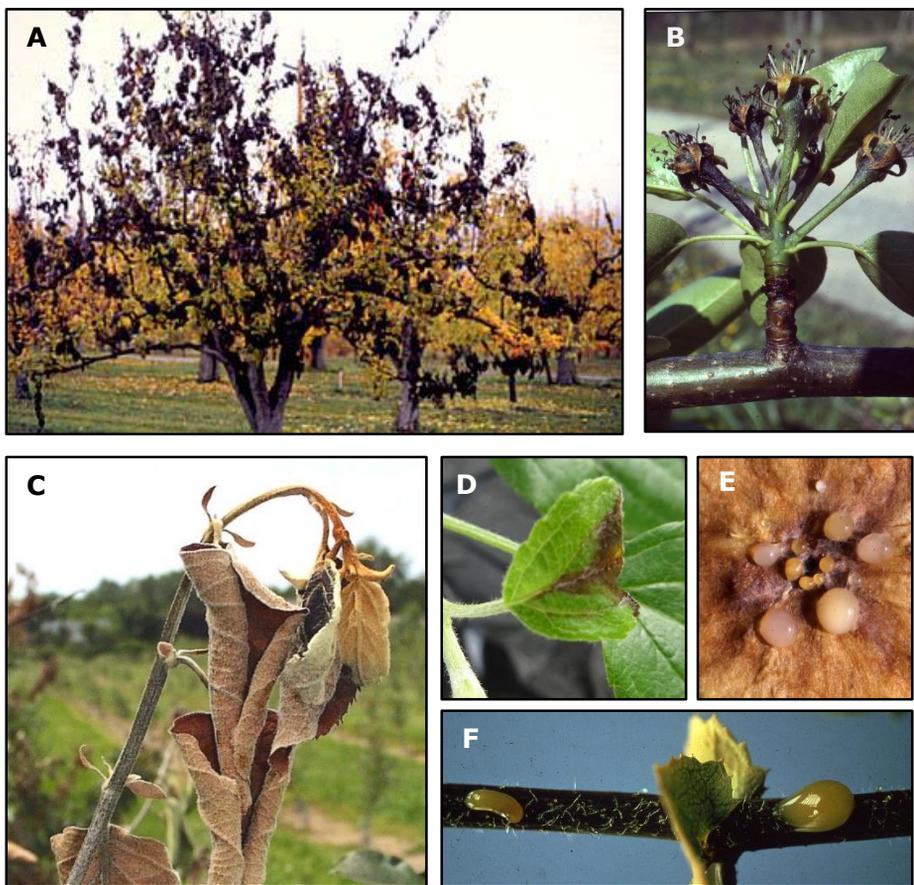


Figure 1.3.2.1 : Symptômes provoqués par le feu bactérien. Nécroses progressives atteignant un arbre en verger (A), visible au niveau des fleurs (B) et des jeunes pousses (C), notamment en passant par des blessures (D). Parmi les autres symptômes typiques de la maladie, la production d'exsudat composé de cellules bactériennes enveloppées dans un mucus polysaccharidique, ici présentée sur fruit (E) ou tige (F).

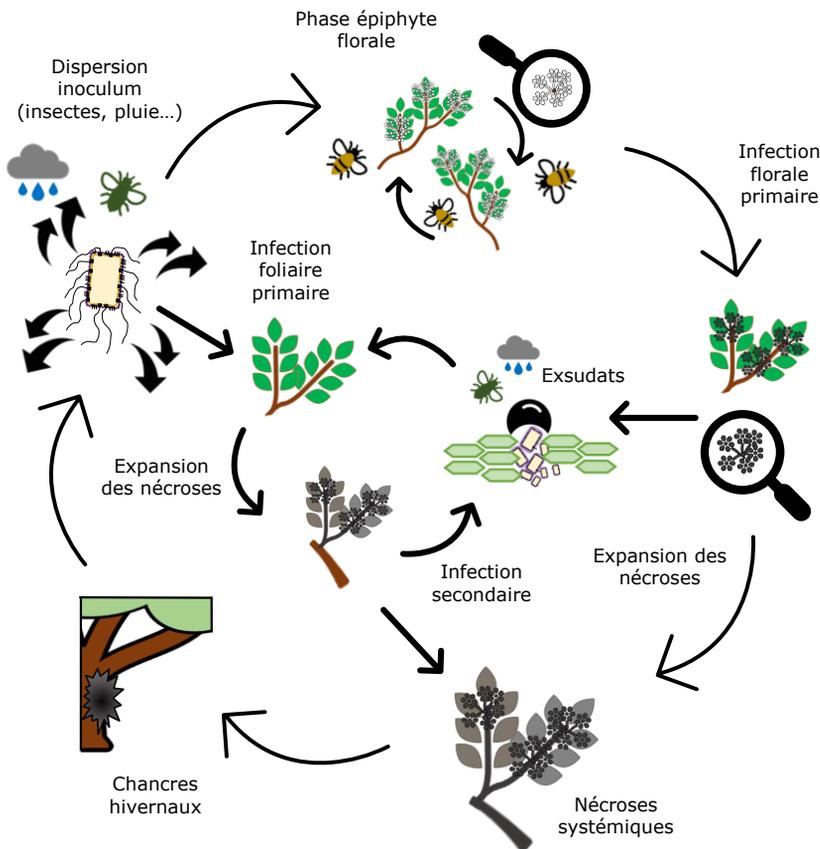


Figure 1.3.2.2 : Cycle du feu bactérien. La bactérie passe l'hiver au niveau de chancres pour ensuite proliférer au printemps avec le réchauffement des températures. L'inoculum se disperse ensuite par la pluie, le vent ou les insectes et infecte les jeunes organes *via* les ouvertures naturelles ou les blessures. La bactérie peut aussi se propager de manière épiphyte au niveau floral, à l'aide d'insectes pollinisateurs. La progression de la maladie peut rapidement entraîner la formation d'exsudats pouvant servir d'inoculum secondaire durant la même saison. A terme, les nécroses peuvent atteindre l'ensemble des organes touchés, et dans certains cas, l'arbre entier (Thompson, 2000).

suite, *M. domestica* fut sélectionné en faveur de caractères organoleptiques du fruit (couleur, fermeté, acidité, etc.), ce qui a considérablement réduit la diversité génétique des variétés de pommes à couteau ou à cidre destinées à la commercialisation (Migicovsky et al., 2021). Divers facteurs compliquent le travail de sélection : le pommier est en effet une espèce pérenne et ligneuse qui met plusieurs années à fleurir, et il présente une forte auto-incompatibilité et un degré d'hétérozygotie élevé. La propagation des variétés commercialisées est principalement réalisée de manière clonale, à l'aide de plants greffés (Cornille et al., 2014). La majorité de ces variétés sont généralement assez sensibles aux maladies, comme le feu bactérien ou la tavelure car elles ont été surtout sélectionnées pour leurs propriétés agronomiques et organoleptiques (Norelli et al., 2003).

1.3.2 Le feu bactérien

Le feu bactérien est la principale maladie bactérienne des *Maloideae*, causée par une bactérie nécrogène Gram négative de la famille des *Enterobacteriaceae*, *Erwinia amylovora*. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de nécroses évolutives à partir des jeunes pousses ou des fleurs, pouvant conduire à la mort de l'organe et à terme, à celle de l'arbre. Les symptômes typiques de la maladie sont caractérisés par un aspect brûlé et desséché des nécroses, par un recourbement en crosse des pousses atteintes et par l'apparition de gouttelettes d'exsudat polysaccharidique au niveau des tissus infectés correspondant à un mélange d'exopolysaccharides de surface (EPS) et de bactéries (Figure 1.3.2.1 ; Thomson, 2000 ; Norelli et al., 2003). Le feu bactérien est présent dans la majorité des pays producteurs. L'impact économique de cette maladie est difficilement chiffrable du fait de son caractère sporadique, mais celui-ci est estimé pour certaines années et pays à plusieurs dizaines de millions de dollars en additionnant les pertes et les coûts de lutte (Bonn et van der Zwet, 2000 ; Norelli et al., 2003). Le seul moyen de lutte réellement efficace est l'utilisation d'antibiotiques, mais seulement à court terme. En effet, l'apparition d'antibiorésistance, notamment à la streptomycine aux Etats-Unis, conduit à l'essoufflement de cette stratégie (Johnson et Stockwell, 2000 ; McManus et al., 2002). Dans les pays où les antibiotiques sont interdits comme la France, la lutte peut se faire à l'aide de composés cuivrés ou des produits de biocontrôle (SDP, bactéries antagonistes) dont l'efficacité n'est pas optimale (à noter que l'ASM n'est pas homologué sur pommier). Même si la réglementation s'est assouplie récemment, *E. amylovora* faisait encore partie de la liste des bactéries de quarantaine il y a peu, obligeant un contrôle strict des foyers épidémiques par l'arrachage des arbres infectés.

Le feu bactérien est une maladie qui apparaît au printemps, par la pénétration de la bactérie dans les jeunes tissus en pleine croissance ou les fleurs en empruntant les ouvertures naturelles et/ou les blessures (Figure 1.3.2.2). *E. amylovora* va coloniser l'apoplaste de la plante et nécroser les cellules adjacentes. La progression s'effectue de proche en proche, dans les tissus

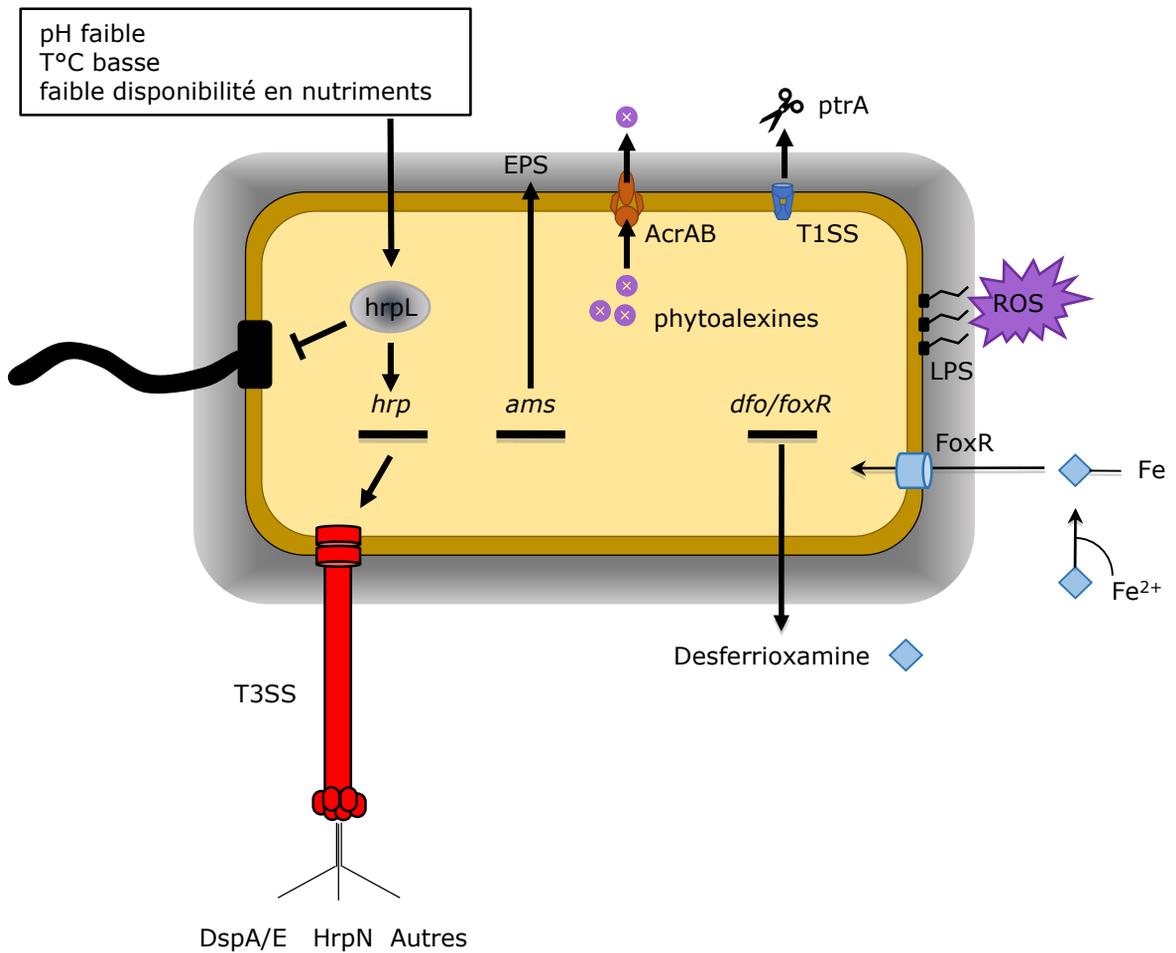


Figure 1.3.3.1 : Facteurs de virulence et d'agressivité d'*E. amylovora*.

parenchymateux accompagnant les vaisseaux conducteurs, au fur et à mesure que la bactérie se nourrit du contenu cytosolique déversé. Ces premières infections peuvent conduire à des contaminations secondaires, notamment par l'apparition d'exsudats bactériens qui pourront être dispersés par les insectes pollinisateurs ou les conditions météorologiques (vent, pluie, etc.). Les bactéries hivernent ensuite dans les tissus sous-corticaux, et forment des chancres. Au printemps suivant, l'élévation de la température sort les bactéries de leur dormance et provoque leur multiplication, se traduisant par des suintements d'exsudats. Ces exsudats constituent la source de l'inoculum primaire lorsqu'ils se dispersent par les mêmes phénomènes évoqués précédemment (Thompson, 2000 ; Van der Zwet et al., 2012).

1.3.3 Facteurs de virulence et d'agressivité

Le pouvoir pathogène d'*E. amylovora* est déterminé par deux acteurs majeurs de virulence : son T3SS et ses EPS (Figure 1.3.3.1). Néanmoins, bien que l'espèce soit très homogène (Zhao et Qi, 2011), certaines souches sont davantage agressives (Cabrefiga et Montesinos, 2005).

Le pouvoir pathogène d'*E. amylovora* repose essentiellement sur sa capacité à injecter des effecteurs protéiques au sein des cellules végétales par le biais de son T3SS. Les gènes régulant et codant le T3SS et ses effecteurs sont réunis dans un même cluster appelé *hrp-dsp* (Zhao et al., 2009). La régulation des gènes de ce cluster est affectée par les conditions de température, de pH et de nutriments (Wei et al., 1992). Le facteur sigma HrpL en est le régulateur positif majeur (Wei et al., 1995 ; McNally et al., 2012). C'est également un régulateur négatif du système flagellaire, suggérant que l'entrée de la bactérie dans l'apoplasme s'accompagne d'une perte de mobilité en faveur d'un système d'acquisition en nutriments (Cesbron et al., 2006). De nombreuses protéines régulatrices modulent l'activation de HrpL, indiquant que l'induction du cluster *hrp* est assez complexe (Kharadi et al., 2021).

Le nombre de protéines sécrétées est relativement faible (Nissinen et al., 2007) et comprend 5 effecteurs (DspA/E, Eop1, Eop3, Eop4 et HopPtoCEa), 2 harpines (HrpN et HrpW) ainsi que 3 autres protéines (Eop2, HrpJ et HrpK). Ces trois dernières protéines ainsi que HrpW sont susceptibles d'aider à la translocation des effecteurs mais peu d'informations sont disponibles à leur sujet (Yuan et al., 2020). Nous détaillerons ici la fonction putative ou avérée des 5 effecteurs et de HrpN :

- DspA/E est l'effecteur essentiel dans la pathogénicité (Bogdanove et al., 1998 ; Gaudriault et al., 1997), puisqu'il permet d'induire la mort cellulaire sur plante hôte. Cet effecteur est aussi impliqué dans la répression des défenses SA-dépendantes telles que le dépôt de callose et les protéines PR chez *A. thaliana* et le pommier (Boureau et al., 2006 ; Debroy et al., 2004 ; Degrave et al., 2013). Cette fonction n'est pas étonnante

- puisque DspA/E fait partie d'une famille d'effecteurs connue pour réprimer la PTI dans de nombreux pathosystèmes (Degrave et al., 2015). DspA/E présente des homologies avec le facteur d'avirulence AvrE de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) suggérant que cette protéine possède des propriétés d'avirulence (Bogdanove et al., 1998). Sa translocation nécessite une chaperonne DspB/F, pour éviter sa dégradation dans le cytoplasme bactérien (Gaudriault et al., 2002 ; Triplett et al., 2009 ; Oh et al., 2010).
- Eop1 (ou EopB) fait partie de la famille des effecteurs YopJ/Avr (Lewis et al., 2011 ; Staskawicz et al., 2001) et possède deux fonctions, une activité protéolytique et acétyltransférase (Yuan et al., 2020). Le plus proche homologue de Eop1 est HopZ3 de *P. syringae* (Bastedo et al., 2019), un effecteur participant à la suppression de l'ETI (Lee et al., 2015b ; Vinatzer et al., 2006). La fonction de Eop1 n'est pas encore déterminée, sachant que sa délétion n'affecte pas la virulence (Asselin et al., 2004).
 - Eop3 fait partie de la famille d'effecteurs avec une activité cystéine protéase HopX/AvrPhE de *P. syringae*, et des genres *Xanthomonas* et *Ralstonia*. La délétion de Eop3 n'affecte pas la pathogénicité, mais sa surexpression réduit le développement de la maladie, suggérant un rôle dans l'élicitation des défenses. Son homologue chez *P. syringae*, HopX1 (Bocsanczy et al., 2012), clive les protéines JAZ et active les défenses JA-dépendantes (Gimenez-Ibanez et al., 2014).
 - Eop4 (ou AvrRpt2_{Ea}) est un facteur d'agressivité très proche de AvrRpt2 de *Pst*, qui présente une activité cystéine protéase (Zhao et al., 2006). AvrRpt2 de *Pst* est impliqué dans la répression de la PTI, en jouant notamment sur la signalisation des auxines (Chen et al., 2007), sur les MAPK (Eschen-Lippold et al., 2016) et sur le clivage de RIN4 (Kim et al., 2005a). La protéine RIN4 (RPM1-interacting 4) constituerait la cible de virulence de AvrRpt2_{Pst} chez *A. thaliana* qui serait « gardée » par le récepteur RPS2. L'interaction RIN4/AvrRpt2_{Pst} modifierait l'état de RPS2 déclenchant ainsi des réactions de défense. La surexpression d'AvrRpt2_{Ea} dans les feuilles de pommier provoque des nécroses ainsi que l'accumulation du SA et l'induction de protéines PR et (Schröpfer et al., 2018). Son rôle dans une relation R/Avr chez le pommier a été mis en évidence chez *Malus × robusta* 5 (Mr5) et sera décrit dans le paragraphe suivant (Vogt et al., 2013).
 - HopPtoC_{Ea} présente une homologie avec HopPtoC_{Pst}. La délétion de HopPtoC_{Ea} n'affecte pas la virulence de la bactérie (Zhao et al., 2005). Bien que le rôle de son homologue HopPtoC ne soit pas très bien défini, ces deux effecteurs font partie d'une famille de protéases à cystéine qui interfèrent avec l'immunité de l'hôte (YopT ; Yuan et al., 2020).
 - HrpN est une harpine essentielle dans la virulence (Bocsanczy et al., 2008), puisqu'elle est potentiellement impliquée dans la formation de pores membranaires, comme déjà décrite pour son homologue HrpZ1 chez *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Engelhardt et al., 2009). HrpN permet la translocation d'effecteurs, notamment DspA/E, dans la cellule végétale (Bocsanczy et al., 2008 ; Boureau et al., 2011). Une délétion de HrpN réduit la capacité des mutants à induire une nécrose (Barny, 1995). Cet effecteur contribue indirectement ou directement à l'induction de la callose (Boureau et al., 2011). Une étude

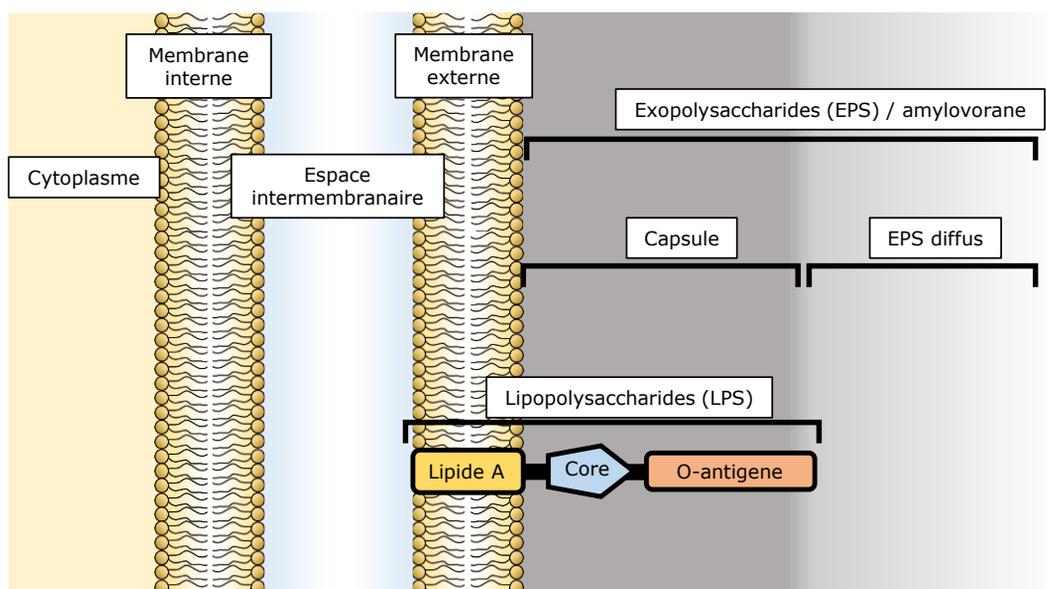


Figure 1.3.3.2 : Structures membranaires et polysaccharides de surface d'*E. amylovora*.

récente indique que HrpN est aussi susceptible de participer au stress oxydant généré par l'infection en s'associant au chloroplaste (Shahrestani et al., 2020).

Les EPS d'*E. amylovora* sont constitués de deux couches : une capsule accolée à sa membrane, et des EPS qui diffusent dans le milieu (Figure 1.3.3.2 ; Geider et al., 2000). La quantité d'EPS produite est corrélée avec l'état nutritionnel de la bactérie, qui s'entoure davantage d'EPS en milieu riche en nutriments (Belleman et al., 1994). Les EPS d'*E. amylovora* sont constitués de deux types de polysaccharides :

- L'amylovorane, majoritaire, est constituée d'unités répétées de 3 galactoses, d'une chaîne latérale d'acide glucuronique et d'un autre résidu galactose pyruvylé (Nimtz et al., 1996). La synthèse de l'amylovorane est gouvernée par le cluster *ams* regroupant 12 gènes (Bugert et Geider, 1995).
- Le levane, moins présent, est un homopolymère de résidus de fructose synthétisés par la levansucrase (Gross et al., 1992).

Les mutants déficients dans la synthèse d'amylovorane ne sont pas pathogènes (Steinberger et Beer, 1988 ; Bernhard et al., 1993) car incapables de coloniser les tissus à partir du site d'infection (Bogs et al., 1998). Les mutants ne produisant pas de levane sont, quant à eux, seulement affectés dans leur agressivité (Geier et Geider, 1993). Ainsi l'amylovorane constitue un facteur de virulence probablement passif, en protégeant la bactérie de la dessiccation, du changement de salinité (Geider, 2000 ; Geider, 2009) et des produits toxiques comme le cuivre (Bereswill et al., 1998 ; Ordax et al., 2010).

E. amylovora possède d'autres facteurs d'agressivité. Une des caractéristiques de la bactérie est d'induire un burst oxydant dans les interactions hôte et non-hôte (Venisse et al., 2001). Comme toutes les bactéries Gram négative, sa membrane externe comporte des LPS qui lui permettent de mieux tolérer les ROS (Berry et al., 2009). La bactérie possède également un système d'acquisition du fer qui lui permet de survivre dans les milieux relativement pauvres en cet élément indispensable, comme l'apoplaste. Ce système d'acquisition du fer est composé d'un sidérophore, la desferrioxamine (DFO) qui est excrétée dans le milieu et se lie au Fe^{3+} pour former la ferrioxamine, ré-absorbée par la bactérie par le récepteur FoxR. En plus de son rôle dans l'acquisition du fer, la DFO est aussi impliquée dans la production et la tolérance des ROS (Dellagi et al., 1998 ; Venisse et al., 2003). Les mutants ne disposant plus de DFO ou de FoxR sont moins agressifs. *E. amylovora* dispose également d'un système de détoxification des phytoalexines qui contribue à son agressivité. Il s'agit d'une pompe à efflux AcrAB transmembranaire, capable d'exporter du cytoplasme des phytoalexines antimicrobiennes du pommier (Burse et al., 2004). Elle est enfin capable de libérer dans le milieu des protéases via son système de sécrétion de type I. Parmi celles-ci, Zhang et al. (1999a) ont identifié la métalloprotéase ptrA dont la délétion réduit la colonisation de l'hôte par la bactérie.

1.3.4 Sensibilité et résistance au feu bactérien

1.3.4.1 QTL de résistance à *Erwinia amylovora*

La plupart des variétés cultivées sont relativement sensibles au feu bactérien. Néanmoins certaines variétés montrent une résistance modérée (Kostick et al., 2019), voire totale, caractérisée par une réponse HR (Iakimova et al., 2013). Des études génétiques ont identifié des QTLs Gaudriault n'expliquant pour l'instant qu'une faible part de la variation phénotypique ($\leq 20\%$) excepté un QTL expliquant de 30 à 50% de la variation (Calenge et al., 2005 ; Khan et al., 2006).

Certaines espèces sauvages ou ornementales du genre *Malus* possèdent des résistances génétiques fortes qui font l'objet d'études approfondies pour une intégration éventuelle dans les programmes de sélection. Ainsi des QTLs majeurs ont été cartographiés dans différents génotypes (*M. robusta* 5, Evereste, *M. floribonda* 821, *M. fusca*) (Peil et al., 2020). Une cartographie fine du QTL de résistance de *M. robusta* 5 a permis de mettre en évidence un gène R candidat codant pour un récepteur NLR (FB_MR5 ; Fahrentrapp et al., 2013), validé par introgression dans la variété Gala (Broggini et al., 2014). Une potentielle relation R/avr est identifiée pour FB_MR5 qui reconnaît l'effecteur AvrRpt2_{Ea}, une mutation de ce dernier entraînant un contournement de la résistance (Broggini et al., 2014 ; Vogt et al., 2013). De même, une cartographie ciblée sur le QTL du génotype Evereste a permis d'identifier plusieurs récepteurs NLR (Parravicini et al., 2011). La mutation de Eop1 rétablit la pathogénicité d'une souche avirulente chez Evereste, suggérant de nouveau une relation R/avr (Wöhner et al., 2018).

1.3.4.2 Les défenses du pommier face à *E. amylovora*

De nombreux travaux ont porté sur l'identification des mécanismes de défenses du pommier capables de contrôler *E. amylovora*, mais restent à ce jour peu connus et présentent plusieurs éléments contradictoires. La plupart des études ont comparé la réponse de génotypes sensibles à celle de génotypes résistants à l'infection. Au niveau de la signalisation hormonale, le génotype sensible MM106 et le résistant Evereste accumulent tous deux du SA dans les feuilles quelques heures après l'infection, mais seul le génotype résistant accumule du JA. Ce phénomène a été observé *via* la répression des gènes de la voie JA (*PLD1*, *LOX13*, *COI1*, *JAR1* et *JMT*) observée chez le génotype sensible, et de manière T3SS-dépendante (Dugé de Bernonville et al., 2012). Venisse et al. (2002) ont montré une induction similaire de certains gènes *PR* (*PR-2*, 3 et 5) dans ces mêmes deux génotypes au cours de l'infection. L'induction de gènes *PR* (*PR-2*, 3 et 8) a également été observée dans la variété sensible Gala (Bonasera et

al., 2006). Ainsi d'après ces données, la voie SA ne semble pas contribuer à la résistance bien qu'elle soit activée après infection. Ceci est en apparence contradiction avec la capacité de l'ASM à protéger le pommier contre le feu bactérien, étant un analogue fonctionnel du SA induisant la SAR (voir §1.2.2). Par ailleurs, d'autres études sont contradictoires avec l'induction similaire des gènes *PR* entre résistants et sensibles, notamment la comparaison entre Idared (sensible) et Free Redstar (résistant) qui rapporte une induction du gène *PR-2* uniquement chez ce dernier, après infection (Markiewicz et Michalczyk, 2015). Récemment, une analyse réalisée sur le génotype *M. robusta* 5 inoculé par une souche sauvage ou par le mutant avirulent AvrRpt2_{EA} a permis de comparer le transcriptome d'un même génotype dans une situation de sensibilité et de résistance (Schröpfer et al., 2021). Cette étude identifie notamment une série de gènes associés à la réponse au stress chaleur (gènes *hsp*, « heat shock protein ») surexprimés en situation de sensibilité, et à l'inverse une série de gènes du métabolisme secondaire (*DFR*, *TPS*, *CYP450*) surexprimés en situation de résistance.

Des analyses ciblées ont déjà mis en évidence un rôle potentiel du métabolisme secondaire dans la résistance du pommier à *E. amylovora*. Chez le pommier, les phénylpropanoïdes et les terpénoïdes représentent les composés secondaires majoritaires. Plusieurs travaux ont montré une répression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (*CHS*, *DFR*, *FLS*, etc.) dans un génotype sensible après infection (Venisse et al., 2002 ; Pontais et al., 2008). Le pommier contient naturellement une quantité très élevée de dihydrochalcones (DHC, flavonoïdes) dans ses feuilles, pouvant constituer de 10 à 20 % de la matière sèche. Ces composés possèdent des propriétés antioxydantes susceptibles de protéger la plante du stress oxydant induit par *E. amylovora*, des propriétés antimicrobiennes à large spectre et des propriétés de chélation du fer, essentiel à la bactérie (Gaucher et al., 2013a). Cependant, le stock constitutif de DHC est similaire entre génotypes sensibles et résistants (Dugé de Bernonville et al., 2011), mais la capacité du pommier à transformer enzymatiquement ces composés après infection diffère selon sa sensibilité (Gaucher et al., 2013b). Cette transformation différentielle aboutit à la production massive de produits d'oxydation pour le génotype résistant, à très forte activité bactéricide, contrairement au génotype sensible. D'autres phytoalexines de la voie des phénylpropanoïdes (biphényles et dibenzofuranes) ont été identifiées au niveau de la tige du pommier après infection, dans la zone de transition tissus nécrosés/tissus sains (Chizzali et al., 2012). La présence de ces composés est corrélée avec l'induction d'une biphényl synthase (*MdBIS3*) qui s'exprime essentiellement dans la tige (Chizzali et al., 2011).

Les effecteurs de défense découverts ne sont pas exclusivement des métabolites, mais peuvent être de nature protéique. Romeiro et al. (1981b) ont isolé une fraction protéique contenant une lectine capable d'agglutiner *E. amylovora* de manière EPS-dépendante. Ce facteur agglutinant, appelé « maline » et issu de graines et de feuilles de la variété *Malus sylvestris* X *ranetka* et Red Delicious respectivement, est capable d'agglutiner les souches dépourvues d'EPS.

Les propriétés agglutinantes de cette protéine semblent s'amoinrir avec un ajout croissant d'EPS purifié. Ces résultats suggèrent que la bactérie se protège de l'agglutination par la production d'EPS. Par ailleurs, la maline se lierait spécifiquement à la région core des LPS, expliquant l'agglutination observée chez les bactéries non capsulées. Malheureusement à l'époque, la maline n'a pas été clairement identifiée au sein de la fraction protéique isolée (Romeiro et al., 1981a, b). Le chapitre suivant va s'intéresser au lien possible entre ce facteur agglutinant et les agglutinines (MdAGGs) identifiées après traitement de pommier à l'ASM (Warneys et al., 2018) et évoquées plus haut.

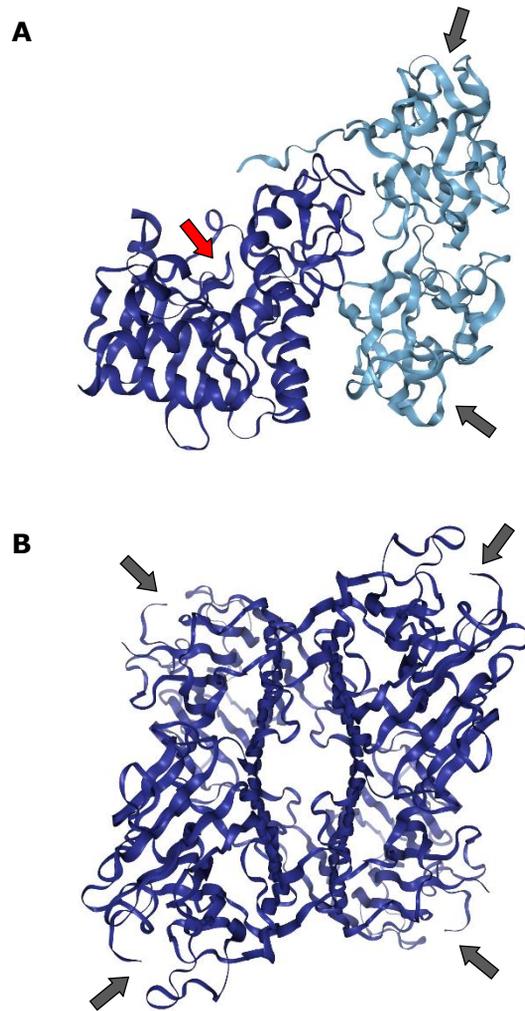


Figure 2.1.1 : Structure de la ricine (Rutenber et al., 1991 ; A) et de la ConA (Hardman et al., 1972 ; B) respectivement à une résolution 2,5 et 2,4 Å. Les sites de reconnaissance des carbohydrates sont indiqués avec des flèches grises et le site actif du domaine RIP de la ricine avec une flèche rouge. (A) Le domaine RIP est coloré en bleu foncé et le domaine lectine en bleu clair. (B) Chaque domaine lectine est coloré en bleu foncé. Les images sont issues de PDB ID: 2AAI pour la ricine et ID: 3CNA pour la ConA (Herman et al., 2000), et NGL Viewer (Rose et al., 2018).

2 Caractérisation d'un nouveau facteur de résistance induit par l'ASM, les MdAGGs

2.1 Généralités sur les lectines végétales

2.1.1 Historique et définition des lectines

Les lectines regroupent une large famille de protéines présentes dans diverses espèces (virus, champignons, bactéries, algues, plantes, animaux ; Perez et al., 2015) et caractérisées par leur propriété de fixation aux carbohydrates (ou saccharides) de manière réversible, avec au moins un domaine non-catalytique (Peumans et Van Damme, 1995). La première lectine découverte, la ricine, fut identifiée par Stillmark en 1888 à partir de graines de ricin commun (*Ricinus communis*). Ce dernier met en évidence la propriété d'hémagglutination de la ricine (Stillmark, 1888), qu'il attribua à tort à sa nocivité. En réalité, c'est un domaine enzymatique inactivant les ribosomes (RIP pour « Ribosome-Inactivating Protein ») qui lui confère sa toxicité pour les cellules eukaryotes en altérant la synthèse protéique. Le domaine RIP est associé par un pont disulfure à un domaine lectine qui possède deux sites de fixation au galactose lui permettant de se fixer sur les membranes cellulaires et ainsi d'agglutiner par exemple des hématies (Figure 2.1.1A ; Polito et al., 2019).

D'autres lectines, toxiques ou non, furent ensuite découvertes chez d'autres espèces telles que les légumineuses, notamment en mettant en évidence leur propriété d'hémagglutination (Tsaneva et Van Damme, 2020), critère communément utilisé pour identifier des lectines. L'une des lectines les plus étudiées et utilisées, la Concanavaline A (ConA ; Cavada et al., 2019), a été purifiée la première fois en 1919 à partir de graines de pois sabre blanc (*Canavalia ensiformis* ; Sumner, 1919). La ConA fut la première lectine dont la séquence a été déterminée et dont la structure tridimensionnelle a été résolue, révélant un homotétramère avec un site de fixation au mannose et au glucose à chacune de ses sous-unités (Figure 2.1.1B ; Edelman et al., 1972 ; Hardman et Ainsworth, 1972). Cependant, la spécificité de fixation des lectines à certains carbohydrates fut démontrée à partir de 1952, en inhibant l'hémagglutination par l'adjonction de différents saccharides (Watkins et Morgan, 1952).

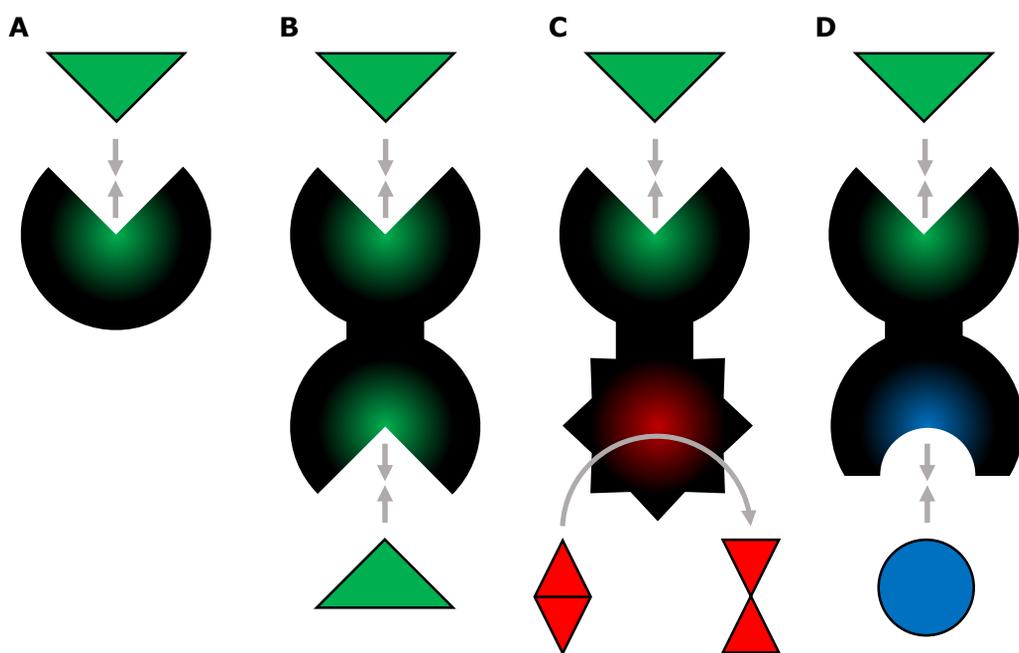


Figure 2.1.2.1 : Schéma des structures des mérolectines (A), des hololectines (B), des chimérolectines (C) et des superlectines (D). Les triangles verts et le rond bleu représentent respectivement des carbohydrates différents interagissant avec les sites de fixation des lectines. Les changements de conformation des triangles rouges représentent une activité catalytique (Peumans et Van Damme, 1995).

Le terme agglutinine, introduit 10 ans après la découverte de la ricine (Elfstrand, 1898), désigne les lectines capables d'agglutination cellulaire. Ainsi, on peut considérer que les agglutinines sont des lectines ou des multimères de lectines possédant au moins deux sites de fixation aux carbohydrates présents à la surface des cellules eucaryotes ou procaryotes. Elles excluent donc les lectines monomériques ne possédant qu'un seul site de fixation (Van Damme et al., 1998).

Au cours de l'histoire, l'étude des lectines a apporté des avancées majeures dans le domaine médical telles que la découverte d'une mémoire immunitaire spécifique à un antigène ou de leur utilité pour identifier les groupes sanguins. A l'heure actuelle, elles fournissent une large applicabilité, que ce soit sous forme de médicaments (anticancéreux, anti-infectieux, etc.) ou comme outils en glycobiologie (chromatographie d'affinité, lectinohistochimie, etc. ; Tsaneva et Van Damme, 2020).

2.1.2 Classification des lectines végétales

Les lectines regroupent une large famille de protéines avec une forte diversité et réparties dans différents règnes du vivant. Certaines lectines spécifiques d'un même saccharide ou avec la même fonction au sein d'un organisme peuvent être structurellement différentes, ce qui complexifie leur classification. Néanmoins, chez les végétaux, elles peuvent être regroupées selon (i) le nombre et la spécificité de leur site de fixation, (ii) leur séquence nucléotidique et leur structure tertiaire et (iii) leur localisation et leur caractère inductible en réponse à certains stress (Tsaneva et Van Damme, 2020).

2.1.2.1 Classification selon le nombre de sites de fixation et leur spécificité

Les lectines peuvent être subdivisées en 4 catégories selon le nombre et la spécificité des sites de fixation aux carbohydrates : les mérolectines, les hololectines, les chimérolectines et les superlectines (Figure 2.1.2.1). Les mérolectines sont constituées d'un seul site de fixation et sont donc théoriquement incapables d'agglutiner les cellules. Néanmoins, cette absence de propriété agglutinante a parfois été contestée : c'est le cas de l'hévéine (allergène majeur du latex de l'arbre à caoutchouc) pour laquelle une capacité d'hémagglutination a été démontrée (Rodríguez-Romero et al., 1991). Les hololectines disposent d'au moins deux sites de fixation, tous capables de se lier au même type de saccharides. C'est l'une des catégories les plus représentées et étudiées du fait de leur propriété agglutinante (Van Damme et al., 1998). On y trouve la plupart des lectines présentes chez les légumineuses telle que la ConA (Loris et al., 1998). Les chimérolectines correspondent à des structures chimériques avec au moins un domaine lectine et un ou plusieurs autres domaines protéiques (Van Damme et al., 1998). On y classe la ricine ainsi que certaines protéines PR appartenant à la famille des chitinases. Ces

Tableau 2.1.2.2: Ligands, localisation et structure des 12 familles de lectines classées selon leur séquence et leur structure tridimensionnelle. Glc, Glucose ; GlcNac, N-acétylglucosamine ; Gal, Galactose ; GalNac, N-acétylgalactosamine ; Man, Mannose ; ND, non-déterminé (Tsaneva et Van Damme, 2020).

Famille du domaine lectine	Ligands saccharidiques	Localisation cellulaire	Structure tridimensionnelle du domaine lectine
ABAg	GlcNac / GalNac / Gal, antigène-T	Noyau / cytoplasme	Sandwich β
Amaranthines	GalNac / antigène T	Noyau / cytoplasme	Trèfle β
CRA	N-glycanes riches en Man	Vacuole / liées à la membrane	Tonneau TIM
Cyanovorines	Man / N-glycanes riches en Man	Noyau	Feuillet β triple brin et ruban β
EUL	Galactosides / N-glycanes riches en Man	Noyau / cytoplasme	ND (le modèle suggère un repliement similaire au trèfle β des ricines-B)
GNA	Man / mannane-oligosaccharides / N-glycanes riches en Man	Vacuole / noyau / cytoplasme	Prisme β
Hévéines	Chitines / (GlcNac) _n / acide sialique	Vacuole	Motif structural commun de 30-43 résidus, riche en glycine et cystéine à des positions conservés, organisé autour d'un noyau à quatre disulfures
Jacalines	Man / N-glycanes complexes ou non riches en Man ou Gal	Vacuole / noyau / cytoplasme	Prisme β
Lectines des légumineuses	Man / Glc / Gal / GalNac / (GlcNac) _n / fucose / acide sialique / N-glycanes complexes et riches en Man	Vacuole / noyau / cytoplasme / liées à la membrane	Sandwich β
LysM	Chitine / (GlcNac) _n / peptidoglycane	Vacuole / noyau / cytoplasme / liées à la membrane	Structure β - α - α - β
Nictaba	(GlcNac) _n / N-glycanes complexes et riches en Man	Noyau / cytoplasme	ND (le modèle suggère une structure sandwich β composée de 2 feuillets β)
Ricines-B	Gal / GalNac / Gal ou GalNac salylé	Vacuole / noyau / cytoplasme	Trèfle β

dernières possèdent en effet un domaine lectine reconnaissant la chitine et un domaine hydrolase (Raikhel et al., 1993). Les superlectines sont constituées de plusieurs domaines lectines se fixant pour chacun à des types de carbohydrates distincts (Van Damme et al., 1998).

2.1.2.2 Classification selon leur séquence nucléotidique et leur structure tertiaire

A l'heure actuelle, les données de séquençage permettent d'identifier 12 familles de lectines différenciables de par leur séquence et leur structure tridimensionnelle (Tableau 2.1.2.2). Chaque famille porte le nom de sa lectine la plus étudiée : les agglutinines analogues à celle identifiée chez *Agaricus bisporus* (ABA_g pour « *Agaricus bisporus* agglutinin »), les amaranthines, les agglutinines analogues aux chitinases de classe V (CRA pour « Class V chitinase-related agglutinin »), les cyanovirines, les lectines analogues à celle identifiée chez *Euonymus europaeus* (EUL pour « *Euonymus europaeus* lectin »), les agglutinines analogues à celle identifiée chez *Galanthus nivalis* (GNA pour « *Galanthus nivalis* agglutinin »), les hévéines, les analogues à la jacaline (jacalines), les lectines des légumineuses, les lectines à motifs lysines (LysM pour « lysine motif »), les agglutinines analogues à celle identifiée chez *Nicotiana tabacum* (Nictaba) et les ricines-B (Van Damme et al., 2008). Cependant, la conformation tridimensionnelle du domaine lectine n'a été résolue que pour 10 familles seulement. Les deux familles restantes, EUL et Nictaba, regroupent des lectines similaires au niveau de leur séquence et de leur modèle structural obtenu *in silico*. De manière surprenante, le repliement du site de fixation aux carbohydrates n'est pas lié à leur spécificité (Tsaneva et Van Damme, 2020). La plupart de ces familles sont représentées dans plusieurs règnes du vivant mais certaines, telles que les EUL et les amaranthines, sont exclusives aux plantes puisque d'un point de vue évolutif, leur apparition semble corrélée à celle des stomates ou des plantes vasculaires (Van Holle et Van Damme, 2019).

2.1.2.3 Classification selon leur localisation et leur inductibilité

Les premières lectines furent découvertes en abondance dans les graines et autres organes de stockage (bulbes, rhizomes, etc.), facilitant leur détection et leur purification. Ces lectines sont dites « classiques » à l'opposé des lectines dites « inductibles », découvertes plus tardivement de par leur nature à être exprimées seulement en réponse à un stress dans les organes végétatifs (tiges, feuilles et racines) ou les fleurs. En effet, les lectines « inductibles » sont rares et difficilement détectables dans les conditions normales de croissance. Outre leur localisation tissulaire, ces deux classes de lectines se différencient aussi au niveau de leur biosynthèse et de leur localisation intracellulaire. En général, les lectines « classiques » sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique avec un peptide signal qui les adressera vers les vacuoles, la paroi ou l'apoplasme, alors que les lectines « inductibles » sont produites

et localisées dans le cytoplasme ou transférées au noyau (Van Damme et al., 2008 ; Tsaneva et Van Damme, 2020).

2.1.3 Fonction des lectines chez les plantes

Les lectines semblent impliquées dans divers processus de développement ou de réponse aux stress mais leur rôle n'est pas clairement démontré pour la plupart. Certaines lectines auraient plusieurs rôles, qui peuvent changer selon leur localisation, le stade physiologique ou l'intervention de facteurs *ex planta*. (Rüdiger, 1998 ; Rüdiger et Gabius, 2001). Les fonctions les plus décrites dans la littérature sont leur implication (i) dans le stockage protéique, (ii) en tant que senseur cellulaire, (iii) dans la symbiose racinaire et (iv) dans les défenses.

2.1.3.1 Rôle lié au stockage protéique

Chez les végétaux, la plupart des lectines ne semblent pas disposer de sites de fixation spécifiques à des carbohydrates endogènes. De plus, une majorité des lectines exprimées constitutivement sont stockées dans la vacuole, ce qui ne les prédisposent pas à une interaction avec les saccharides présents dans les autres compartiments cellulaires (Van Damme et al., 2004). Néanmoins, leur abondance dans les graines et leur dégradation au moment de la germination suggèrent un rôle passif de stockage de protéines (Rüdiger, 1998 ; Rüdiger et Gabius, 2001), même si leur dégradation est moins rapide que celle d'autres protéines de stockage (Gifford et al., 1983 ; Moreira et Gavada, 1984 ; Boisseau et al., 1985). D'ailleurs, l'une des protéines de stockage majoritaire des graines des légumineuses, la viciline, possède toutes les caractéristiques d'une lectine (Ribeiro et al., 2014). De plus, pendant la maturation des graines de pois, la viciline et d'autres lectines sont accumulées avec d'autres protéines de stockage selon un ordre chronologique bien déterminé (Wenzel et al., 1993). Les lectines et des fractions de protéines de stockage se situant dans le même compartiment cellulaire peuvent interagir entre elles (Einhoff et Rüdiger, 1986 ; Freier et Rüdiger, 1987 ; Wenzel et Rüdiger, 1995), ce qui conduit certains auteurs à émettre l'hypothèse que les lectines sont impliquées dans le dépôt ordonné des protéines de stockage (Einhoff et al., 1986 ; Yang et Tang, 1993 ; Spilatro et al., 1996).

2.1.3.2 Rôle de senseur cellulaire

Les récepteurs lectines de type kinase (LecRLKs pour « lectin receptor-like kinases ») représentent une classe particulière de lectines largement répandue chez les plantes. Ils regroupent des senseurs cellulaires liés au développement et aux réponses aux contextes biotique et abiotique. Les LecRLKs sont composés d'un domaine kinase intracellulaire, d'un

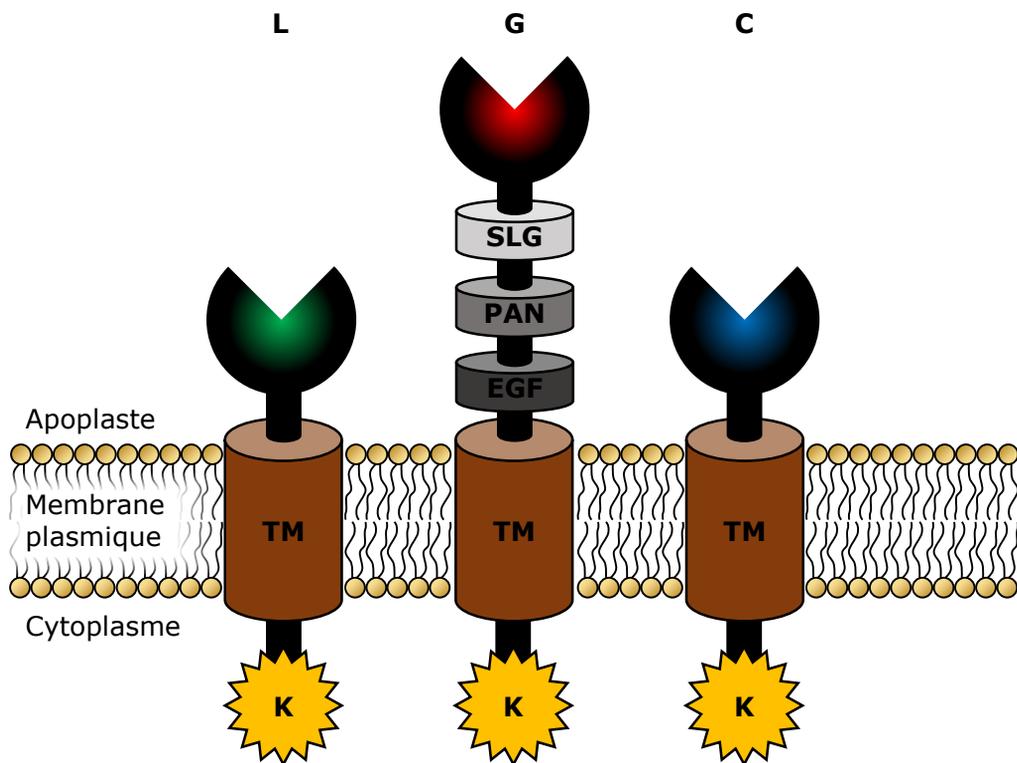


Figure 2.1.3.2 : Schéma des structures des 3 différentes catégories de LecRLKs: type L, G et C. Ce classement est basé sur leur domaine extracellulaire associé à un domaine transmembranaire (TM), lui-même associé à un domaine kinase (K) intracellulaire. Les types L disposent d'un domaine homologue aux lectines des légumineuses, en vert. Les types G disposent d'un domaine bulbe lectine s'associant à l' α -mannose, en rouge, d'un domaine glycoprotéique du locus S (SLG pour « S-locus glycoprotein domain »), d'un domaine plasminogène/pommier/nématode (PAN pour « plasminogen/apple/nematode ») et/ou d'un domaine de facteur de croissance épidermique (EGF pour « Epidermal Growth Factor »). Les types C disposent d'un domaine lectine calcium-dépendant, en bleu (Sun et al., 2020).

domaine transmembranaire et d'un domaine lectine extracellulaire. Selon leur domaine extracellulaire, les LecRLKs sont subdivisés en trois typologies : L, G et C (Figure 2.1.3.2). Leur rôle dans les défenses est le plus décrit dans la littérature (Vaid et al., 2013 ; Sun et al., 2020b). Le domaine lectine de certains LecRLKs est capable de se fixer aux carbohydrates situés à la surface des bactéries et champignons pathogènes, reconnus alors comme des PAMPs pour déclencher la PTI (Singh et al., 2013 ; Huang et al., 2014 ; Wang et al., 2016c ; Wang et al., 2017 ; Yekondi et al., 2017) et la SAR (Luo et al., 2017 ; Wang et al., 2019a). L'implication des LecRLKs dans les défenses semble aussi s'étendre à l'ETI et la HR (Kanzaki et al., 2008) et certains récepteurs seraient des cibles potentielles d'effecteurs de type III pour contourner la résistance (ETS ; Bouwmeester et al., 2011). Des LecRLKs sont aussi impliqués dans l'éllicitation des défenses spécifiques contre certains insectes, par la perception de leurs oeufs lors de l'oviposition (Gouhier-Darimont et al., 2019) ou des sécrétions orales d'un phytophage s'alimentant sur la plante (Gilardoni et al., 2011). Les LecRLKs participent aussi à l'établissement des interactions symbiotiques entre les racines et les microorganismes non pathogènes (Vaid et al., 2013 ; Sun et al., 2020b) comme les champignons mycorrhiziens (Labbé et al., 2019) ou certaines bactéries du genre *Rhizobium* (Limpens et al., 2003 ; Navarro-Gochicoa et al., 2003 ; Radutoiu et al., 2003). Outre leur implication dans les relations biotiques, les LecRLKs jouent aussi un rôle de senseur de stress abiotiques, notamment la salinité (Vaid et al., 2013 ; Sun et al., 2020b). Les LecRLKs sont impliqués dans la tolérance aux stress salins en déclenchant des mécanismes de régulation de l'homéostasie cellulaire (extrusion/séquestration des ions Na⁺) et des ROS (Li et al., 2014 ; Vaid et al., 2015 ; Sun et al., 2018 ; Passricha et al., 2019a, b). Elles auraient également un rôle dans le développement, notamment dans les processus de germination (Xin et al., 2008 ; Cheng et al., 2013b), d'organisation de l'architecture (Sun et al., 2018), de composition des grains (Zha et al., 2009), de sénescence (Chen et al., 2013) et de fertilité du pollen (Peng et al., 2020).

2.1.3.3 Rôle dans les symbioses racinaires

La majorité des plantes sont en symbiose racinaire avec des champignons mycorrhiziens, qui leur assurent une meilleure absorption en eau et nutriments en échange de sucres issus de la photosynthèse (Bonfante et Genre, 2010). Les champignons mycorrhiziens peuvent stimuler l'induction de lectines pour favoriser l'interaction (Frenzel et al., 2005 ; Frenzel et al., 2006). L'établissement des relations symbiotiques nécessite une reconnaissance spécifique entre les deux partenaires. Chez le peuplier (*Populus sp.*), l'interaction avec le champignon *Laccaria bicolor* s'établit préférentiellement avec *P. trichocarpa* plutôt qu'avec *P. deltoides* grâce à un récepteur LecRLK de type G présent chez *P. trichocarpa* (Labbé et al., 2019). Chez les légumineuses, les nodulations symbiotiques avec les bactéries du genre *Rhizobium* permettent un enrichissement de la plante en azote par la transformation de l'azote atmosphérique en ammoniac, en échange de produits de la photosynthèse (Oldroyd et Downie, 2008). La formation

des nodosités est déclenchée par l'interaction de lipochitooligosaccharides bactériens (appelés facteurs Nod) avec des récepteurs LecRLKs contenant un domaine lectine LysM (Limpens et al., 2003 ; Radutoiu et al., 2003 ; Oldroyd et Downie, 2008). De plus, des interactions indépendantes des facteurs Nod semblent jouer un rôle dans la mise en place de certaines nodulations, et ce par l'interaction entre les lectines et les EPS bactériens (van Rhijn et al., 1998 ; Karr et al., 2000).

2.1.3.4 Rôle dans les défenses

Outre le rôle des LecRLKs dans la reconnaissance des bioagresseurs et le déclenchement des défenses (décrit dans la partie 2.1.3.2), les lectines peuvent avoir directement un rôle de protéines de défense (Peumans et Van Damme, 1995).

Les chimérolectines couplées à un domaine RIP, comme la ricine, sont susceptibles d'être Bolognesitoxiques pour tous les eukaryotes, à partir du moment où elles entrent en contact avec les ribosomes cytoplasmiques (Peumans et Van Damme, 1995 ; Bolognesi et al., 2016 ; Walsh et al., 2013). D'autres chimérolectines disposent d'un domaine aérolysine, notamment au sein de la famille des amaranthines (Dang et al., 2017). Le domaine aérolysine a par ailleurs été caractérisé comme ayant la capacité de former des pores dans les membranes cellulaires et d'induire la mort cellulaire d'organismes procaryotes ou eucaryotes. (Podobnik et al., 2017).

L'accumulation de lectines dans certains tissus, comme les graines ou l'écorce, semble témoigner d'un mécanisme de défense contre les animaux herbivores (Peumans et Van Damme, 1995). Lorsqu'elles sont ingérées, ces lectines peuvent se retrouver au contact des glycoprotéines des cellules épithéliales du tube digestif et les endommager. Les intoxications aiguës provoquées par les lectines entraînent des troubles digestifs, comme des nausées, vomissements et diarrhées, pouvant entraîner à long terme des inflammations intestinales (Miyake et al., 2007 ; Lucius, 2020). La présence des lectines apporterait donc un rôle protecteur vis-à-vis des animaux herbivores, qui privilégient probablement la consommation de plantes dénuées de lectines afin d'éviter leurs effets toxiques (Peumans et Van Damme, 1995).

De la même manière, les lectines ingérées par les insectes pourraient avoir des effets délétères en se fixant aux glycoprotéines de leur tractus digestif, au niveau des cellules épithéliales ou des enzymes digestives (Peumans et Van Damme, 1995). Les GNA présentes dans le phloème de *Galanthus nivalis* peuvent impacter les insectes piqueurs-suceurs (Van Damme, 2008). De nombreux travaux vont en ce sens, puisque l'ajout de GNA au régime alimentaire perturbe la reproduction et le développement d'hémiptères piqueur-suceurs (Powell et al., 1993 ; Rahbé et al., 1995 ; Powell et al., 1995a ; Sauvion et al., 1996 ; Powell et al., 1998 ; Bandyopadhyay et al., 2001 ; Majumder et al., 2003) et de larves phytophages (Sétamou et

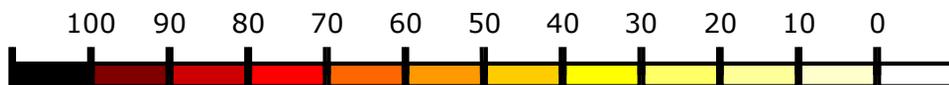
al., 2003 ; Shukla et al., 2005). L'utilisation de plantes transgéniques a permis de valider le rôle des GNA dans la résistance vis-à-vis des piqueur-suceurs (Hilder et al., 1995 ; Down et al., 1996 ; Rao et al., 1998 ; Stoger et al., 1999 ; Nagadhara et al., 2004 ; Dutta et al., 2005a, b ; Saha et al., 2006) et des phytophages (Gatehouse et al., 1997). D'autres familles de lectines se révèlent néfastes contre les insectes, telles que les amaranthines (Guo et al., 2004 ; Wu et al., 2006), les jacalines (Chang et al., 1999), les ricines-B (Zhou et al., 2000 ; Wei et al., 2004 ; Noghabi et al., 2006) et les lectines des légumineuses (Boulter et al., 1990 ; Zhu et al., 1996 ; Gatehouse et al., 1999 ; Okeola et Machuka, 2001 ; Macedo et al., 2003 ; Melander et al., 2001 ; Macedo et al., 2007). La chitine présente dans les membranes péritrophiques des insectes peut être ciblée par des lectines spécifiques de cette molécule. Certaines lectines, comme l'agglutinine de germe de blé (WGA pour « wheat germ agglutinin »), altèrent la croissance et le développement larvaire d'insectes ravageurs lorsqu'elles sont intégrées à des régimes alimentaires artificiels (Czapla et Lang 1990 ; Murdock et al., 1990 ; Huesing et al., 1991 ; Eisemann et al., 1994 ; Powell et al., 1995b). De surcroît, l'introgression du gène codant la WGA dans des plantes transgéniques engendre une résistance vis-à-vis des pucerons (Kanrar et al., 2002).

Les lectines peuvent enfin être impliquées dans les défenses contre des microbes phytopathogènes. Elles sont par exemple capables d'inhiber la propagation d'une infection virale. Même si les mécanismes antiviraux ne sont pas élucidés, les lectines pourraient interagir avec les glycoprotéines présentes au niveau de la capsid des particules virales (Peumans et Van Damme, 1995). Leur activité antivirale a d'abord été mise en évidence *in vitro* sur des virus s'attaquant aux cellules animales (Balzarini et al., 1992), puis sur des phytovirus. C'est le cas d'une jacaline impliquée dans la résistance de certains écotypes d'*A. thaliana* à certains potexvirus (Yamaji et al., 2012). De plus, certaines lectines, incluant la ConA, limitent la transmission de virus par les pucerons vecteurs (Francis et al., 2020).

La paroi fongique, constituée essentiellement de chitine, un polymère de N-acétylglucosamine (Latgé, 2007), peut être la cible de certaines lectines (Peumans et Van Damme, 1995). De part cette spécificité, les lectines peuvent interférer avec la croissance fongique *in vitro* en se liant à la chitine (Broekaert et al., 1989 ; Van Parijs et al., 1991 ; Van Parijs et al., 1992 ; Koo et al., 1998 ; Xu et al., 1998 ; Damico et al., 2003) ou bien aux mannanes/mannoses également présents dans les parois fongiques (Maria das Graças et al., 2002 ; Miyakawa et al., 2014). Ces propriétés antifongiques ont été observées chez plusieurs familles, telles que les amaranthines (Broekaert et al., 1992), les jacalines (Weidenbach et al., 2016), les hévéines (Van Parijs et al., 1991) comme la WGA (Ciopraga et al., 1999), et celles présentant un domaine chitinase (Guan et al., 2008 ; Chye et al., 2004).

La surface des cellules bactériennes comporte de nombreux composés glycosylés reconnus par les lectines végétales (Pistole, 1981) et ce, à plusieurs niveaux : membrane externe des

Similarité (%)



A

	MdAGG17	MdAGG18	MdAGG16	MdAGG4	MdAGG2	MdAGG1	MdAGG3	MdAGG6	MdAGG5	MdAGG9	MdAGG11	MdAGG10	MdAGG8	MdAGG12	MdAGG13	MdAGG14	MdAGG15
MdAGG17		94,80	58,72	62,53	59,50	61,22	64,07	57,67	59,40	58,31	59,64	60,37	60,68	61,10	60,87	61,33	61,01
MdAGG18	94,80		55,01	54,27	52,39	54,34	53,83	49,11	51,15	51,15	51,40	51,65	52,67	51,91	51,65	53,44	53,18
MdAGG16	58,72	55,01		68,36	73,92	76,07	74,83	68,85	71,74	73,99	74,04	75,93	75,69	75,97	76,18	74,89	75,91
MdAGG4	62,53	54,27	68,36		80,21	79,32	82,26	72,50	73,52	73,67	73,89	73,04	74,52	72,61	72,82	73,67	74,10
MdAGG2	59,50	52,39	73,92	80,21		91,02	91,83	76,41	79,46	81,15	81,56	80,92	81,97	79,67	79,88	81,52	81,48
MdAGG1	61,22	54,34	76,07	79,32	91,02		97,16	81,16	84,57	86,21	86,06	86,69	87,25	85,95	86,15	86,15	86,73
MdAGG3	64,07	53,83	74,83	82,26	91,83	97,16		79,34	82,94	85,02	85,68	84,36	85,90	84,36	84,36	85,24	85,24
MdAGG6	57,67	49,11	68,85	72,50	76,41	81,16	79,34		82,21	80,45	80,21	80,00	80,41	79,79	80,00	80,82	80,41
MdAGG5	59,40	51,15	71,74	73,52	79,46	84,57	82,94	82,21		87,32	87,09	85,77	86,89	85,66	85,66	86,89	86,48
MdAGG9	58,31	51,15	73,99	73,67	81,15	86,21	85,02	80,45	87,32		96,79	94,06	93,57	92,34	92,54	93,35	93,33
MdAGG11	59,64	51,40	74,04	73,89	81,56	86,06	85,68	80,21	87,09	96,79		92,59	91,58	90,93	91,13	91,53	91,11
MdAGG10	60,37	51,65	75,93	73,04	80,92	86,69	84,36	80,00	85,77	94,06	92,59		96,30	94,89	95,30	96,32	96,32
MdAGG8	60,68	52,67	75,69	74,52	81,97	87,25	85,90	80,41	86,89	93,57	91,58	96,30		94,97	95,17	95,98	96,37
MdAGG12	61,10	51,91	75,97	72,61	79,67	85,95	84,36	79,79	85,66	92,34	90,93	94,89	94,97		99,40	95,60	95,59
MdAGG13	60,87	51,65	76,18	72,82	79,88	86,15	84,36	80,00	85,66	92,54	91,13	95,30	95,17	99,40		95,80	95,79
MdAGG14	61,33	53,44	74,89	73,67	81,52	86,15	85,24	80,82	86,89	93,35	91,53	96,32	95,98	95,60	95,80		97,60
MdAGG15	61,01	53,18	75,91	74,10	81,48	86,73	85,24	80,41	86,48	93,33	91,11	96,32	96,37	95,59	95,79	97,60	

B

	MdAGG17	MdAGG18	MdAGG16	MdAGG6	MdAGG8	MdAGG9	MdAGG11	MdAGG4	MdAGG2	MdAGG1	MdAGG3	MdAGG5	MdAGG10	MdAGG12	MdAGG13	MdAGG15	
MdAGG17		98,81	90,16	84,33	86,46	86,95	87,55	88,15	88,35	89,16	88,96	88,55	88,96	87,55	87,35	87,95	88,35
MdAGG18	98,81		89,36	83,53	85,66	86,14	86,75	87,55	87,95	88,76	88,55	88,15	88,15	87,15	86,95	87,55	87,95
MdAGG16	90,16	89,36		86,14	87,27	88,76	88,96	89,56	89,76	90,16	90,36	89,96	91,16	89,76	89,16	89,76	90,16
MdAGG6	84,33	83,53	86,14		88,69	90,36	90,56	91,16	90,96	90,76	91,37	91,16	92,57	90,76	90,76	91,77	91,37
MdAGG8	86,46	85,66	87,27	88,69		94,95	95,96	93,33	93,94	93,74	93,94	94,55	94,95	93,33	94,34	93,94	94,34
MdAGG9	86,95	86,14	88,76	90,36	94,95		98,19	95,58	95,38	94,98	95,58	96,79	96,39	95,38	95,18	95,78	96,18
MdAGG11	87,55	86,75	88,96	90,56	95,96	98,19		95,78	96,18	95,58	96,18	96,59	96,18	95,58	95,78	96,39	96,79
MdAGG4	88,15	87,55	89,56	91,16	93,33	95,58	95,78		97,79	97,39	97,59	96,79	96,79	95,38	95,58	96,18	96,18
MdAGG2	88,35	87,95	89,76	90,96	93,94	95,38	96,18	97,79		97,99	97,79	96,59	96,99	95,58	95,78	96,39	96,39
MdAGG1	89,16	88,76	90,16	90,76	93,74	94,98	95,58	97,39	97,99		98,80	96,99	96,99	95,98	95,78	96,39	96,59
MdAGG3	88,96	88,55	90,36	91,37	93,94	95,58	96,18	97,59	97,79	98,80		96,79	97,59	96,59	96,39	96,99	97,19
MdAGG5	88,55	88,15	89,96	91,16	94,55	96,79	96,59	96,79	96,59	96,99	96,79		97,19	96,18	95,98	96,59	96,99
MdAGG10	88,96	88,15	91,16	92,57	94,95	96,39	96,99	96,79	96,99	96,99	97,59	97,19		96,99	97,19	97,79	97,79
MdAGG12	87,55	87,15	89,76	90,76	93,33	95,38	95,58	95,38	95,58	95,98	96,59	96,18	96,99		97,79	98,39	98,39
MdAGG13	87,35	86,95	89,16	90,76	94,34	95,18	95,78	95,58	95,78	95,78	96,39	95,98	97,19	97,79		98,59	98,59
MdAGG15	87,95	87,55	89,76	91,77	93,94	95,78	96,39	96,18	96,39	96,39	96,99	96,59	97,79	98,39	98,59		99,20

C

	MdAGG6	MdAGG17	MdAGG18	MdAGG16	MdAGG8	MdAGG12	MdAGG14	MdAGG13	MdAGG15	MdAGG9	MdAGG11	MdAGG4	MdAGG5	MdAGG10	MdAGG2	MdAGG1	MdAGG3
MdAGG6		79,04	77,84	84,24	82,93	84,24	85,45	86,06	85,45	84,85	84,85	86,06	86,67	86,67	86,67	87,27	86,67
MdAGG17	79,04		98,80	89,70	85,37	86,67	88,48	87,27	87,88	87,27	87,27	88,48	89,09	88,48	89,09	90,30	90,91
MdAGG18	77,84	98,80		88,48	84,15	85,45	87,27	86,06	86,67	86,06	86,06	87,88	87,88	87,27	87,88	89,09	89,70
MdAGG16	84,24	89,70	88,48		89,02	91,52	93,33	92,12	92,73	90,91	90,91	92,12	92,73	92,73	92,73	93,94	93,33
MdAGG8	82,93	85,37	84,15	89,02		94,51	94,51	93,90	94,51	96,34	96,34	93,90	95,73	95,12	94,51	95,12	94,51
MdAGG12	84,24	86,67	85,45	91,52	94,51		98,18	98,18	98,79	95,76	95,76	95,76	97,58	96,97	96,36	96,36	95,76
MdAGG14	85,45	88,48	87,27	93,33	94,51	95,18		98,79	99,39	96,36	96,36	96,36	98,18	97,58	96,27	96,18	97,58
MdAGG13	86,06	87,27	86,06	92,12	93,90	98,18	98,79		99,39	96,36	96,36	96,36	98,18	97,58	96,97	96,97	96,36
MdAGG15	85,45	87,88	86,67	92,73	94,51	98,79	99,39	99,39		96,97	96,97	96,97	98,79	98,18	97,58	97,58	96,97
MdAGG9	84,85	87,27	86,06	90,91	96,34	95,76	96,36	96,36	96,97			96,36	98,18	97,58	96,97	96,97	96,36
MdAGG11	84,85	87,27	86,06	90,91	96,34	95,76	96,36	96,36	96,97			96,36	98,18	97,58	96,27	96,97	96,36
MdAGG4	86,06	88,48	87,88	92,12	93,90	95,76	96,36	96,36	96,97	96,36	96,36		98,18	97,58	98,18	98,18	97,58
MdAGG5	86,67	89,09	87,88	92,73	95,73	97,58	98,18	98,79	98,18	98,18	98,18	98,18		99,39	98,79	98,79	98,18
MdAGG10	86,67	88,48	87,27	92,73	95,12	96,97	97,58	97,58	98,18	97,58	97,58	97,58	99,39		98,18	98,18	97,58
MdAGG2	86,67	89,09	87,88	92,73	94,51	96,36	96,97	96,97	97,58	96,97	96,97	98,18	98,79	98,18		98,79	98,18
MdAGG1	87,27	90,30	89,09	93,94	95,12	96,36	98,18	96,97	97,58	96,97	96,97	98,18	98,79	98,18	98,79		99,39
MdAGG3	86,67	90,91	89,70	93,33	94,51	95,76	97,58	96,36	96,97	96,36	96,36	97,58	98,18	97,58	98,18	99,39	

Figure 2.2.1 : Matrice de similarité entre les séquences promotrices (A ; 500 pb en amont du codon start), codantes (B) et des protéines des gènes *MdAGGs* (Warneys et al., 2018).

bactéries Gram-négatives, comportant des LPS (Warren et Kowalski, 1977 ; Kato et al., 1979 ; Frasch et al., 1980 ; Duvick et Sequeira, 1984), paroi des bactéries Gram-positives constituée de peptidoglycanes (Ayoub et al., 1992 ; Ayoub et al., 1994 ; Bourne et al., 1994 ; Biari et al., 2019) ou capsules composées d'EPS liés à la surface bactérienne (Kamberger, 1979 ; Laus et al., 2006). Bien que l'activité antibactérienne des lectines végétales soit souvent décrite pour des bactéries pathogènes des animaux (Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018), peu de travaux montrent leur effet sur des bactéries phytopathogènes (Dias et al., 2015). De manière indirecte, les lectines végétales semblent impliquées dans les défenses par leur capacité à immobiliser certaines souches bactériennes phytopathogènes par agglutination (Ratanapo et al., 2001 ; Guan et al., 2008). Ces phénomènes d'agglutination ont notamment été décrits dans des situations de résistance où seules les souches au pouvoir pathogène atténué par un défaut de biosynthèse d'EPS sont agglutinées (Sequeira et Graham, 1977 ; Bradshaw-Rouse et al., 1981 ; Ma et al., 2010 et 2013). Dans le cadre des réactions de défense, cette agglutination pourrait inhiber la croissance bactérienne, bloquer les échanges nutritifs avec le milieu extérieur ou favoriser le déploiement d'autres composés de défense nocifs pour la bactérie.

2.2 Découverte de lectines induites par l'ASM chez le pommier

2.2.1 Les MdAGGs, une nouvelle famille de protéines induites par l'ASM

Comme évoqué précédemment (voir §1.2.2), Warneys et al. (2018) ont réalisé une étude globale du transcriptome sur des semis de pommier 3 jours après traitement à l'ASM (en comparaison d'un témoin eau). Cette analyse microarray a permis de mettre en évidence une famille de protéines remarquablement induite par l'ASM, les MdAGGs. Une analyse *in silico* de cette famille a révélé que ces protéines sont des lectines appartenant à la famille des amaranthines. Ces lectines induites par l'ASM possèdent un seul domaine agglutinine (domaine Pfam PF07468) initialement décrit à partir d'une lectine extraite de graines d'*Amaranthus caudatus* (Transue et al., 1997). Une recherche de ce domaine dans le génome de l'haploïde doublé GDDH13 de la variété Golden Delicious (Daccord et al., 2017) a permis d'identifier 18 gènes *MdAGGs* (dont un pseudogène, *MdAGG7*), pour la plupart regroupés en cluster sur le chromosome 10 (*MdAGG1* à *MdAGG15*), et codant des protéines de 19 à 20,6 kDa ne possédant qu'un seul domaine agglutinine putatif. Les séquences promotrices, codantes et protéiques des *MdAGGs* présentent une forte homologie, notamment pour celles regroupées en cluster (Figure 2.2.1). Cette méthode a révélé 9 autres gènes codant des protéines à deux domaines

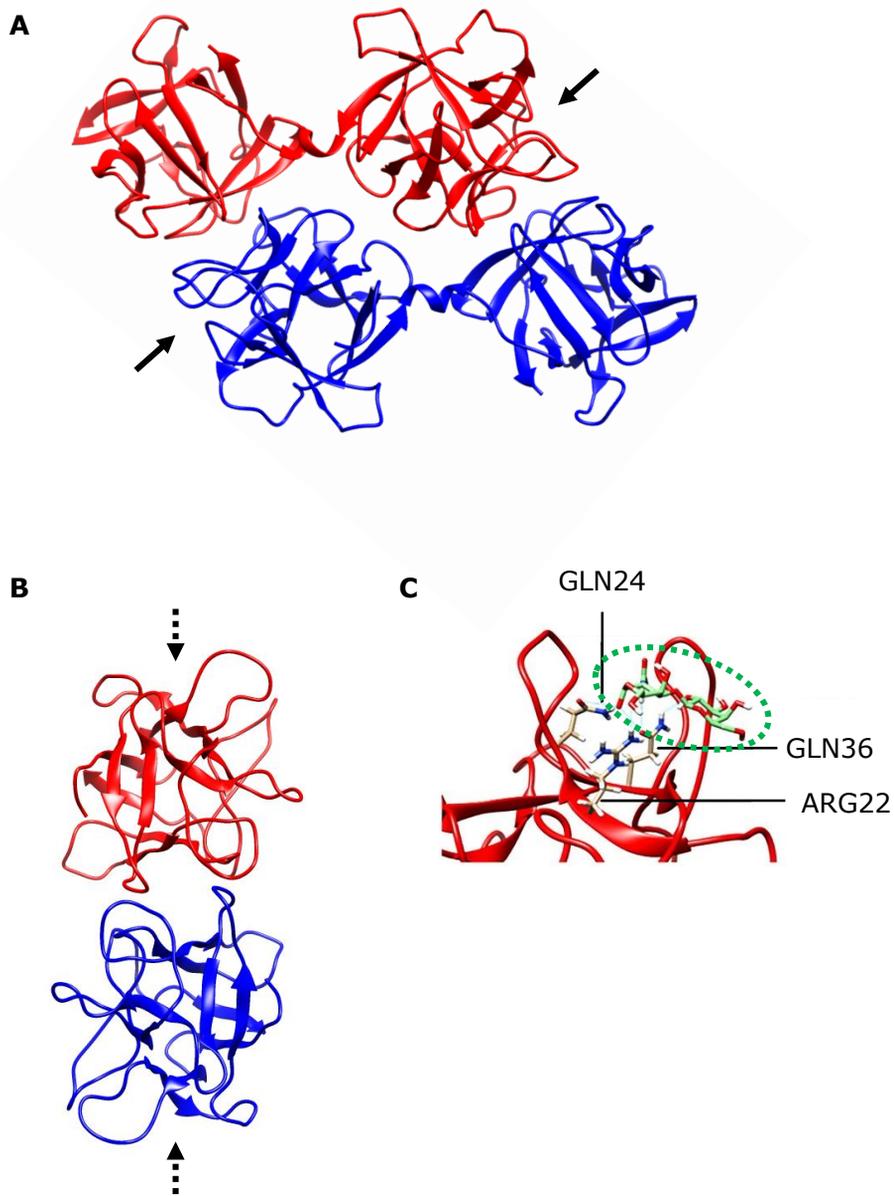


Figure 2.2.2 : Structure de l'homodimère de l'amaranthine d'*Amaranthus caudatus* (A) et de celle prédite de MdAGG10 (B). Chaque monomère est coloré respectivement en rouge et en bleu. Les sites de l'amaranthine fixant l'antigène T sont désignés par des flèches pleines et ceux de la MdAGG10 prédits pour fixer le galactose N-acétylgalactosamine par des flèches en pointillées. Le modèle de MdAGG10 dispose d'une cavité susceptible de fixer le galactose N-acétylgalactosamine, entouré en pointillés verts, à l'aide de liaisons hydrogènes au niveau de 3 acides aminés: l'arginine (ARG) 22 et les résidus glutamine (GLN) 24 et 36 (C ; Warneys et al., 2018).

agglutinines (nommées di-agglutinines - *MdDiAGG*), de poids moléculaire compris entre 34,5 et 59,7 kDa. L'analyse des séquences *MdDiAGGs* a montré que 3 d'entre elles possèdent un domaine aérolysine à leur extrémité C-terminale. Seulement, l'expression des *MdDiAGGs* n'est pas inductible par l'ASM, ce qui suggère qu'elles n'ont pas un rôle direct dans la résistance induite par l'ASM vis-à-vis des bioagresseurs du pommier (Warneys et al., 2018).

2.2.2 Modélisation de la structure tridimensionnelle de la MdAGG10

La structure tridimensionnelle de l'amaranthine de *A. caudatus* a été résolue dans une étude antérieure (PBD : 1jlx ; Figure 2.2.2A). Il s'agit d'une di-agglutinine avec deux domaines Pfam PF07468, capable de s'associer en homodimère. Sa cristallisation avec le disaccharide benzylique de l'antigène T (Gal- β 1,3-GalNac- α -O-benzyl, un marqueur tumoral de cancers épithéliaux) met en évidence un site de fixation spécifique pour le galactose-N-acétylgalactosamine au niveau de son domaine N-terminal (Transue et al., 1997). Les MdAGGs ont entre 32,2 et 34,4% d'identité avec le domaine lectine N-terminal de l'amaranthine de *A. caudatus*. A partir de sa structure, celle de la MdAGG10, l'une des protéines dont le gène est le plus fortement exprimé en réponse à l'ASM, a été modélisée (Figure 2.2.2B). Cette prédiction indique que la MdAGG10 dispose d'un site capable de se fixer au galactose-N-acétylgalactosamine par 6 liaisons hydrogènes au niveau de trois acides aminés conservés parmi les MdAGGs (Figure 2.2.2C) mais qui diffèrent de ceux de l'amaranthine de *A. caudatus*. La charge de surface prédite à pH 7 est globalement positive sauf au niveau du site de fixation putatif, où celle-ci est négative. Selon ce modèle, MdAGG10 s'associerait également en homodimère, avec les sites de fixation aux carbohydrates exposés au niveau des parties apicales (Warneys et al., 2018). De plus, la présence d'une cystéine C-terminale chez toutes les MdAGGs permettrait d'une part la stabilisation de ces homodimères par le biais de ponts disulfures, et d'autre part l'association avec d'autres protéines présentant des cystéines.

La découverte des MdAGGs du pommier en tant que lectines inductibles par un des SDP les plus efficaces vis-à-vis de plusieurs bioagresseurs du pommier a motivé l'exploration fonctionnelle de cette famille. Les sections suivantes présenteront (i) les méthodologies développées dans le cadre de mon travail de thèse pour étudier leur accumulation, (ii) l'évaluation de leur pertinence en tant que marqueurs de résistance vis-à-vis du feu bactérien, en les comparant à d'autres marqueurs de défense, (iii) l'analyse de leur comportement au cours de l'interaction pommier/*E. amylovora* et (iv) l'étude de leur activité biologique en tant que protéines de défense.

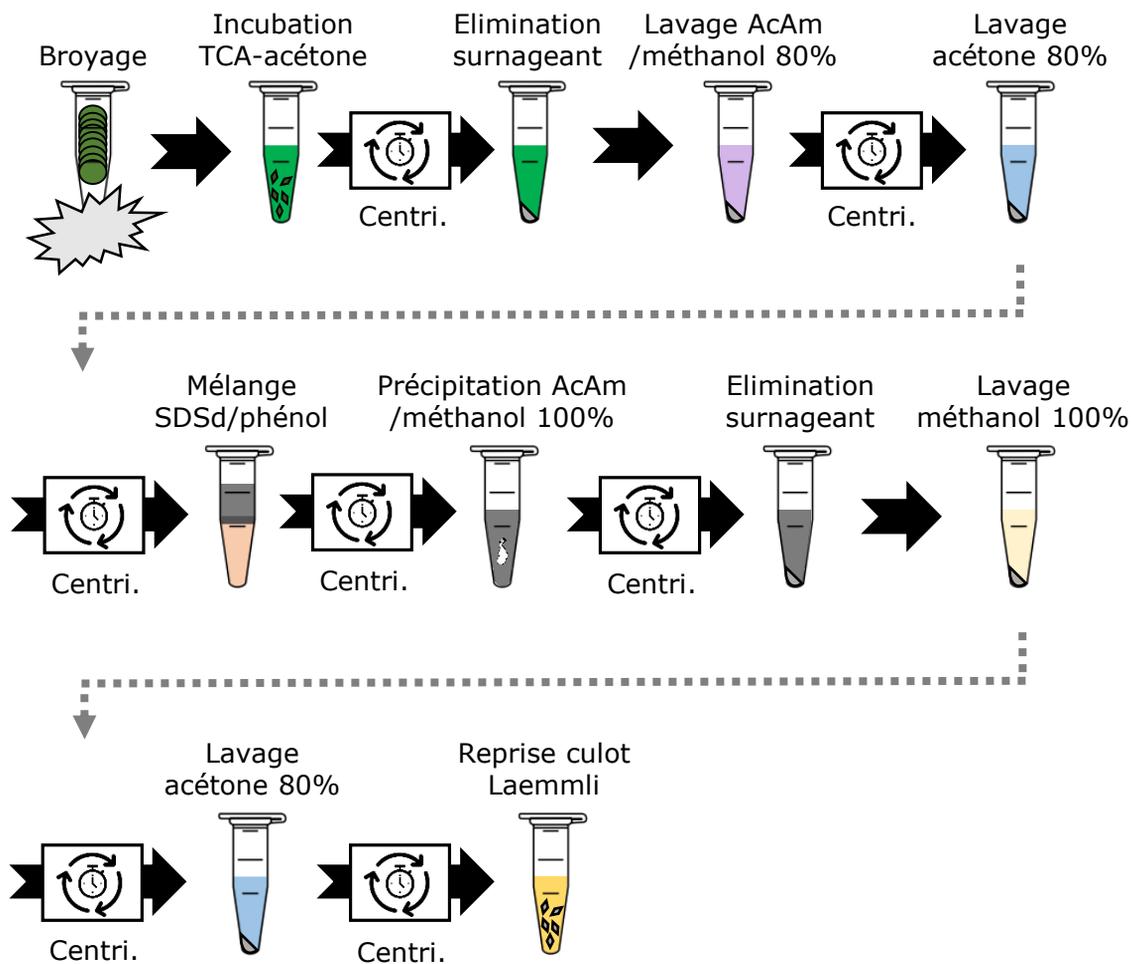


Figure 2.3.1 : Ancien protocole d'extraction protéique des MdAGGs. Après broyage des tissus, la poudre est incubée 30 s dans un tampon TCA-acétone. Les protéines sont culotées par centrifugation puis successivement lavées par de l'acétate d'ammonium 0,1 M (AcAm)/méthanol 80% et de l'acétone 80%. Le culot est repris dans un mélange tampon SDS dense (SDSd)/phénol (1:1 v:v) 30 s à température ambiante puis la phase phénolique est incubée dans un tampon de précipitation AcAm/méthanol 100% (1:3 v:v) une nuit à -20°C. Après centrifugation, le culot protéique est lavé successivement par du méthanol 100% et de l'acétone 80%, pour finalement être repris et solubilisé dans du tampon de Laemmli. Toutes les centrifugations sont effectuées à 4°C, 16000 g pendant 5 min (Warneys et al., 2018).

2.3 Développement méthodologique pour étudier le comportement des MdAGGs

2.3.1 Méthodes antérieures d'analyse transcriptionnelle et protéique

Pour étudier l'accumulation des transcrits et des protéines MdAGGs, des méthodologies de RT-qPCR et de western blot avaient été mises au point par le laboratoire (Warneys et al., 2018) :

- des amorces qPCR ciblant quatre gènes *MdAGGs* (*MdAGG2*, *MdAGG12*, *MdAGG13* et *MdAGG15*) et susceptibles de s'hybrider avec dix autres gènes (*MdAGG1*, *MdAGG3*, *MdAGG4*, *MdAGG5*, *MdAGG8*, *MdAGG9*, *MdAGG10*, *MdAGG11*, *MdAGG14* et *MdAGG16*) avec lesquelles elles ont un polymorphisme de 1 à 3 nucléotides cumulés pour les 2 amorces, pour la mesure de leur expression par RT-qPCR,
- un protocole d'extraction protéique permettant d'extraire à la fois les MdAGGs et les MdDiAGGs et de les détecter par western blot dans les tissus aériens (feuilles, pétioles et tiges ; Figure 2.3.1). Ce protocole consiste en une première extraction et précipitation des protéines avec un mélange d'acide trichloroacétique (TCA) et d'acétone, suivie d'une seconde extraction au phénol avec une précipitation des protéines dans un mélange d'acétate d'ammonium (AcAm)/méthanol. Ces extractions sont entrecoupées de lavages à l'acétone, méthanol ou d'un mélange d'AcAm/méthanol (Wang et al., 2006 ; Warneys et al., 2018). Le culot protéique final est repris dans un tampon PBS mais reste difficilement soluble. Néanmoins avec ce protocole d'extraction, une forte variabilité technique et biologique de détection des MdAGGs est observée dans les tissus analysés, bien que de fortes quantités de transcrits soient révélées dans ces mêmes tissus par RT-qPCR. Les résultats n'étant pas satisfaisants en termes de répétabilité, la recherche d'une meilleure méthode d'extraction protéique fut entreprise au cours de ma thèse.

2.3.2 Evaluation de différentes méthodes d'extraction des MdAGGs

A partir des méthodes d'extractions proposées par Hurkman et Tanaka (2007), 6 méthodes ont été retenues et testées pour identifier la meilleure extraction possible pour la détection des MdAGGs par western blot : (i) à l'urée, (ii) au SDS, (iii) au TCA/acétone, (iv) au

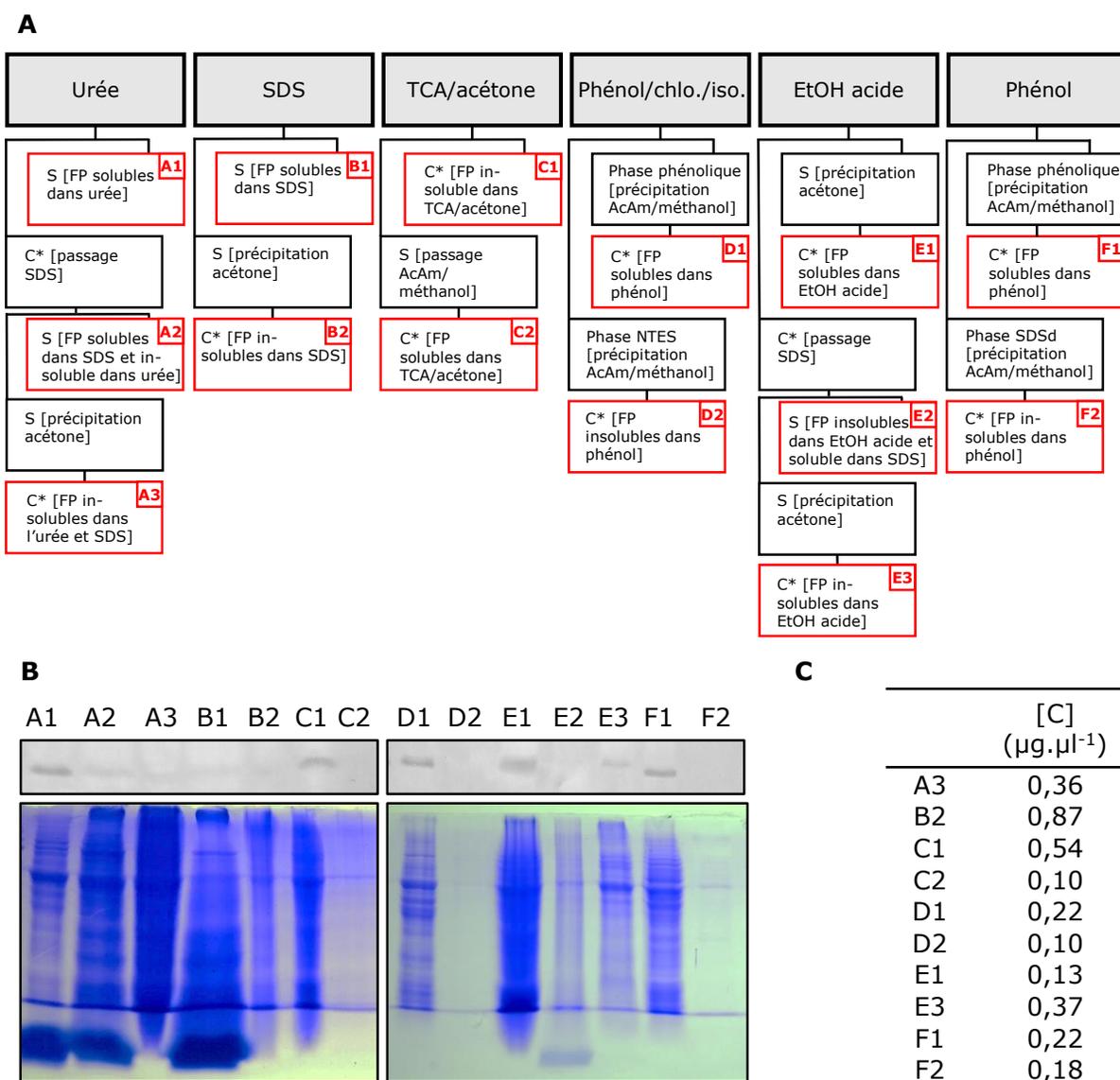


Figure 2.3.2 : Evaluation de différentes méthodes d'extraction protéiques issues Hurkman et Tanaka (2007). A) Caractéristiques des méthodes d'extraction, B) Profils des extraits après SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, C) Dosage protéique. Les protéines ont été extraites à partir de 200 mg de poudre de feuilles de semis de pommier 3 jours après un traitement ASM. Pour chaque extraction, plusieurs fractions protéiques (FP) ont été testées (encadré rouge) : A1, A2 et A3 pour l'extraction à l'urée ; B1 et B2 pour l'extraction au SDS ; C1 et C2 pour l'extraction au TCA/acétone ; D1 et D2 pour l'extraction au phénol/chloroforme/isopropanol (Phénol/chlo./iso.) ; E1, E2 et E3 pour l'extraction à l'éthanol acide (EtOH acide) et F1 et F2 pour l'extraction au phénol). Les culots (C*), solubilisés dans un tampon de Laemmli, et les surnageants (S) sont mélangés à un tampon de charge dénaturant pour l'analyse en SDS PAGE (20 μl /puits).

phénol/chloroforme/isopropanol, (v) à l'éthanol acide et (vi) au phénol (Figure 2.3.2A). Les extraits ont été analysés à plusieurs étapes de chaque extraction (ou plusieurs phases de séparation) pour déceler d'éventuelles déperditions en MdAGGs. Afin d'établir le rendement protéique, les extractions ont été réalisées à partir d'une même quantité de poudre (200 mg) de feuilles de semis de pommier traitées à l'ASM 3 jours auparavant. Les culots protéiques ont été repris dans un tampon de Laemmli modifié, facilitant leur solubilisation. Après analyse par western blot, seules 5 extractions ont permis de détecter les MdAGGs et sont classées dans la Figure 2.3.2B de la plus à la moins performante selon différents critères (bande nette des MdAGGs, profil total propre et concentration suffisante en protéines) : extraction au phénol (phase phénolique F1), au phénol-chloroforme-isopropanol (phase phénolique D1), à l'urée (solution A1), au TCA-acétone (solution C1) et à l'éthanol acide. La méthode d'extraction à l'urée n'a pas été retenue car les MdAGGs sont contenues dans une solution fortement concentrée en urée (9 M), gênant la suite des analyses comme le dosage protéique (méthode de Bradford). Le dosage protéique des quatre autres fractions retenues révèle que l'extraction au TCA-acétone a le plus fort rendement et celle à l'éthanol acide celui le plus faible, les deux autres méthodes ayant des rendements intermédiaires (Figure 2.3.2C). Finalement, la méthode retenue est l'extraction phénolique car elle permet de détecter les MdAGGs avec la meilleure résolution, et fournit un profil protéique net après migration SDS-PAGE, pour une quantité suffisante en protéines totales (F1, Figure 2.3.2B, C).

2.3.3 Optimisation de l'extraction phénolique des MdAGGs

A partir de l'extraction phénolique, des améliorations supplémentaires ont été apportées.

i) En fonction de la qualité de broyage, les protéines en contact avec le phénol diffèrent. Un broyage à billes aura tendance à libérer plus de protéines retenues dans les organites cellulaires qu'un broyage au mortier, diminuant ainsi le pourcentage de protéines cytoplasmiques contenues dans les extraits. Ces deux types de broyages ont été testés. ii) Nous avons vérifié si l'ajout du phénol à la poudre avant le SDS permettait de mieux capturer les MdAGGs que la procédure inverse. iii) Les MdAGGs comportant une cystéine C-terminale, elles peuvent en principe former des ponts disulfures et engendrer des interactions protéiques altérant la qualité de leur extraction. Nous avons donc testé si l'ajout d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), à différentes concentrations (5 mM ou 50 mM) dans le tampon de précipitation et dans le tampon de reprise permettait d'améliorer l'immunodétection des MdAGGs. iv) Des étapes de lavage permettent de nettoyer les échantillons de potentiels contaminants. Un lavage du culot protéique final au méthanol et/ou à l'acétone a été évalué. v) Une dénaturation thermique peut améliorer la séparation des protéines en SDS-PAGE. Nous avons comparé la séparation et la détection des MdAGGs avec ou sans prétraitement à la chaleur (2 h ; 90°C).

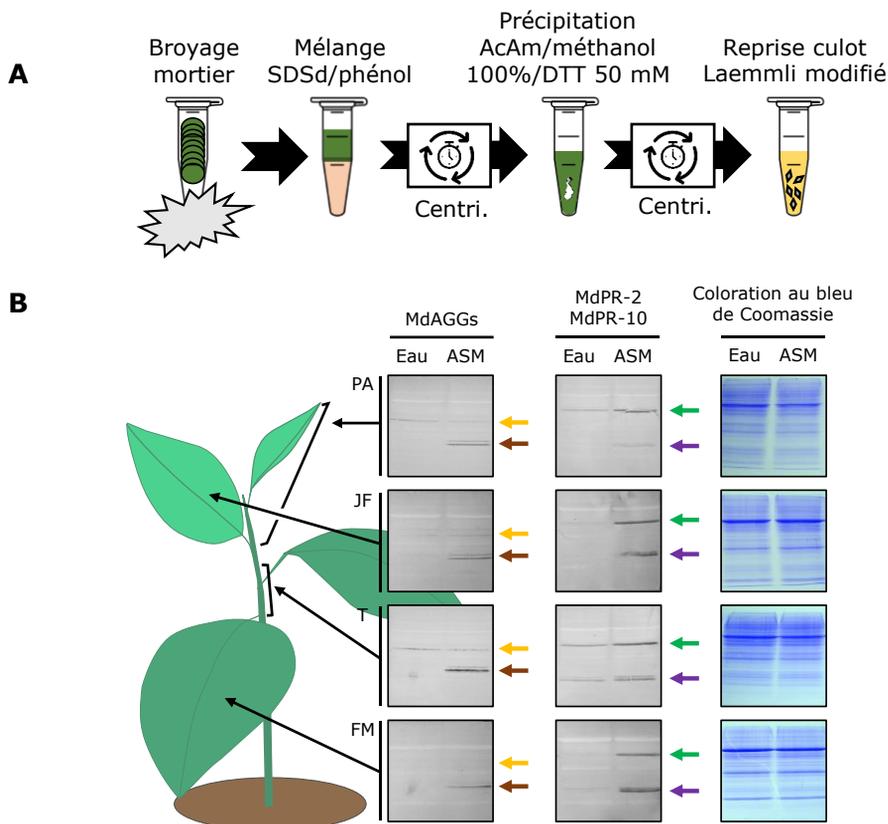


Figure 2.3.3 : Méthode d'extraction protéique (A) permettant de détecter les MdAGGs, MdDiAGGs, MdPR-2 et MdPR-10 en western blot (B). (A) Tissus réduits en poudre au mortier et incubés dans un mélange tampon SDS dense (SDSd)/phénol (1:1 v:v) pendant 5 min. Après centrifugation (16000 g, 10 min), phase phénolique incubée dans un tampon de précipitation AcAm/méthanol 100%/DTT 5 mM (1:5 v:v) une nuit à -20°C. Après centrifugation (16000 g, 10 min), culot solubilisé dans un tampon de Laemmli modifié. (B) Immunodétection des MdAGGs, MdDiAGGs, MdPR-2 et MdPR-10 dans différents organes (PA : partie apicale ; JF : jeune feuille ; T : tige ; FM : feuille mature) de semis de pommier 3 jours après traitement à l'eau ou à l'ASM. Chaque échantillon = pool de 10 organes issus de différents semis. Flèches oranges, marrons, vertes et violettes : positions respectives des MdDiAGGs (≈ 30 kDa), MdAGGs (≈ 30 kDa), MdPR-2 (≈ 30 kDa) et MdPR-10 (≈ 20 kDa). 10 μ g de protéines totales/puits. Résultats représentatifs de 2 répétitions biologiques indépendantes.

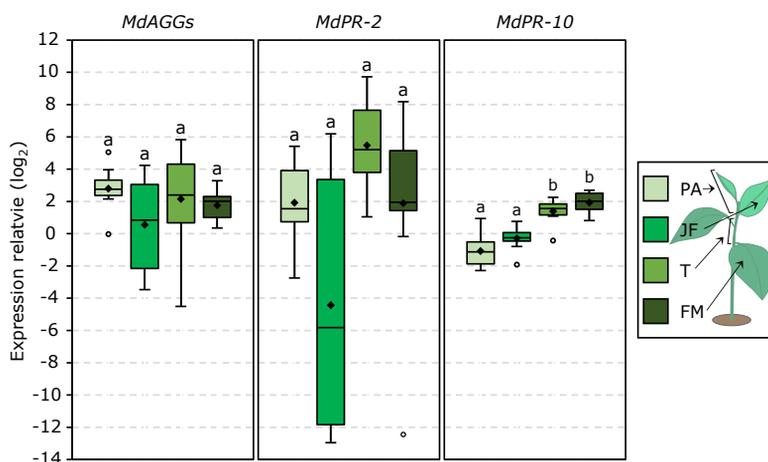


Figure 2.4.1 : Niveaux d'expression basale relatifs des *MdAGGs*, *MdPR-2* et *MdPR-10* dans différents organes (PA : partie apicale, JF : jeune feuille, T : tige, FM : feuille mature) de semis de pommier Golden Delicious. Boxplots avec moyennes, médianes et valeurs aberrantes indiqués respectivement par des losanges, des lignes et des cercles vides. Données issues de 10 répétitions biologiques par organe d'une seule expérience. Chaque répétition biologique est constituée d'un pool de 5 organes issus de semis différents. L'expression de chaque gène a été rapportée à celle d'un seul échantillon de JF. Différences statistiques globales sont établies pour chaque gène par un test de Kruskal-Wallis (*MdAGGs* : $p = 0,2375$; *MdPR-2* : $p = 0,02249$; *MdPR-10* : $p = 2,844e-06$) et les lettres désignent les différences statistiques établies par un test « post-hoc » de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni ($\alpha = 0,05$).

Les meilleures conditions de détection des MdAGGs sont obtenues avec un broyage au mortier auquel on ajoute d'abord le SDS, puis le phénol, une précipitation de la phase phénolique avec un tampon de précipitation comportant 50 mM de DTT et une reprise du culot avec un tampon de Laemmli modifié avec 5 mM de DTT. Les étapes de lavage et la dénaturation par la chaleur ne sont pas incluses dans le protocole optimisé puisqu'elles n'apportent pas d'amélioration. Nous avons aussi remarqué que la qualité de détection des MdAGGs est dépendante de la quantité totale de protéines déposée dans les puits, avec un dépôt de 10 µg minimum pour obtenir une bande bien visible et ce, pour une concentration d'anticorps primaires assez forte (2 anticorps complémentaires dilués au 1/500^e). Ainsi, ce nouveau protocole (Figure 2.3.3A) a permis de détecter les MdAGGs de manière fiable et répétable dans les tissus aériens de semis de pommier, notamment 3 jours après traitement à l'ASM (Figure 2.3.3B). Les tissus aériens analysés correspondent à 4 types d'organes : la plus jeune feuille développée (JF), la partie apicale située au-dessus de la JF (PA), la feuille mature (FM) située à 2 noeuds en dessous de la JF et la tige (T) entre la FM et la JF (incluant les pétioles). En plus des MdAGGs, cette méthode d'extraction permet de détecter les MdDiAGGs accumulées de manière constitutive dans les jeunes organes (PA et JF) et la tige. Enfin, cette nouvelle méthode permet également de détecter d'autres protéines de défenses étudiées par le laboratoire (protéines PR : MdPR-2 et MdPR-10), et ce, dans tous les organes traités à l'ASM. Cet avantage permet de comparer leur accumulation à celle des MdAGGs dans différentes conditions avec une seule et même méthode d'extraction.

2.4 Comportement transcriptionnel et protéique des MdAGGs

2.4.1 Comportement basal dans les parties aériennes

Les MdAGGs ne sont pas détectées dans les parties aériennes des semis traités à l'eau 3 jours auparavant, ce qui suggère des niveaux faibles d'expression basale des gènes, probablement insuffisants pour entraîner l'accumulation des MdAGGs au-delà du seuil détectable en western blot (Figure 2.3.3B). Nous avons cherché à déterminer si toutefois le niveau d'expression basale des MdAGGs diffère entre les différents organes (PA, JF, T, et FM) d'un semis de pommier « naïf » (Figure 2.4.1). Nous avons comparé ces niveaux d'expression à ceux de MdPR-2 et MdPR-10, dont les protéines sont détectables en western blot dans certains organes traités à l'eau (respectivement PA et T, Figure 2.3.3B). Le niveau d'expression des MdAGGs et de MdPR-2 ne sont pas significativement différents entre les organes, même si leur expression paraît plus faible dans la JF que dans les autres organes (Figure 2.4.1). Par contre, l'expression

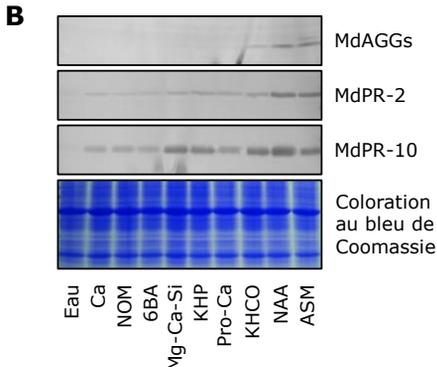
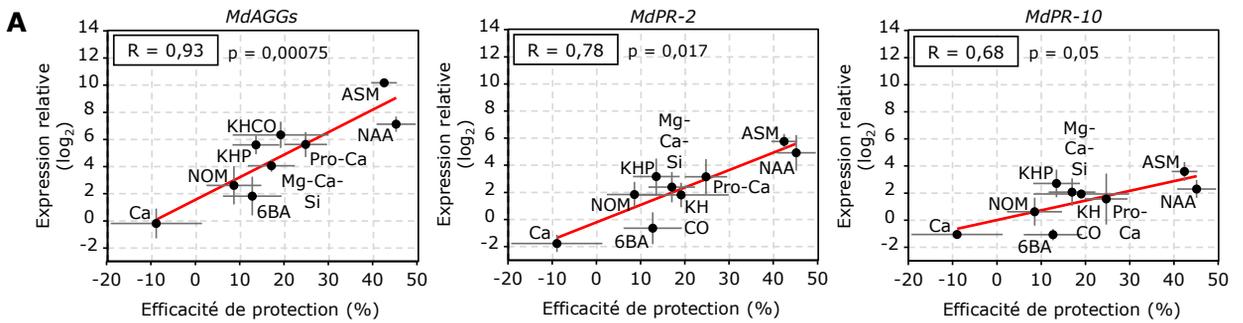


Figure 2.4.2 : Corrélation entre efficacité de protection délivrée par différents SDP candidats vis-à-vis du feu bactérien avec l'expression relative (A) et accumulation des MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10 (B) dans des semis de Golden Delicious . (A) Moyennes (et erreurs standard) des efficacités de protection 3 semaines après inoculation et des niveaux d'expressions relatives 3 jours après traitement. Corrélations évaluées par le Rho (R) (test de Spearman). Efficacités de protection calculées à partir de l'incidence mesurée sur des blocs de 10 plantes. Chaque expérience regroupe 3 blocs par traitement. Données de protection issues de 3 à 27 expériences indépendantes par traitement : 27 pour l'ASM, 13 pour le NAA, 6 pour le 6BA et le NOM, 5 pour le Mg-Ca-Si et le Pro-Ca, 4 pour le KHCO et le KHP et 3 pour le Ca). Moyennes des valeurs d'expression relatives calculées à partir de 4 à 9 répétitions biologiques, chacune constituée d'un pool de 5 jeunes feuilles de semis traités et toutes issues d'expériences indépendantes, et rapportées à la moyenne des témoins eau. (B) Immunodétection des protéines. 10 µg de protéines/puits. Résultats représentatifs de 2 répétitions biologiques indépendantes. ASM, acibenzolar-S-méthyl, NAA, 1-naphtylacetic acid ; KHCO, bicarbonate de potassium ; Pro-Ca, prohexadione-calcium ; KHP, phosphonate de potassium ; Mg-Ca-Si, éléments minéraux P, K, Mg, Ca et Si ; 6BA, 6-benzylaminopurine ; NOM, matière organique ; Ca, Calcium.

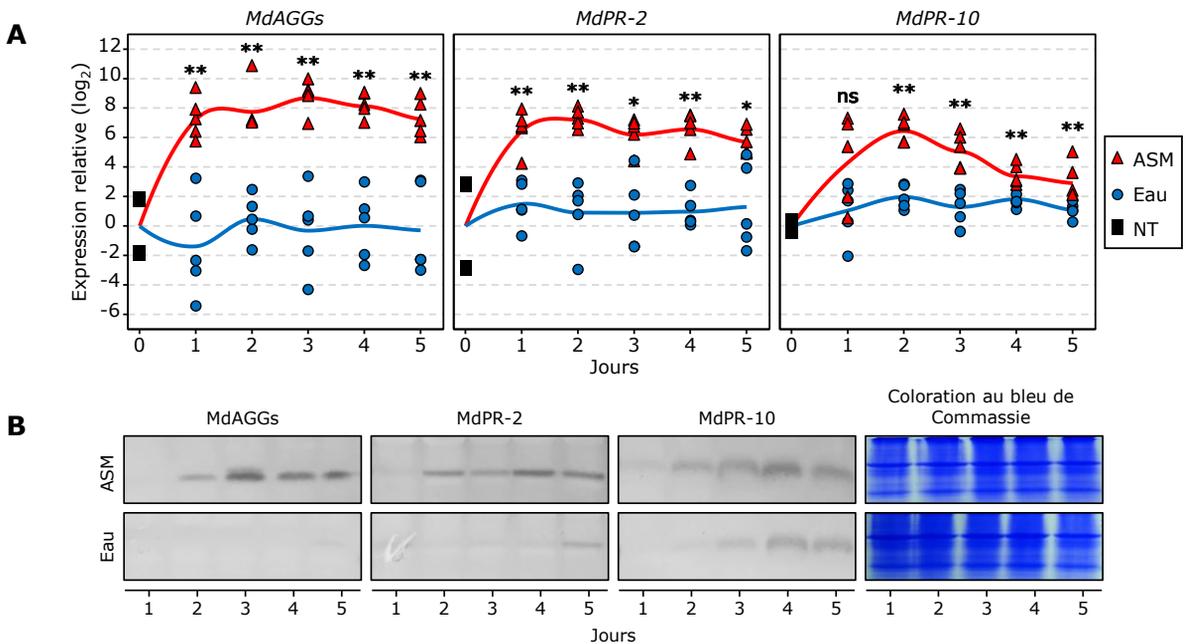


Figure 2.4.3 : Cinétique journalière de l'accumulation des transcrits (A) et des protéines (B) de MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10 dans des semis de pommier pendant 5 jours, après un traitement à l'ASM ou à l'eau. Chaque échantillon est constitué d'un pool de 5 jeunes feuilles issues de semis différents. (A) Expression relative des gènes. Moyennes (courbes) et valeurs individuelles (symboles) des \log_2 ratios de 5 répétitions biologiques par traitement et par date de prélèvement, issues de 2 expériences indépendantes ($n = 5$). Les valeurs d'expression de chaque gène ont été rapportées à la moyenne des plantes non-traitées au jour 0 (un échantillon pour chaque expérience). Les courbes représentent la tendance moyenne de l'expression selon la méthode de Loess (span = 0,5). Différences statistiques établies pour chaque gène entre traitements à chaque date de prélèvement par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; ns : non-significatif). (B) Immunodétection des protéines. 10 µg de protéines totales/puits Résultats représentatifs de 2 répétitions biologiques indépendantes.

basale de *MdPR-10* semble liée à l'ontogénie de l'organe, puisqu'elle est significativement plus faible dans les organes les plus jeunes (PA et JF) que dans la T et la FM.

2.4.2 Expression des MdAGGs et efficacité de différents

SDP candidats

Nous avons cherché à déterminer si les MdAGGs pouvaient être des marqueurs robustes de l'efficacité des SDP vis-à-vis d'une souche sauvage *E. amylovora* (*Ea* WT). Pour ce faire, nous avons confronté l'efficacité de protection de 9 SDP candidats à l'expression et l'accumulation des MdAGGs, *MdPR-2* et *MdPR-10* dans les JF 3 jours après traitement des semis (Figure 2.4.2). Parmi les 9 SDP potentiels, seul l'ASM et le NAA procurent une efficacité de protection contre *Ea* WT supérieure à 40% sur les plantes inoculées 3 jours après traitement, alors que les autres produits offrent une protection de 25% au maximum (Figure 2.4.2A). De manière générale, l'expression de *MdAGGs*, *MdPR-2* et *MdPR-10* est positivement corrélée avec le taux de protection conféré par les différents SDP. Les coefficients de corrélation entre l'efficacité de protection et l'expression de *MdPR-2* et *MdPR-10* sont cependant relativement faibles (respectivement $R = 0,78$ et $0,68$) bien que l'accumulation de *MdPR-2* soit cohérente avec les taux de protection observés, contrairement à *MdPR-10* (Figure 2.4.2B). En revanche, l'expression des *MdAGGs* est fortement corrélée avec l'efficacité de protection ($R = 0,93$). Au niveau protéique, les MdAGGs sont détectées seulement dans les tissus traités par les produits les plus efficaces contre *E. amylovora*, en abondance pour le NAA et l'ASM et en moindre quantité pour le KHCO (efficacité de protection de 20%). Ainsi, les MdAGGs sont de meilleurs marqueurs que *MdPR-2* et *MdPR-10*, pour la résistance induite par les SDP vis-à-vis du feu bactérien chez le pommier. L'ASM, produit pour lequel le laboratoire dispose d'un important recul d'utilisation, apporte l'une des efficacités de protection les plus importantes. Pour cette raison, les expériences présentées par la suite s'attacheront à évaluer le comportement des marqueurs de défense en réponse à ce produit uniquement.

2.4.3 Cinétique d'induction et d'accumulation dans la jeune feuille (JF) traitée à l'ASM

Le comportement des MdAGGs a été évalué dans les JF de semis de pommier Golden traités 3 jours auparavant à l'ASM ou à l'eau, en mesurant l'accumulation de transcrits (Figure 2.4.3A) et de protéines (Figure 2.4.3B) pendant une cinétique de 5 jours. Leur comportement transcriptionnel et protéique a été comparé à ceux des 2 autres marqueurs de défense, *MdPR-2* et *MdPR-10*. Le traitement ASM déclenche une surexpression des 3 gènes étudiés et une

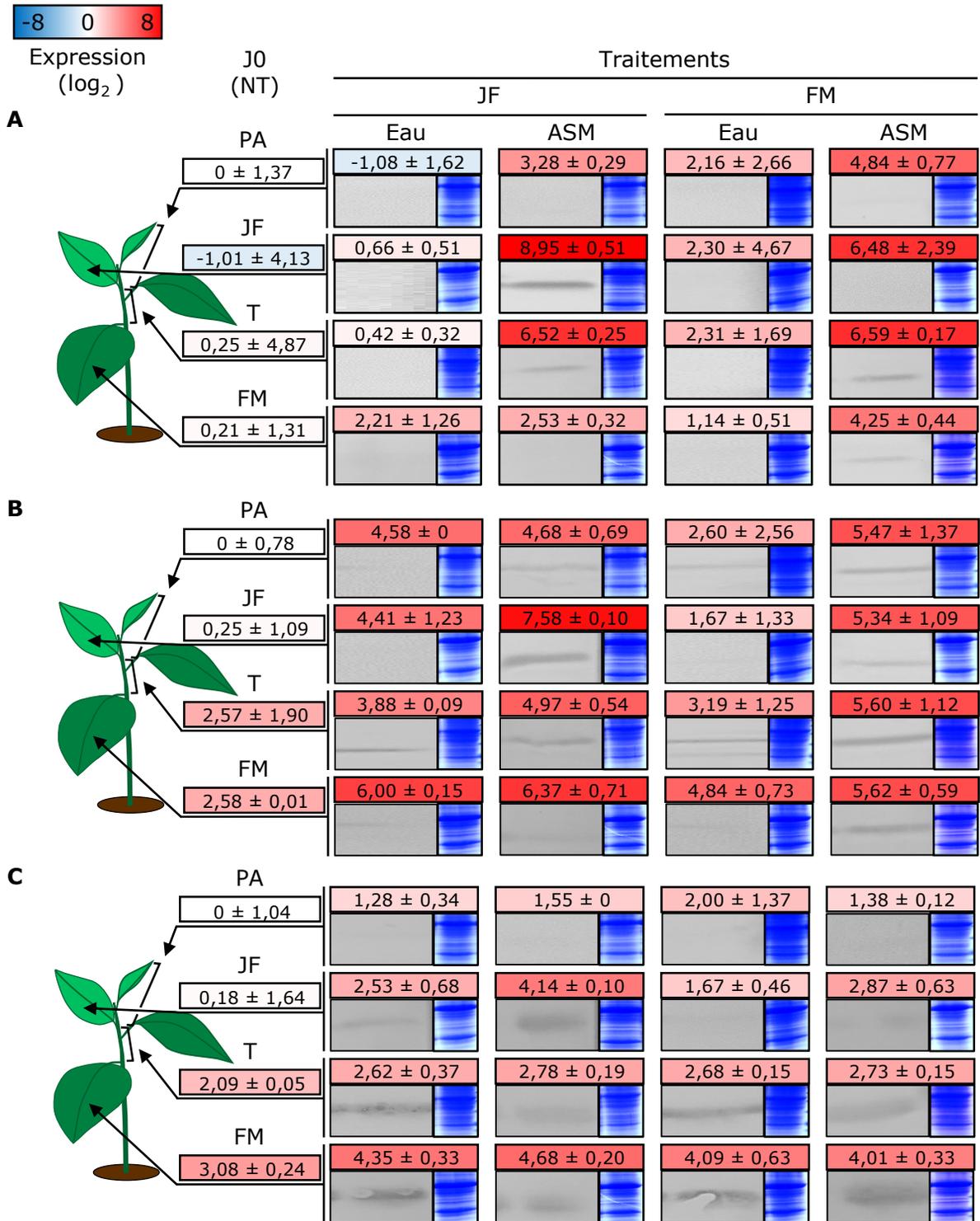


Figure 2.4.4 : Expression relative et accumulation protéique des MdAGGs (A), MdPR-2 (B) et MdPR-10 (C) dans la partie apicale (PA), la jeune feuille (JF), la tige (T) et la feuille mature (FM) de semis de pommier 5 jours après un traitement à l'ASM ou à l'eau de la JF ou de la FM. Chaque valeur dans les encadrés colorés correspond à la moyenne (\pm écart-type) de l'expression (log₂ ratios), et les encadrés situés en dessous correspondent à l'immunodétection des protéines correspondantes (à gauche) et à la coloration du gel au bleu de Coomassie (à droite). Les données d'expression et d'immunodétection sont respectivement issues ou représentatives de 2 répétitions biologiques de 2 expériences indépendantes. Chaque répétition biologique est constituée d'un pool de 10 organes de semis différents. Les valeurs d'expression de chaque gène ont été rapportées à la moyenne des PA de plantes non-traitées au jour 0. Les couleurs bleu, blanche et rouge indiquent des niveaux d'expression inférieurs, égaux ou supérieurs à ceux du calibrateur. Pour l'analyse protéique, 15 μ g de protéines totales sont chargés par puits.

accumulation des protéines correspondantes 1 et 2 jours respectivement après le traitement. L'induction des *MdAGGs* et de *MdPR-2* par l'ASM se maintient à un niveau élevé durant toute la cinétique alors que celle de *MdPR-10* atteint un pic d'expression à 2 jours puis chute au-delà. De plus, les différences de niveaux d'expression entre les deux traitements (ASM/eau) sont plus élevées pour les *MdAGGs* (250 fois plus de transcrits) que pour *MdPR-2* et *MdPR-10* (respectivement 60 et 16 fois plus de transcrits). Concernant l'accumulation protéique dans les échantillons issus de plantes traitées à l'eau, seules les *MdAGGs* sont indétectables durant toute la cinétique contrairement à *MdPR-2* et *MdPR-10* détectées respectivement 5 et 3 jours après le traitement. Cette accumulation de *MdPR-2* et *MdPR-10* durant l'expérience dans des tissus non stimulés par l'ASM peut être attribuée à la maturation de la feuille traitée (résistance ontogénique).

2.4.4 Comportement systémique après une élicitation locale à l'ASM

L'induction et l'accumulation des *MdAGGs*, de *MdPR-2* et de *MdPR-10* ont été analysées dans les différentes parties aériennes des semis de pommier, 5 jours après le traitement d'un seul organe (JF ou FM) à l'ASM ou à l'eau (Figure 2.4.4). Si on s'intéresse à l'organe directement traité, on observe que la JF réagit plus fortement à l'application d'ASM que la FM, que ce soit au niveau transcriptionnel ou protéique (Figure 2.4.4A). Quel que soit l'organe traité à l'ASM, les *MdAGGs* sont induites et produites dans la tige. Le traitement de la JF n'a pas d'impact sur la transcription et la traduction des *MdAGGs* dans la FM, alors que le traitement de la FM déclenche une surexpression des *MdAGGs* dans la JF, qui n'aboutit cependant pas à une quantité de protéines détectable par western blot. Une surexpression des *MdAGGs* est observée dans la PA quelle que soit la feuille traitée à l'ASM, mais sans détection des protéines associées. Ces résultats suggèrent que l'ASM déclenche une induction systémique de l'expression des *MdAGGs*, mais que les protéines ne sont détectées que lorsque de forts niveaux d'expression sont atteints.

Concernant *MdPR-2*, la JF semble mieux réagir au traitement ASM que la FM en comparaison du témoin eau (Figure 2.4.4B). Cependant, lorsque la JF est traitée à l'ASM il n'y a pas d'induction dans les autres organes (PA et FM) à l'exception de la tige (T) dans laquelle une légère surexpression du gène est observée. A l'inverse, le traitement de la FM par l'ASM provoque une induction systémique du gène dans tous les autres organes (T, JF et PA), qui se concrétise par une accumulation plus forte de la protéine dans ces derniers.

La *MdPR-10* semble peu réagir au traitement ASM à l'exception de la JF lorsque celle-ci a reçu le traitement (Figure 2.4.4C). Aucune induction systémique du gène et de la protéine ne semble avoir lieu, quelle que soit la feuille traitée à l'ASM (JF ou JM), ce qui est en accord avec

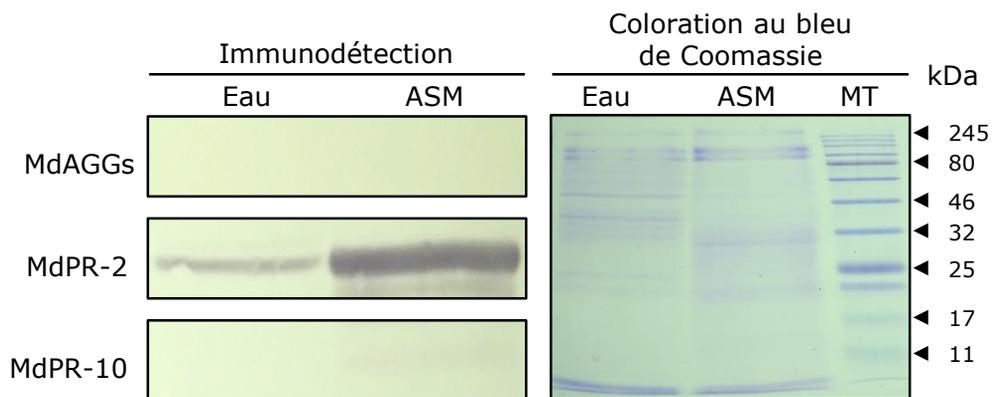


Figure 2.4.5 : Immunodétection des MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10 dans des extraits de fluides apoplastiques obtenus à partir de jeunes feuilles de semis de pommier Golden Delicious 3 jours après un traitement à l'ASM ou à l'eau. 5 µg de protéines totales chargés par puits. Résultats représentatifs de 2 répétitions biologiques indépendantes. MT: marqueur de taille.

la chute d'expression observée au-delà de 2 jours après traitements à l'ASM sur des semis entièrement traités (Figure 2.4.1A).

L'ensemble de ces résultats montre que i) la JF répond mieux au traitement ASM que la FM, ii) l'ASM induit un signal systémique (en particulier lorsque la FM est traitée) aboutissant à l'induction des MdAGGs et MdPR-2 dans les autres organes et iii) les protéines MdAGGs ne sont détectables que lorsque que de hauts niveaux d'expression des gènes sont atteints.

2.4.5 Détection apoplastique des protéines dans les feuilles traitées à l'ASM

L'induction systémique des MdAGGs dans les semis traités à l'ASM pourrait être attribuée à un transport protéique apoplastique de l'organe traité vers les organes distants. Pour tester cette hypothèse, les fluides extracellulaires de feuilles de semis de pommier traités à l'ASM ou à l'eau ont été analysés en western blot (Figure 2.4.5). Bien que la protéine MdPR-2 soit accumulée dans les fluides extracellulaires (et plus fortement après traitement ASM), les MdAGGs et MdPR-10 n'y sont pas détectées, ce qui suggère que le transport protéique apoplastique n'est pas responsable de l'accumulation systémique des MdAGGs. Ces protéines pourraient migrer vers les autres organes en empruntant des voies symplastiques ou bien seraient produites sur place en réponse à un signal mobile qui déclencherait l'expression des gènes *MdAGGs*. Concernant MdPR-2, sa présence dans l'apoplaste suggère que son accumulation systémique est provoquée soit par une migration apoplastique de la protéine vers les autres organes, soit par le biais d'un signal mobile qui déclencherait l'expression de ces gènes, soit par les deux.

2.4.6 Etude du comportement des MdAGGs au regard de la persistance d'action de l'ASM vis-à-vis du feu bactérien

La forte induction et accumulation des MdAGGs provoquée par l'ASM suggère un rôle de ces lectines dans la résistance induite du pommier, notamment vis-à-vis d'*E. amylovora*. Nous avons évalué en parallèle la persistance d'action de l'ASM pour la protection vis-à-vis de *Ea* WT et l'accumulation des transcrits et des protéines de MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10, afin de vérifier si leur régulation est associée à une résistance accrue au feu bactérien (Figure 2.4.6). Dans cette expérience, les JF de semis de pommier sont inoculées ou prélevées 7, 14 ou 21 jours après un unique traitement à l'ASM ou à l'eau ; ou 21 jours après la dernière pulvérisation d'une

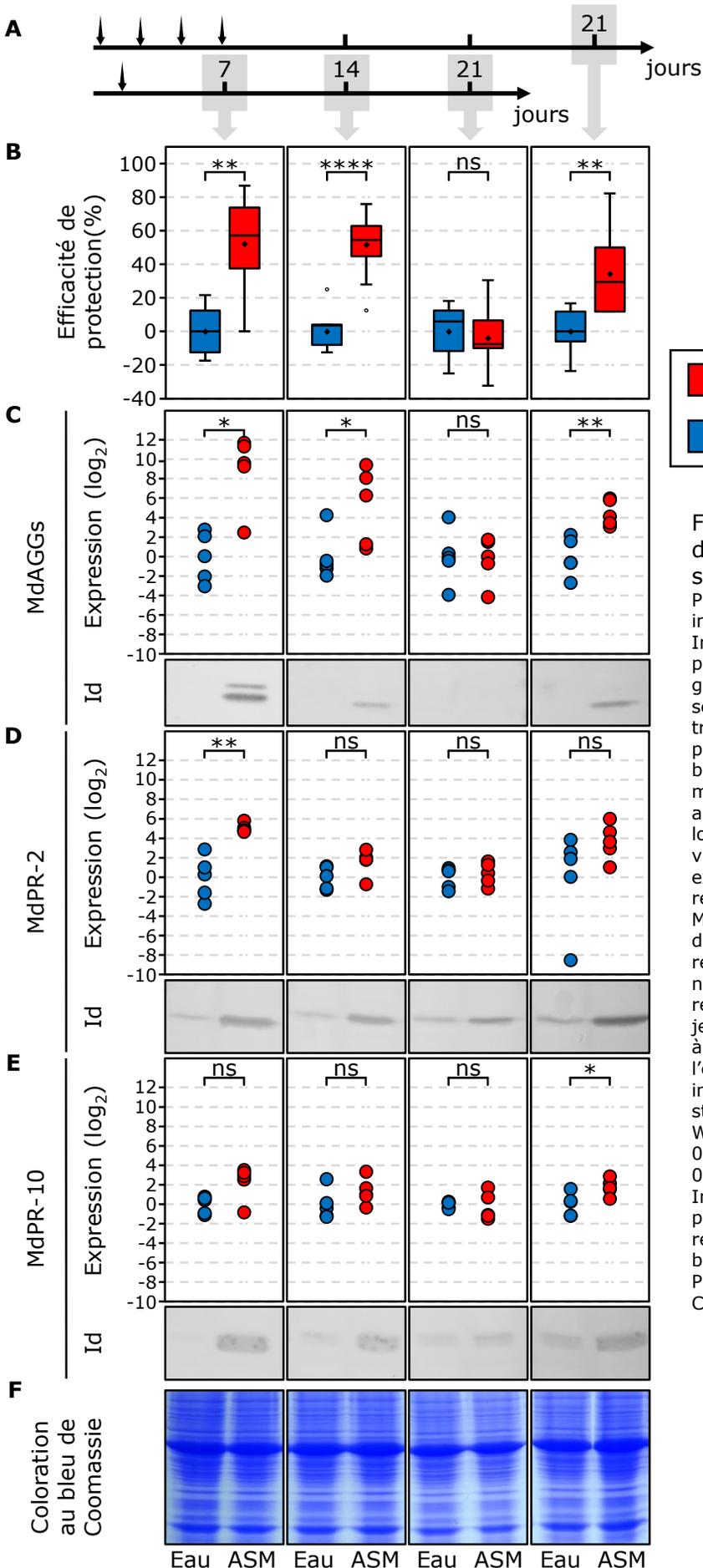


Figure 2.4.6 : Persistance d'action de l'ASM dans des semis de Golden Delicious. (A) Plan expérimental. Traitements ASM indiqués par des flèches noires. Inoculation par *E. amylovora* et prélèvements indiqués par les flèches grises. (B) Efficacité de protection 3 semaines après inoculation de semis traités à l'ASM ou à l'eau, calculées à partir de l'incidence mesurée sur des blocs de 10 plantes. Boxplots avec moyennes, médianes et les valeurs aberrantes indiqués resp. par des losanges, des lignes et des cercles vides (n=9 à 12 réparties sur 3 à 4 expériences). (C), (D), (E) Expression relative et immunodétection des MdAGGs MdPR-2 et MdPR-10 resp. dans de jeunes feuilles. Expression relative : chaque point correspond au niveau d'expression relative dans une répétition biologique (pool de 5 jeunes feuilles de semis) par rapport à la moyenne des plantes traitées à l'eau (n=5 sur 2 expériences indépendantes). Différences statistiques établies par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$; ns : non-significatif). Immunodétection : 10 μg de protéines totales/puits ; résultats représentatifs de 2 répétitions biologiques indépendantes. (F) Protéines totales colorées au bleu de Coomassie.

succession de 4 traitements espacés de 2 jours (Figure 2.4.6A). Les efficacités de protection de l'ASM, mesurées 3 semaines après inoculation, montrent qu'un seul traitement à l'ASM protège contre *Ea* WT si l'inoculation est réalisée jusqu'à 2 semaines post-traitement. Une perte d'efficacité totale de l'ASM est observée lorsque les plantes sont inoculées la troisième semaine après le traitement (Figure 2.4.6B). En revanche, 4 traitements successifs d'ASM rétablissent une protection significative contre *Ea* WT sur une période de 3 semaines après le dernier traitement. Dans toutes les situations pour lesquelles l'ASM protège significativement contre le feu bactérien, une induction significative des *MdAGGs* et une accumulation des protéines correspondantes sont observées (Figure 2.4.6C). Cette association (protection/induction du marqueur de défense) n'est pas retrouvée avec MdPR-2, l'expression du gène n'étant significativement induite qu'à 7 jours post-traitement et la teneur en protéine étant toujours plus abondante après traitement ASM, quelle que soit la modalité de traitement appliquée. Cette absence de corrélation est également retrouvée pour MdPR-10 au niveau de l'expression du gène, alors que l'accumulation de la protéine semble, elle, corrélée à l'efficacité de protection de l'ASM. L'ensemble de ces résultats suggèrent que, comparées à MdPR-2 et MdPR-10, les *MdAGGs* constituent de meilleurs marqueurs de la persistance d'action de l'ASM en tenant compte à la fois de l'accumulation des transcrits et des protéines.

2.4.7 Induction des *MdAGGs* par l'ASM dans différents organes de l'arbre en verger

Les résultats précédents ont montré que les gènes *MdAGGs* sont induits en réponse à l'ASM dans des semis de pommier cultivés en conditions contrôlées, et que leur expression est corrélée à la résistance induite vis-à-vis du feu bactérien. Nous avons cherché ici à déterminer si l'ASM active également leur expression dans différents organes de la variété Golden Delicious plantée en verger. Les organes ciblés (feuilles de rosettes, première feuille, seconde feuille et feuille mature de la pousse, fleurs et peau du fruit), susceptibles d'être infectés par *E. amylovora*, ont été analysés à différents stades phénologiques : du stade début de floraison (E2-F) jusqu'au début du développement du fruit (Figure 2.4.7). Les *MdAGGs* sont surexprimés 3 jours après traitement à l'ASM dans tous les organes foliaires traités, à tous les stades, sauf au stade « fruit » où ils sont sous-exprimés par rapport au traitement eau. Dans les fleurs, au stade précoce E2-F, un fort niveau d'expression des *MdAGGs* est mesuré dans des fleurs traitées à l'eau, équivalent à celui des fleurs traitées à l'ASM. Du stade F2-G au stade J, les fleurs et fruits traités à l'ASM ont tendance à sur-exprimer les *MdAGGs* malgré une baisse progressive du niveau d'induction qui diminue au fur et à mesure du développement saisonnier de la pousse, jusqu'à atteindre des niveaux presque identiques au traitement eau (stade I et J). Au stade « fruit », comme pour les feuilles, la peau de fruits issus de pommiers traités à l'ASM sous-exprime les *MdAGGs*. Ainsi, les résultats montrent que les pousses en verger réagissent de la même manière

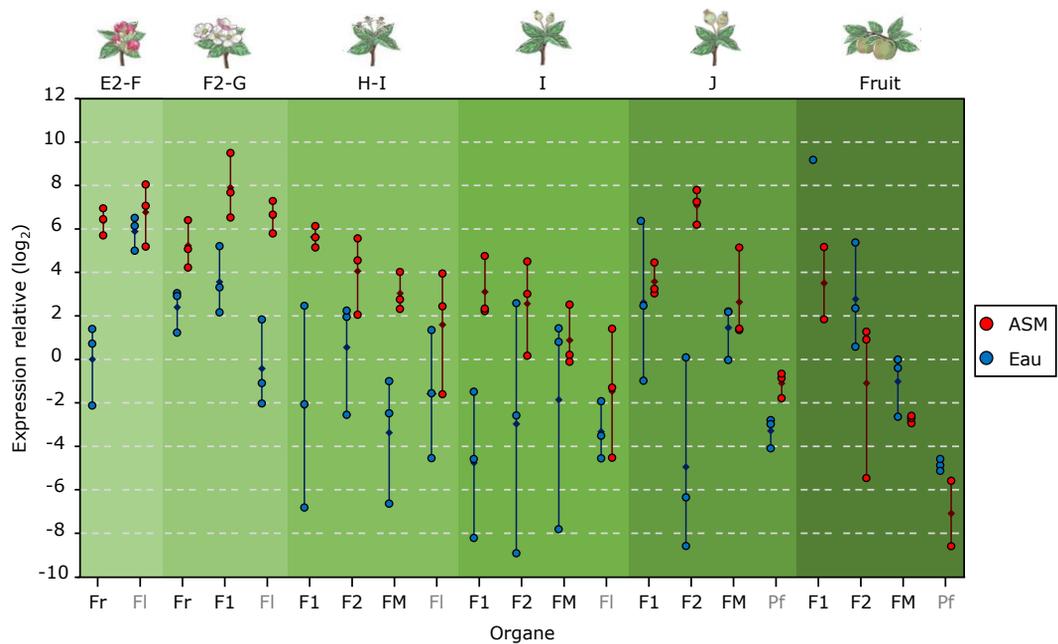


Figure 2.4.7 : Niveaux d'expression relatifs des *MdAGGs* dans différents organes (Fr : feuilles de rosettes, F1 : 1^{ère} feuille de la pousse, F2 : 2^{ème} feuille de la pousse, FM : feuille mature de la pousse, Fl : fleurs et Pf : peau du fruit) 3 jours après traitements à l'ASM ou à l'eau à différents stades phénologiques d'arbres de la variété Golden Delicious en verger. Chaque point = niveau d'expression relatif d'une répétition biologique constituée d'un pool de 5 organes, rapporté à la moyenne des Fr traitées à l'eau au stade E2-F. Pour chaque stade/organe/traitement, données issues de 1 à 3 répétitions biologiques d'une seule expérience. Les losanges indiquent les moyennes.

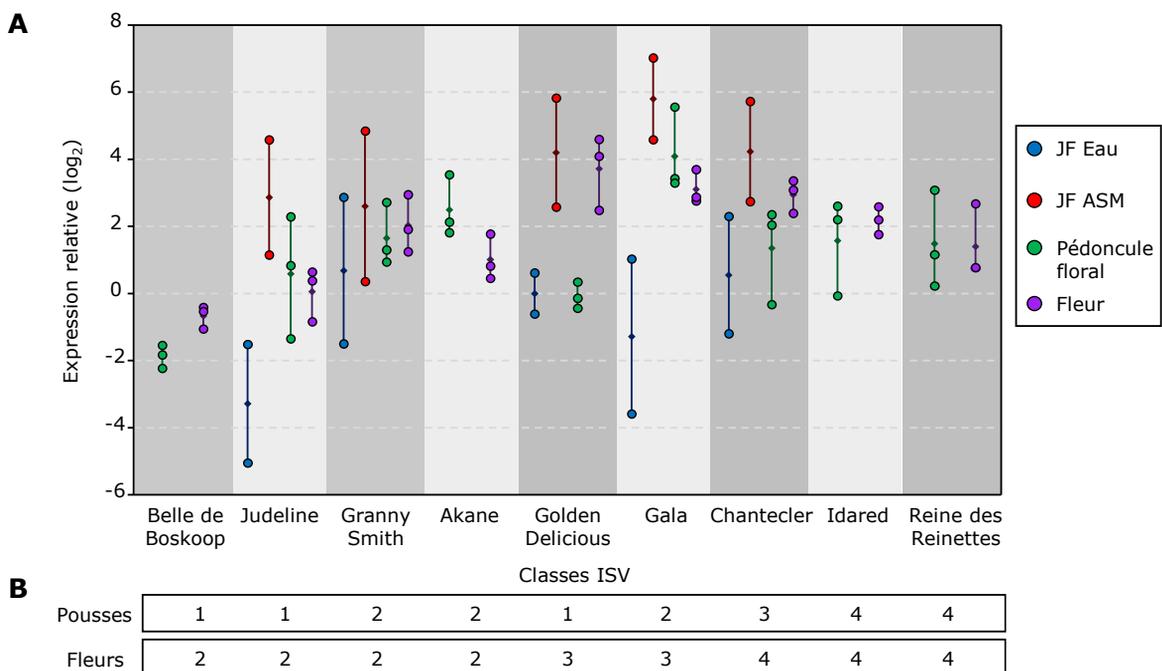


Figure 2.4.8 : Niveaux d'expression relatifs des *MdAGGs* dans différents organes issus de variétés présentant une sensibilité contrastée à *E. amylovora*. (A) Expression des *MdAGGs* dans les fleurs et pédoncules floraux prélevés au stade F2 de 9 variétés de pommier issus du verger, et dans les jeunes feuilles (JF) 3 jours après traitement à l'ASM ou à l'eau issus de 5 plants greffés parmi les 9 variétés étudiées. Chaque point correspond au niveau d'expression relatif d'une répétition biologique (= un pool de 5 organes) rapportées à la moyenne des JF traitées à l'eau de la variété Golden Delicious. Pour chaque variété, organe et traitement, données issues de 2 à 3 répétitions biologiques d'une seule expérience pour les prélèvements de fleurs et pédoncules floraux et de 2 expériences indépendantes pour les prélèvements de JF. Les losanges indiquent les moyennes. (B) Indice de sensibilité variétale (ISV) sur pousses et fleurs des différentes variétés considérées (1, variété la moins sensible ; 4, variété la plus sensible ; Thibault et Le Lezec, 1990).

que les semis en conditions contrôlés seulement aux stades phénologiques précédant le développement du fruit. Par contre, l'ASM n'induit pas l'expression des *MdAGGs* dans les fleurs à tous les stades phénologiques et dans le fruit, ce qui suggère que les conditions d'induction des lectines diffèrent entre les organes reproducteurs et les organes végétatifs.

2.4.8 Expression basale des *MdAGGs* dans les fleurs et les pédoncules floraux de différentes variétés

Le niveau d'expression constitutif des *MdAGGs* est plutôt élevé dans les fleurs chez la variété Golden Delicious, ce qui suggère un rôle défensif dans les organes susceptibles d'être infectés par *E. amylovora*. Les fleurs constituant une voie d'entrée privilégiée d'*E. amylovora* dans l'arbre, nous avons cherché à savoir s'il existait une association de type corrélation positive entre le niveau d'expression basal des *MdAGGs* dans les fleurs et pédoncules floraux de 9 différentes variétés (Belle de Boskoop, Judeline, Granny Smith, Akane, Golden Delicious, Gala, Chantecler, Idared et Reine des Reinettes) et leur niveau de résistance au feu bactérien (Figure 2.4.8). Pour chaque variété, des rameaux ont été prélevés en verger au stade bouton rose (E2) et maintenus en conditions contrôlées jusqu'à prélèvement de leurs fleurs et pédoncules floraux au stade pleine floraison (F2). L'expression des *MdAGGs* a été mesurée dans ces tissus et comparée à celle de jeunes feuilles traitées à l'ASM ou à l'eau pour 5 des variétés étudiées, prélevées cette fois-ci sur de jeunes plants greffés (Judeline, Granny Smith, Golden Delicious, Gala et Chantecler). Les 9 variétés présentent des indices de sensibilité variétale (ISV) contrastés contre *E. amylovora* (Figure 2.4.8B), mais ils ne sont pas corrélés avec l'expression basale des *MdAGGs* dans les pédoncules et les fleurs (Figure 2.4.8A). Les variétés les plus sensibles (Golden Delicious, Gala, Chantecler, Idared et Reine des Reinettes) ont des niveaux d'expression similaires ou plus élevés que les variétés peu sensibles (Belle de Boskoop, Judeline, Granny Smith, Akane). Par contre, le niveau d'expression basal des *MdAGGs* est plus élevé dans les fleurs que dans les feuilles (traitement eau) au sein d'une même variété, pour les 5 testées. D'ailleurs, le niveau constitutif d'expression florale atteint même celui des feuilles traitées à l'ASM pour les variétés Granny Smith et Golden Delicious. De manière surprenante et comme décrit précédemment, les fleurs de Golden Delicious accumulent plus de transcrits de *MdAGGs* que les feuilles (traitement eau), alors que cette variété est plus sensible si elle est inoculée sur les fleurs que sur les pousses. Ainsi, l'expression des *MdAGGs* ne semble pas être associée à la résistance variétale. Il est néanmoins tentant de formuler l'hypothèse selon laquelle leur niveau d'expression constitutivement plus élevé dans les fleurs que dans les feuilles constitue une adaptation de ces organes particulièrement sensibles à l'infection bactérienne.

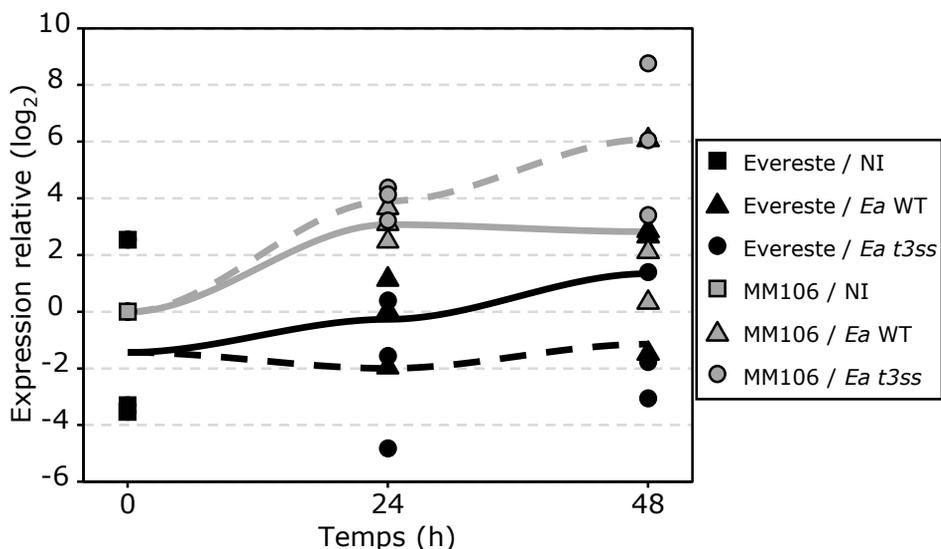
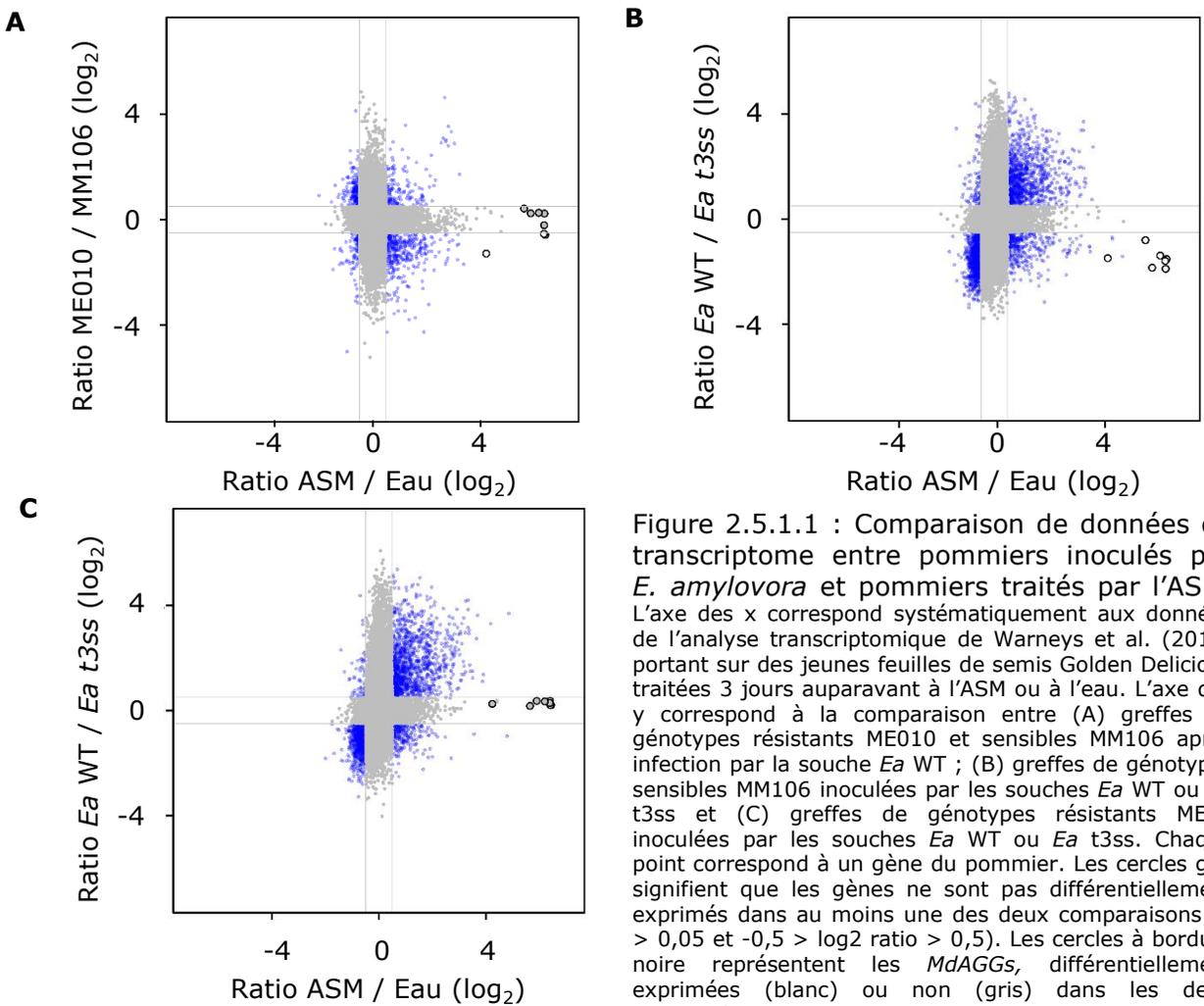


Figure 2.5.1.2 : Cinétique d'expression relative des *MdAGGs* pendant 48 h dans des jeunes feuilles de greffes MM106 et Everest infiltrées par *Ea* WT ou *Ea* t3ss. Les courbes représentent la tendance moyenne des niveaux d'expression obtenus avec *Ea* WT (traits pleins) ou *Ea* T3SS (traits pointillés), selon la méthode de Loess (span = 0,5). Les données sont issues de 3 répétitions biologiques indépendantes. Chaque répétition biologique est constituée d'un pool de 5 jeunes feuilles issues de plantes différentes. Pour chaque expérience, l'expression a été rapportée à celle issue de MM106 non infiltrées, échantillonnées à T0. NI : non infiltré.

2.5 Modulation de l'expression des *MdAGGs* en réponse à l'infection par *E. amylovora*

2.5.1 Modulation T3SS-dépendante après infection de génotypes résistants ou sensibles

Afin de mieux comprendre comment les *MdAGGs* se comportent en situation de résistance et de sensibilité, nous avons étudié leur modulation au sein du transcriptome de deux génotypes à sensibilité contrastée (le résistant ME010 et le sensible MM106) 24 h après infection par une souche sauvage (*Ea* WT) ou une souche mutante non pathogène affectée dans la biosynthèse de son T3SS (*Ea t3ss*). Ces données transcriptomiques ont été comparées à celles acquises par Warneys et al. (2018), comparant le transcriptome de semis 3 jours après traitement à l'ASM par rapport à l'eau (Figure 2.5.1.1). En comparant le transcriptome de ME010 à celui de MM106 24 h après infection par *Ea* WT, on peut constater que la plupart des *MdAGGs* induites par l'ASM ne sont pas différentiellement exprimées entre le génotype résistant et sensible, l'une d'entre elles est même plus exprimée chez le sensible (Figure 2.5.1.1A). En revanche, une répression dépendante du T3SS des *MdAGGs* est observée chez le génotype sensible 24 h après infection par *Ea* WT, puisque le ratio *Ea* WT/*Ea t3ss* est négatif (Figure 2.5.1.1B). Cette répression T3SS-dépendante n'est pas observée dans le génotype résistant ME010 puisque les *MdAGGs* ne sont pas différentiellement exprimées entre des tissus infectés par *Ea* WT et *Ea t3ss* (Figure 2.5.1.1C). En considérant l'ensemble des résultats, les *MdAGGs* semblent réprimées par les effecteurs de type III d'*Ea* WT chez le génotype sensible MM106 uniquement, mais atteignent un niveau d'expression identique à celui d'un génotype résistant après infection. Ainsi, les *MdAGGs* ne semblent pas impliquées dans la résistance génétique de ME010 mais la capacité de *Ea* WT à les réprimer chez le génotype sensible pourrait peut-être favoriser la maladie chez ce dernier. Pour confirmer ces hypothèses basées sur les données transcriptomiques, les niveaux d'expression des *MdAGGs* ont été mesurés par RT-qPCR dans le génotype sensible MM106 et le résistant Everest (parents du résistant ME010), 24 et 48 h après infection par *Ea* WT et *Ea t3ss* (Figure 2.5.1.2). Chez le génotype sensible, une induction de l'expression des *MdAGGs* est observée 24 h après infection des deux souches. Cette induction progresse 48 h après infection par la souche *Ea t3ss* mais pas avec la souche *Ea* WT, suggérant une répression de l'expression par cette dernière. Même si l'expression des *MdAGGs* est plus élevée avec *Ea t3ss* que *Ea* WT à 24 h, la plus forte répression T3SS-dépendante est observée 48 h après infection par *Ea* WT. Ce résultat, en accord avec ce qui est observé par microarray, semble confirmer qu'un effecteur de type III est impliqué dans la répression des *MdAGGs* chez le génotype sensible.

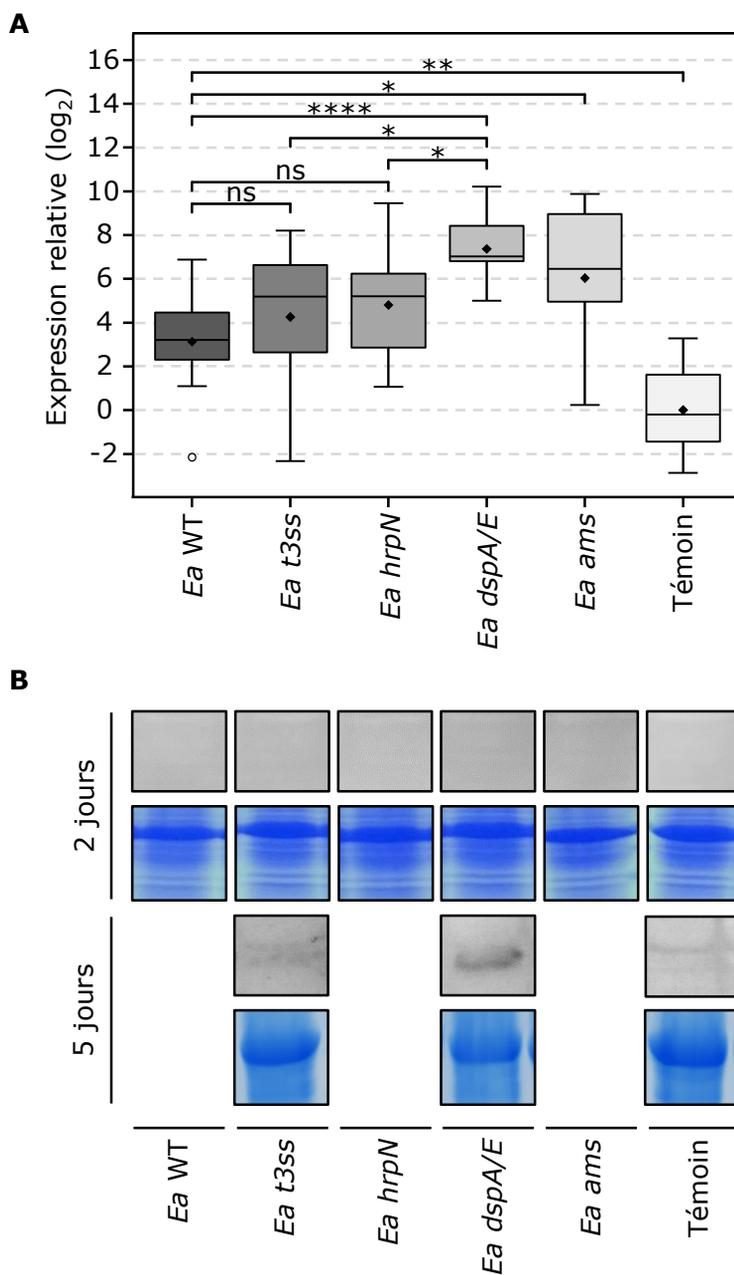


Figure 2.5.2 : Modulation de l'expression (A) et de l'accumulation (B) des MdAGGs par différents mutants d'*E. amylovora* dans des semis Golden Delicious. (A) Niveaux d'expression relative des MdAGGs 2 jours après infiltration par *Ea* WT, *Ea t3ss*, *Ea hrpN*, *Ea dspA/E*, *Ea ams* (10^7 cfu.ml⁻¹) et le témoin eau. Boxplots avec moyennes, médianes et les valeurs aberrantes indiqués respectivement par des losanges, des lignes et des cercles vides. Données d'expression issues de 10, 8 et 6 expériences indépendantes pour l'infiltration par *Ea t3ss*, *Ea* WT et le témoin, par *Ea hrpN* et *Ea dspA/E* et par *Ea ams*, respectivement. Chaque expérience comporte 1 à 3 répétitions biologiques par infiltration (14 et 10 répétitions biologiques respectivement pour *Ea t3ss* et pour les autres mutants et le témoin). Expressions rapportées à la moyenne de celles issues de plantes infiltrées par le témoin. Différences statistiques établies deux à deux par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$; ns : non-significatif). (B) Immunodétection des MdAGGs dans les feuilles 2 jours après infiltration par les mêmes modalités ; et 5 jours après infiltration par *Ea t3ss* et *Ea dspA/E* à 10^8 cfu.ml⁻¹ et le témoin eau. 10 et 50 μ g de protéines totales par puits pour respectivement les échantillons prélevés 2 et 5 jours après infiltration. Protéines totales colorées au bleu de Coomassie. Résultats représentatifs de 2 répétitions biologiques indépendantes.

Dans le génotype résistant Evereste, deux éléments sont en contradiction avec les données transcriptomiques obtenues avec le génotype résistant ME010 : la souche *Ea* WT induit l'expression des *MdAGGs* par rapport à la souche *Ea t3ss* 24 h après infection, et ce résultat se confirme à 48 h. Le niveau d'expression des *MdAGGs* atteint chez le génotype résistant est inférieur à celui du génotype sensible 24 h après infection par la souche *Ea* WT (non différentiel dans l'analyse transcriptomique). Néanmoins, un niveau d'expression similaire des *MdAGGs* est de nouveau observé entre les 2 génotypes 48 h après infection par *Ea* WT, suggérant un éventuel décalage dans le processus infectieux entre l'analyse microarray et cette analyse par RT-qPCR.

Ainsi, ces données semblent confirmer que les *MdAGGs* ne sont pas impliquées dans la résistance des génotypes ME010/Evereste, et que leur répression T3SS-dépendante pourrait être un facteur de succès de la progression de la maladie chez le génotype sensible MM106.

2.5.2 Rôle des facteurs de pathogénicité dans la répression des *MdAGGs* dans un génotype sensible

Pour identifier précisément les éléments bactériens responsables de la répression des *MdAGGs*, nous avons analysé leur expression et leur accumulation dans des feuilles de semis Golden Delicious 48 h après infiltration par *Ea* WT et divers mutants affectés dans leur pouvoir pathogène : biosynthèse de l'amylovorane (*Ea* *ams*), du T3SS (*Ea t3ss*), des effecteurs DspA/E (*Ea dspA/E*) ou hrpN (*Ea hrpN*) (Figure 2.5.2). Les résultats montrent que les feuilles infiltrées par *Ea* WT ont un niveau d'expression des *MdAGGs* plus élevé par rapport au témoin sans bactérie (Figure 2.5.2A). Le niveau d'expression observé avec les mutants *Ea t3ss* et *Ea hrpN* est légèrement plus élevé par rapport à la souche *Ea* WT, mais cette différence n'est pas significative. Ce n'est cependant pas le cas avec les mutants *Ea dspA/E* et *Ea ams* pour lesquels le niveau d'expression des *MdAGGs* est significativement plus élevé. De plus, les feuilles inoculées par *Ea dspA/E* ont un niveau d'expression des *MdAGGs* significativement plus élevé par rapport à celles inoculées par *Ea t3ss* ou *Ea hrpN*. L'ensemble des résultats suggèrent ainsi que l'effecteur DspA/E et l'amylovorane sont impliqués dans la répression des *MdAGGs*, dont l'induction semble être provoquée par un ou plusieurs facteurs bactériens non déterminés de la souche *Ea* WT. Au niveau protéique, aucune *MdAGG* n'est détectée 48 h post-infiltration, ce qui suppose des niveaux d'expression trop faibles ou une latence entre l'expression et la traduction (Figure 2.5.2B). La présence des *MdAGGs* n'a pu être détectée que 5 jours après infiltration d'un inoculum 10 fois plus concentré en bactéries. Cette expérience n'est possible que pour les deux mutants incapables d'induire la mort cellulaire, *Ea t3ss* et *Ea dspA/E*, les autres souches nécrosant complètement la feuille prélevée et entravant donc l'analyse protéique. Dans ces conditions, les *MdAGGs* sont légèrement détectées dans les extraits protéiques de feuilles

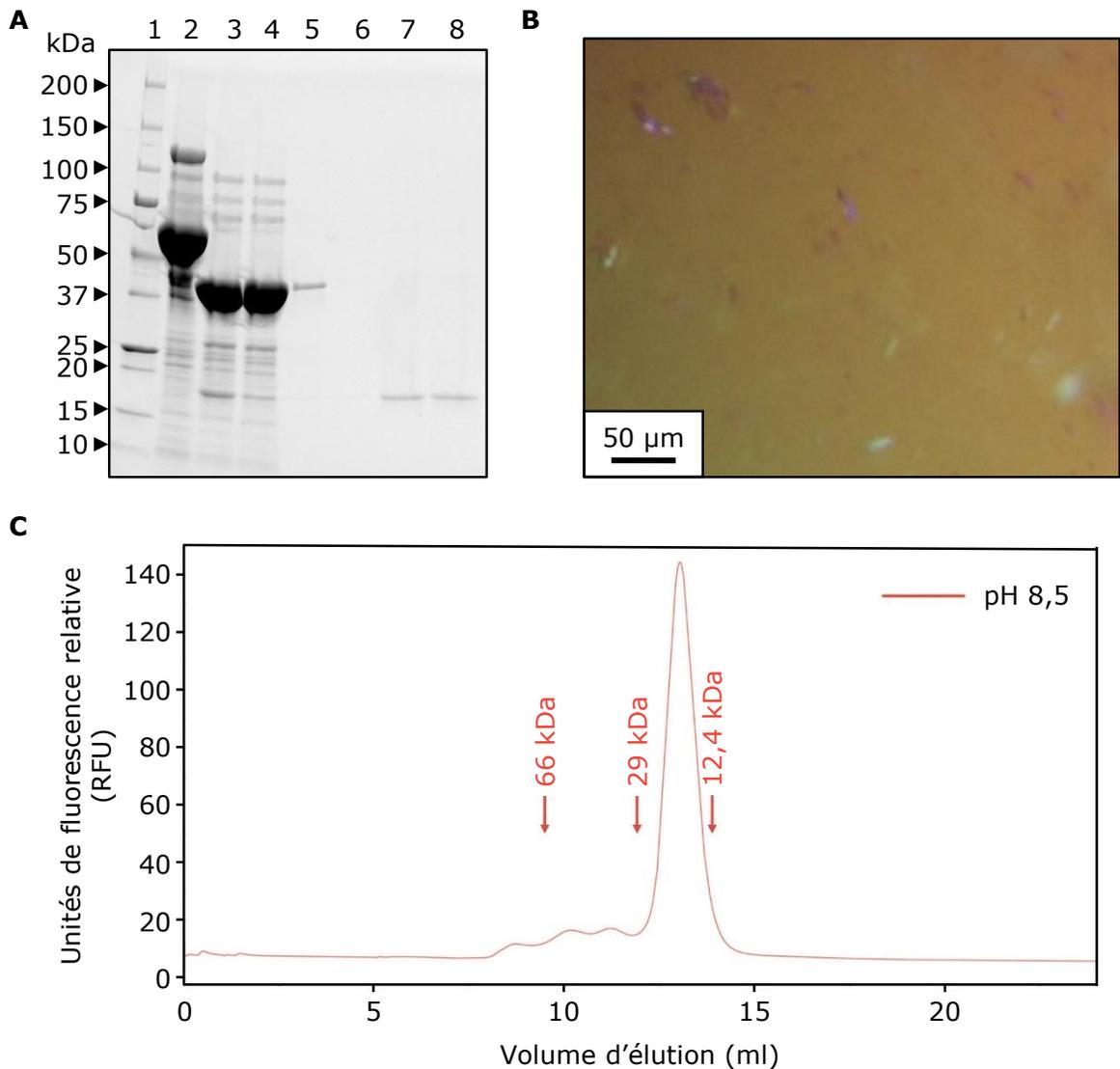


Figure 2.6.1 : Purification, solubilisation et chromatographie d'exclusion stérique de la protéine recombinante MdAGG10. (A) Migration SDS-PAGE des échantillons obtenus après chaque étape de purification (1 : marqueur de taille, 2 : His-MBP-MdAGG10 après chromatographie d'affinité, 3 : après clivage par la protéase TEV, 4 : fraction soluble après clivage par la protéase TEV, 5 et 6 : fractions solubles de lavage, 7 et 8 : MdAGG10 purifiée sous forme cristalline). (B) Forme microcristalline de la MdAGG10 purifiée visualisée à la lumière polarisée. (C) Chromatographie d'exclusion stérique (Superdex 75 10/300 GL) de la MdAGG10 solubilisée dans un tampon Tris 50 mM + NaCl 150 mM (pH 8,5). Le poids moléculaire de la MdAGG10 calculé à partir de sa séquence d'acides aminés est de 19,1 kDa.

infiltrées par *Ea t3ss* et sont visibles en abondance dans celles inoculées par *Ea dspA/E*, confirmant les niveaux transcriptionnels précédemment obtenus pour ces deux souches.

2.6 Etude fonctionnelle du rôle des MdAGGs *in vitro*

Les MdAGGs sont associées à la résistance induite par les SDP contre *E. amylovora*, qui à l'inverse les réprime dans un génotype sensible dans les premiers jours de l'interaction. On peut donc faire l'hypothèse qu'elles représentent des effecteurs de résistance, et leur annotation en tant que lectine, suggère qu'elles pourraient agglutiner les cellules bactériennes en se fixant à des polysaccharides de surface bactériens. Cette hypothèse fait écho aux travaux de Romeiro et al. (1981a, b) décrivant une mystérieuse protéine nommée « maline » comme un facteur de résistance du pommier capable d'agglutiner *E. amylovora* à pH acide, avec une forte affinité pour le LPS et l'EPS bactérien.

2.6.1 Synthèse de la MdAGG10 recombinante

Pour évaluer le rôle biologique des MdAGGs contre *E. amylovora*, l'effet de la protéine MdAGG10 a été testé *in vitro* sur des suspensions bactériennes. La méthode d'extraction des MdAGGs présentée au §2.3.3 est réalisée dans des conditions dénaturantes, ce qui compromet l'étude de leur fonction biologique à partir d'extraits protéiques totaux. De plus, des étapes de purification seraient nécessaires pour attribuer définitivement une fonction biologique aux MdAGGs. Nous avons donc choisi de produire une MdAGGs recombinante. Notre choix s'est porté sur la protéine MdAGG10, puisque sa séquence a la plus forte similarité avec les autres MdAGGs et que son expression est particulièrement induite suite à l'application d'ASM (Warneys et al., 2018). Des essais sur levures (*Pichia pastoris*) ont abouti à un échec, avec un effet létal de la production de la protéine dans les levures transformées (données non présentées). Nous avons donc produit et purifié la protéine recombinante 6His-MBP-MdAGG10 à partir d'*E. coli*. Cette protéine chimérique présente l'avantage de pouvoir être purifiée sur colonne de nickel (grâce à l'étiquette 6His), et la MBP (*Maltose-Binding Protein*) est fréquemment utilisée pour augmenter la production et favoriser la solubilisation de la protéine cible chez *E. coli*. Un site de clivage protéolytique sensible à la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*) a également été inséré en partie N-terminale de MdAGG10, ce qui permet, après purification de la protéine chimérique, d'éliminer l'étiquette 6His-MBP. Nous avons constaté que ce clivage protéolytique provoque une agrégation cristalline spontanée de MdAGG10, permettant la séparation de la protéine clivée de l'étiquette soluble 6His-MBP par simple centrifugation (Figure 2.6.1A, B). La solubilisation des cristaux de MdAGG10 a pu être réalisée par un changement de pH élevé (NaOH pH 12), immédiatement suivi par une dilution dans des solutions tamponnées à des pH inférieurs. Lorsque cette dilution est effectuée dans un tampon à pH 8,5 (50 mM de Tris/HCl, 150 mM de NaCl), la

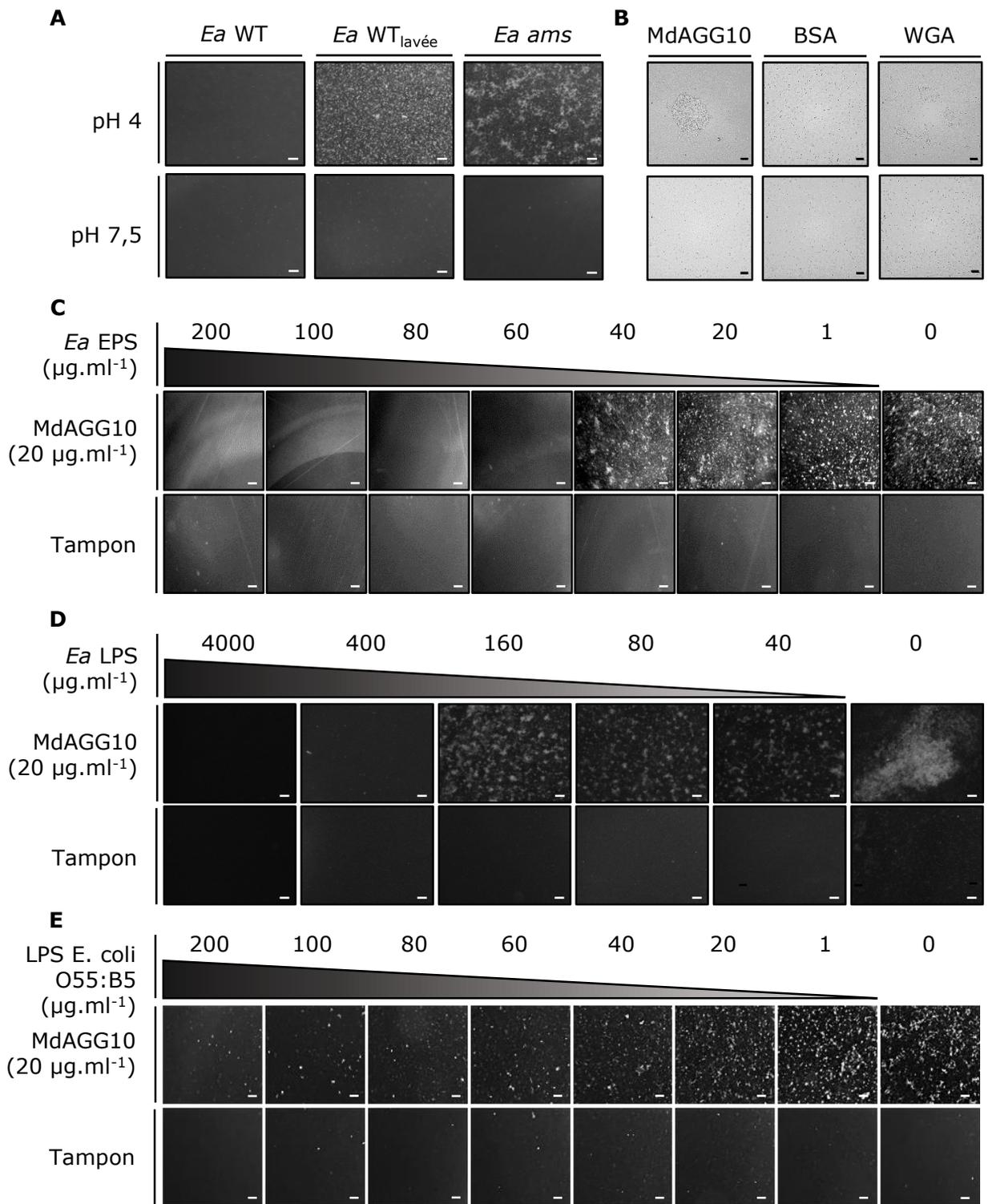


Figure 2.6.2 : Tests d'agglutination par MdAGG10 réalisés sur *E. amylovora*. Les mélanges contiennent la protéine recombinante MdAGG10, de la BSA ou de la WGA à 20 µg.ml⁻¹ dans des conditions acides (pH 4) ou neutres (pH 7,5) avec des bactéries à 10⁸ cfu.ml⁻¹. Photographies prises 30 à 60 minutes après le mélange de la suspension bactérienne et de la solution protéique incubée à température ambiante. (A) Vue macroscopique des suspensions bactériennes, lavées (*Ea* WT_{lavée}) ou non (*Ea* WT) de l'EPS diffus, et de *Ea ams*, mélangées avec la MdAGG10 à pH 4 ou 7,5 (barre d'échelle : 200 µm). (B) Vues microscopiques de *Ea ams* incubée avec la MdAGG10, la BSA ou la WGA à pH 4 ou 7,5 (barre d'échelle : 10 µm). (C, D, E) Vues macroscopiques d'*Ea ams* incubée à pH 4 avec la MdAGG10 ou un tampon Tris-sulfate d'ammonium, tous deux pré-incubés avec une gamme de concentrations d'EPS (C, de 0 à 200 µg.ml⁻¹, barre d'échelle : 100 µm), de LPS d'*E. amylovora* ou d'*E. coli* (respectivement D et E, barre d'échelle : 200 µm) purifiés respectivement à partir d'*Ea* WT, d'*Ea ams* ou d'*E. coli* (solution commerciale). L'ensemble des résultats est représentatif de 2 expériences indépendantes.

chromatographie d'exclusion révèle la présence d'un pic principal comportant la protéine MdAGG10 sous forme monomérique et la présence de traces d'espèces multimériques de plus haut poids moléculaire (Figure 2.6.1C). Il est important de noter que cette analyse montre que le traitement au NaOH ne provoque pas de dégradation importante de MdAGG10, ce qui valide l'utilisation ultérieure de la protéine ainsi préparée pour son analyse fonctionnelle.

2.6.2 Tests d'agglutination bactérienne *in vitro*

Afin de déterminer si la protéine recombinante MdAGG10 interagit avec *E. amylovora*, des tests d'agglutination ont été réalisés en mélangeant des suspensions de bactéries sauvages (*Ea* WT) et mutantes dépourvues d'EPS (*Ea ams*) avec la protéine recombinante solubilisée à pH acide (4) ou neutre (7,5 ; Figure 2.6.2A). L'EPS d'*Ea* WT étant composé d'une fraction fermement attachée au corps bactérien (et constituant la capsule) et d'une fraction plus diffuse, la suspension bactérienne a parfois été centrifugée pour la débarrasser de l'EPS diffus (notée *Ea* WT_{lavée} par la suite).

Après 30 à 60 min d'incubation, les suspensions bactériennes d'*Ea ams* incubées avec MdAGG10 forment des agglomérats, mais uniquement lorsque la protéine est préparée à pH 4. Pour *Ea* WT, ces agglomérats se forment dans les mêmes conditions de pH uniquement si la bactérie est lavée de son EPS diffus (*Ea* WT_{lavée}). Par contre, aucune agglutination n'est visible à pH 7,5, même après plusieurs heures d'attente. Des préparations de protéines MdAGG10 effectuées à des pH intermédiaires ont pu montrer que l'agglutination de la souche *Ea ams* se produit seulement pour des pH inférieurs ou égaux à 4,8 (données non présentées). Aucune agrégation spontanée n'a été observée à pH 4 dans une solution de MdAGG10 sans bactérie (données non présentées), et une observation au microscope des agglomérats formés dans le mélange *Ea ams*/MdAGG10 à pH 4 montre qu'il s'agit bien d'une agglutination bactérienne (Figure 2.6.2B). Ce phénomène d'agglutination n'est pas observé à pH 4 lorsque la bactérie est mélangée à de la BSA, ce qui permet d'écartier un artefact dû à l'acidité du tampon. De manière intéressante, une lectine du blé, la WGA, provoque également l'agglutination de *Ea ams* à pH 4.

Pour confirmer le rôle inhibiteur de l'EPS diffus dans la capacité agglutinante de MdAGG10, celle-ci a été pré-incubée avec une gamme de concentrations d'EPS extrait à partir d'*Ea* WT avant la mise en contact avec la souche *Ea ams*. Les résultats obtenus montrent que la pré-incubation de MdAGG10 avec une concentration d'EPS supérieure à 40 µg.ml⁻¹ abolit les capacités d'agglutination de la protéine (Figure 2.6.2C). Cette inhibition suggère que l'EPS libre d'*Ea* WT la protège naturellement contre une agglutination provoquée par MdAGG10.

Les membranes externes des bactéries Gram-négatives sont enrichies en LPS, un polysaccharide membranaire propre à chaque espèce bactérienne qui peut déclencher des

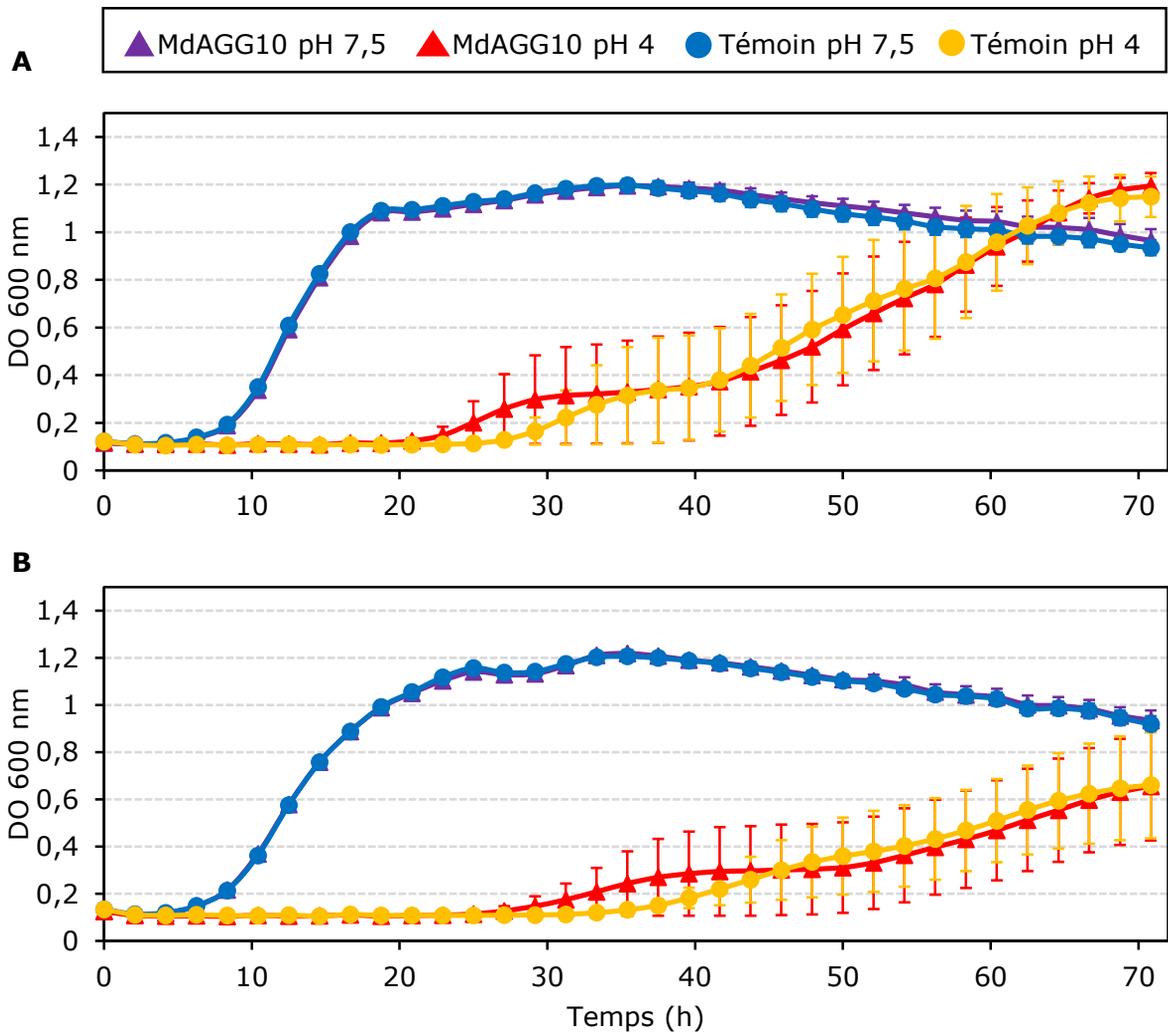


Figure 2.6.3 : Croissance d'*Ea* WT (A) et d'*Ea* Δ msdA (B) sur 70 h en milieu LB après une pré-incubation (1 h) avec la protéine MdAGG10 (triangles) ou un tampon Tris-sulfate d'ammonium (témoin, ronds) dilués un tampon Tris neutre (pH 7,5 ; violet et bleu) et un tampon acide d'acétate d'ammonium (pH 4 ; rouge et orange). La croissance bactérienne est mesurée à DO 600 nm. Chaque point correspond à la moyenne de 5 répétitions biologiques. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards.

réponses de défense de l'hôte et qui est impliqué dans l'intégrité des cellules bactériennes. Pour déterminer si MdAGG10 a une affinité pour le LPS, nous avons procédé de la même manière que le test d'inhibition réalisé précédemment avec l'EPS en pré-incubant la protéine avec du LPS extrait de la souche *Ea ams* (Figure 2.6.2D). Encore une fois, une inhibition de l'agglutination a été observée, à partir d'une concentration en LPS supérieure à 160 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de LPS. De plus, les LPS purifiées de *E. coli* O55:B5 préviennent aussi l'agglutination de *Ea ams* par MdAGG10, et ce au-delà de 40 à 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figure 2.6.2E). L'ensemble de ces résultats montrent donc que la protéine MdAGG10 est une lectine active à un pH acide, capable d'interagir avec les polysaccharides de surface d'*E. amylovora* (LPS ou EPS de capsule), et que l'EPS libre agit comme une molécule de protection bactérienne permettant d'inhiber l'agglutination par MdAGG10.

2.6.3 Tests d'inhibition de croissance bactérienne

Les protéines MdAGG10 sont susceptibles d'affecter le développement d'*E. amylovora* en agglutinant les cellules dépourvues d'EPS libre. Pour vérifier si l'agglutination de MdAGG10 impacte la croissance bactérienne, une mesure de la croissance bactérienne a été réalisée pendant 70 h sur *Ea* WT et *Ea ams* préalablement incubées à pH 7,5 ou pH 4 avec MdAGG10 ou une solution témoin (Figure 2.6.3). Les résultats montrent une phase exponentielle de croissance débutant environ 10 h après la mise en culture et similaire pour les bactéries sauvages et mutantes pré-incubées dans le tampon témoin à pH 7,5. *A contrario*, une pré-incubation à pH acide entraîne une croissance plus lente et débutant plus tardivement, environ 25 h après mise en culture pour *Ea* WT et d'environ 30 h pour *Ea ams*. Néanmoins, aucune différence n'est observée entre les bactéries incubées en présence de MdAGG10 ou dans les solutions témoins. Ces résultats suggèrent que MdAGG10 n'impacte pas la croissance d'*Ea* WT et d'*Ea ams* lorsque la protéine est pré-incubée avec la suspension bactérienne avant mise en croissance. On peut cependant noter que le pH acide ralentit le démarrage de la phase exponentielle de croissance, en particulier pour la souche mutante *Ea ams*.

2.6.4 Oligomérisation de la MdAGG10 selon le pH

L'ensemble des données présentées suggèrent que l'agglutination bactérienne par MdAGG10 est pH-dépendante. Afin de déterminer quel est le rôle du pH sur les capacités d'agglutination de MdAGG10 nous avons étudié par chromatographie d'exclusion le comportement d'oligomérisation de la protéine dans des solutions salines dont le pH varie de 3,9 à 5,4 (Figure 2.6.4). Etant donné la faible concentration en protéine de la solution injectée dans la colonne, nous avons opté pour l'utilisation d'un détecteur à fluorescence en sortie de colonne. Les profils de chromatographie d'exclusion ainsi obtenus montrent qu'à pH 5,4, la

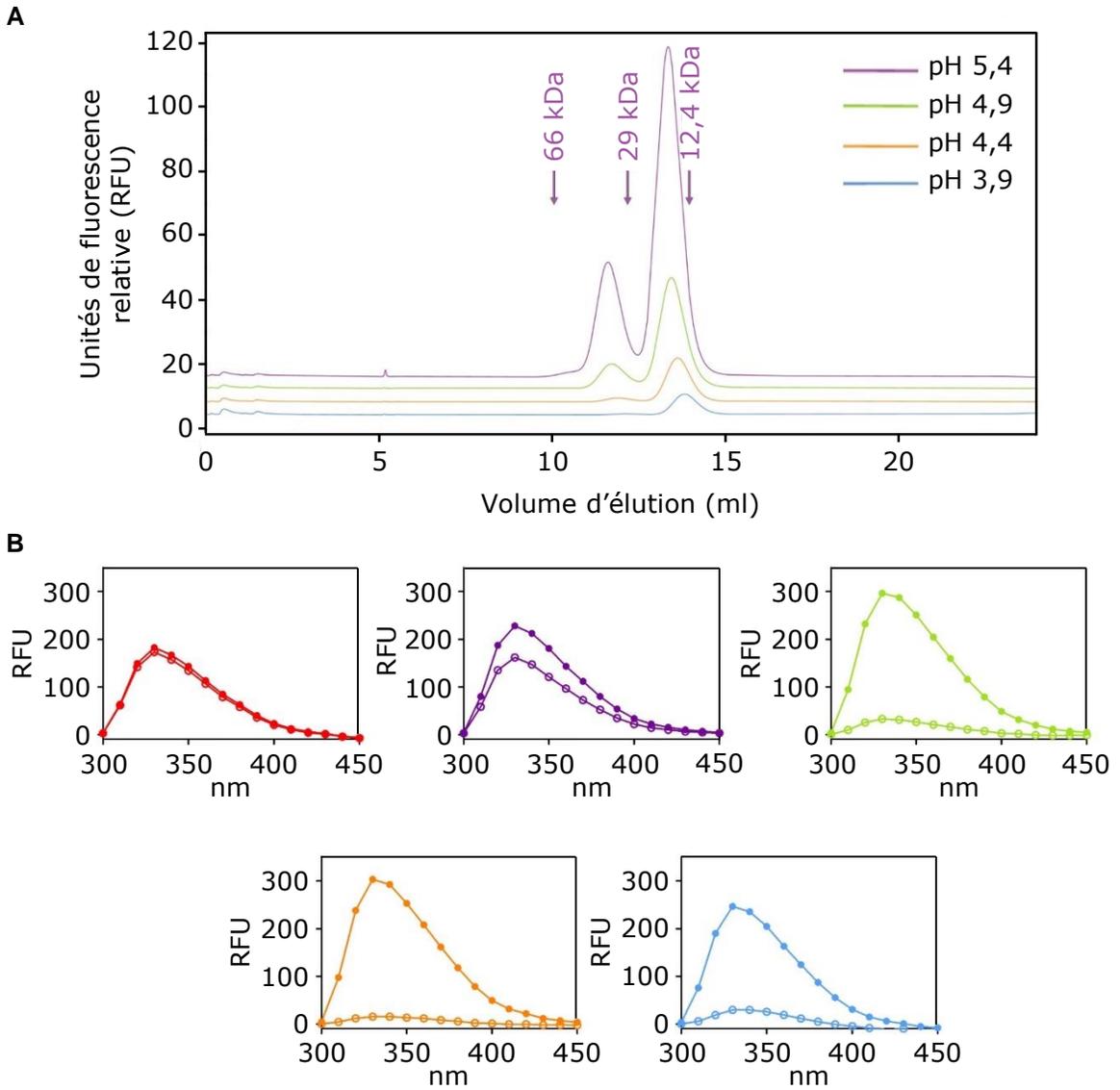


Figure 2.6.4 : Oligomérisation de MdAGG10 à pH acide. (A) Chromatographie d'exclusion stérique (Superdex 75 10/300 GL) de la MdAGG10 solubilisée dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM et de NaCl 150 mM à différents pH (violet : 5,4 ; vert : 4,9 ; orange : 4,4 et bleu : 3,9). Les flèches indiquent les volumes d'éluion des marqueurs de taille moléculaire dilués dans le tampon à pH 5,4. Tous les échantillons sont centrifugés 5 min à 15000 x g avant injection dans la colonne. (B) Spectre de fluorescence intrinsèque de MdAGG10 dans un tampon de Tris-HCl 50 mM et de NaCl 150 mM à pH 8,5 (rouge) ou un tampon d'acétate de sodium 50 mM et de NaCl 150 mM à différents pH (violet : 5,4 ; vert : 4,9 ; orange : 4,4 et bleu : 3,9). La longueur d'onde d'excitation est de 280 nm. Les cercles pleins correspondent aux échantillons solubilisés non centrifugés. Les cercles vides correspondent aux surnageants des échantillons solubilisés après 5 min de centrifugation à 15 000 x g.

solution contient un mélange de dimères et de monomères de la protéine MdAGG10 (Figure 2.6.4A). Lorsque le pH est abaissé, l'intensité des pics diminue progressivement jusqu'à atteindre un niveau très faible de détection à pH 3,9. Nous avons supposé que l'abaissement de l'intensité du signal peut résulter soit de l'extinction de la fluorescence à des valeurs de pH inférieures à 5,4, soit d'une formation d'agrégats multimériques de MdAGG10 systématiquement éliminés par l'étape de centrifugation qui précède l'injection dans la colonne. Pour tester cette dernière possibilité, nous avons dosé par fluorimétrie les surnageants des échantillons préparés de la même manière et comparé les valeurs de fluorescence obtenues avec celles mesurées sur des échantillons non centrifugés (Figure 2.6.4B). Une forte fluorescence a été détectée pour tous les échantillons non-centrifugés écartant l'hypothèse d'extinction de la fluorescence dépendante du pH. De plus, les surnageants de tous les échantillons centrifugés ont montré une intensité de fluorescence réduite par rapport aux échantillons non centrifugés, d'environ 5% à pH 8,5 ; 30% à pH 5,4 et 90% à pH égal ou en dessous de 4,9, ce qui est cohérent avec les résultats observés par chromatographie d'exclusion. L'ensemble de ces expériences indiquent que la protéine MdAGG10 subit des processus d'oligomérisation dépendants du pH, à partir de monomères à pH 8,5 pour conduire à la formation de dimères à pH 5,4, et aboutissant finalement à la formation d'agrégats suffisamment volumineux pour sédimenter par centrifugation à des valeurs de pH égales ou inférieures à 4,9.

2.6.5 Implication des charges électriques dans l'interaction de MdAGG10 avec les ligands

Afin de vérifier si les conditions de pH optimales pour une agglutination sont réunies *in vivo*, nous avons mesuré les variations du pH apoplastique et la conductivité dans des tissus foliaires de semis, pré-traités 4 jours auparavant à l'ASM ou à l'eau, puis infiltrés par *Ea* WT (Figure 2.6.5.1A, B). Les disques foliaires ont été infiltrés par une solution de MES faiblement tamponnée (0,1 mM ; pH 5,9) contenant *Ea* WT ou non, et incubés pendant 48 h dans un tampon MES fraîchement préparé. Une forte diminution du pH est observée, de 5,9 à 5,2, pour les disques infiltrés par *Ea* WT peu importe le traitement effectué (Figure 2.6.5.1A). En effet, le pH ne diffère pas entre les disques pré-traités à l'ASM et à l'eau mais seulement entre les disques infiltrés ou non par la bactérie. De plus, cette diminution du pH observée pour les tissus infectés est corrélée avec les fuites d'électrolytes, déclenchées par l'infection bactérienne (Figure 2.6.5.1B).

Pour tenter de comprendre les propriétés agglutinantes de la protéine MdAGG10 à pH acide, nous avons calculé le potentiel électrostatique de surface du modèle structural de cette dernière à pH 4,0 et pH 7,5 (Figure 2.6.5.1C, D). Une surface fortement chargée positivement est observée sur la protéine à pH 4, à une position qui correspond au site de liaison des

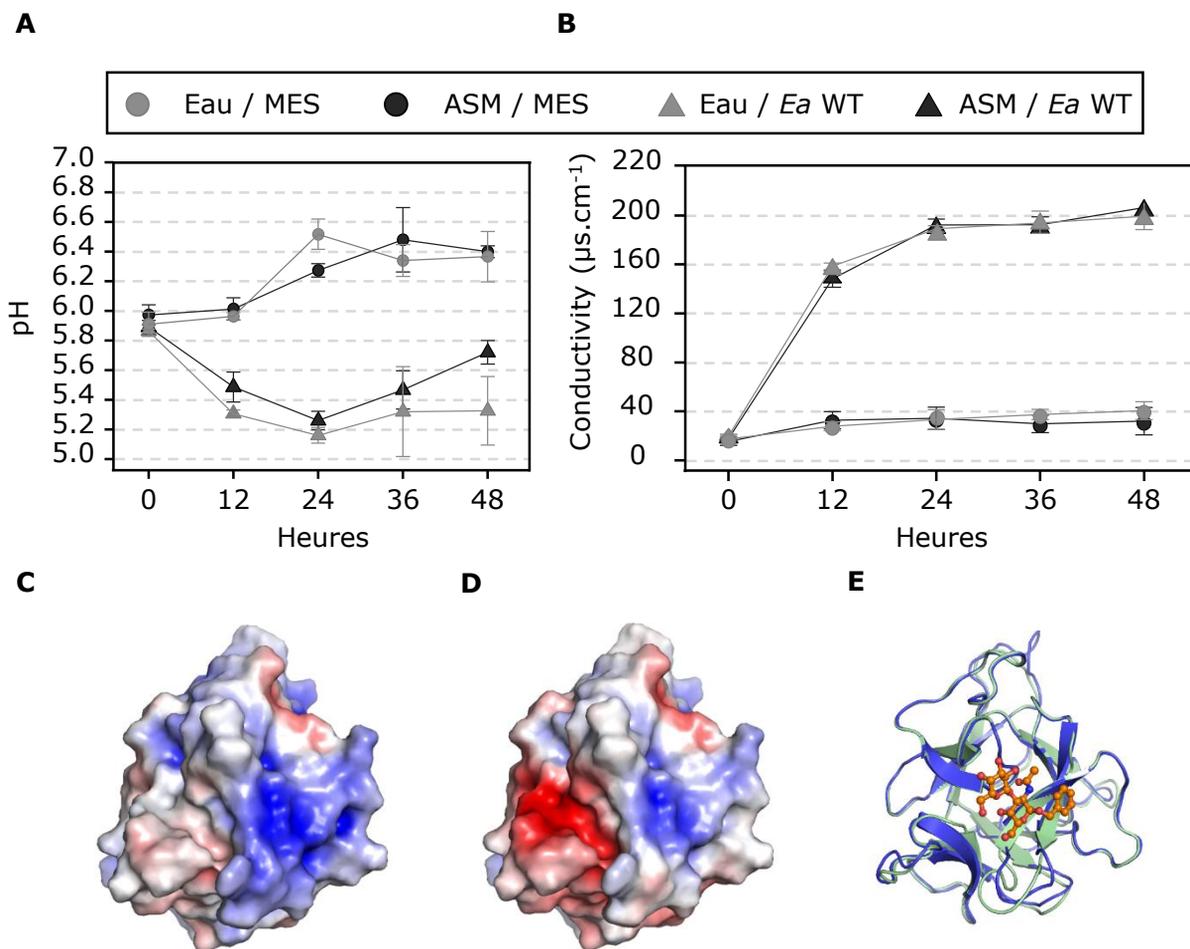


Figure 2.6.5.1 : Modulation du pH (A) et de la conductivité (B) induite par *Ea* WT dans les tissus de pommier et conséquences sur les sites fonctionnels prédits de MdAGG10 (C, D). Cinétiques de changements de pH (A) et de conductivité (B) des milieux d'incubation de disques foliaires de semis de pommier Golden Delicious prélevés 4 jours après traitement à l'ASM ou à l'eau, et infiltrés avec *Ea* WT ou un tampon MES à T0. Moyennes (et écarts-types) de 3 répétitions biologiques réalisées au cours d'une seule expérience. Chaque répétition biologique correspond à un milieu MES dans lequel incubent une vingtaine de disques foliaires. (C, D) Prédiction des surfaces électrostatiques du modèle de MdAGG10 calculées à pH 4 (C) et à pH 7,5 (D) à l'aide du logiciel PyMol. Les couleurs bleu, blanc et rouge indiquent respectivement les charges positives, neutres et négatives. (E) Superposition de la structure 3D prédite de MdAGG10 (bleu) à la structure d'une partie de l'amaranthine d'*A. caudatus*, qui a servi à la prédiction du modèle (PDB : 1jlx, résidues 1-154 en vert) incluant la position du ligand Gal- β 1,3-GalNAc- α -O-benzyl (orange). Les structures C, D et E sont présentées dans la même orientation.

disaccharides de l'amaranthine d'*A. caudatus* (Figure 2.6.5.1E ; Transue et al., 1997). Une telle surface chargée positivement est cohérente avec la capacité de MdAGG10 à se lier à des ligands chargés négativement. En revanche, cette surface semble moins importante à pH 7,5 qu'à pH 4. De plus, une surface chargée négativement apparaît à proximité du site de liaison du ligand putatif à pH 7,5, ce qui n'est pas le cas à pH 4 (Figure 2.6.5.1C, D). Ces prédictions nous ont conduit à supposer que le résidu terminal α -D-Galp4,6(R)Pyr de la chaîne latérale de l'amylovorane, chargé négativement dans des solutions à pH supérieur à 3, pourrait constituer le ligand de MdAGG10, qui interagit avec la surface chargée positivement à pH 4 mais qui est repoussé par les charges négatives voisines à pH 7,5. Des expériences d'agglutination compétitive réalisées avec une gamme de concentrations de polysaccharides capsulaires (CPS) des sérotypes K21, K26 et K74 de *Klebsiella pneumoniae*, produisant tous un résidu terminal D-Galp4,6(R)Pyr sur la chaîne latérale de leur unité répétitive, ont montré une inhibition de l'agglutination d'*Ea ams* par MdAGG10 (Figure 2.6.5.2). De façon intéressante, les seuils de concentration permettant cette inhibition étaient similaires à celui mesuré pour l'EPS d'*Ea* WT. En revanche, l'EPS non chargé de *Lactobacillus helveticus* K16 n'a pas pu entraver les propriétés d'agglutination de MdAGG10 aux mêmes concentrations. Nous nous sommes ensuite demandé si le composé synthétique α -D-Galp4,6(R)Pyr-OMe est capable d'inhiber à lui seul l'agglutination de *Ea* par MdAGG10. Nos résultats montrent que même à 0,1 M, ce composé n'est pas capable d'inhiber l'agglutination de *Ea ams* par MdAGG10, suggérant que d'autres caractéristiques complémentaires de l'EPS sont nécessaires pour que le ligand s'associe à la protéine MdAGG10. D'autres tests d'inhibition de l'agglutination de MdAGG10 ont été réalisés, incluant des dénaturations thermiques ou l'addition de CaCl₂, d'EDTA et de divers composés glycosylés. Parmi toutes les conditions testées, seules la carboxyméthylcellulose et la pectine, deux polysaccharides chargés négativement, inhibent l'agglutination provoquée par MdAGG10. Finalement, les propriétés agglutinantes de la MdAGG10 semblent identiques au facteur agglutinant présent dans une fraction protéique de pommier caractérisé par Romeiro et al. (1981b). Cette comparaison suggère fortement que la maline précédemment identifiée par ces auteurs correspond aux MdAGGs que nous avons caractérisés.

2.7 Discussion

Lorsqu'un agent pathogène passe au travers des premières lignes de défenses constitutives de la plante, la rapidité et l'efficacité de réponse de l'hôte déterminent l'issue de l'interaction : résistance ou maladie. Les SDP peuvent anticiper cette attaque en induisant les défenses des plantes (Walters et al., 2007 ; Oliveira et al., 2016). Dans le cas du pommier, l'ASM est connu pour protéger contre le feu bactérien et induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans les défenses, tels que ceux codant des protéines PR (Brisset et al., 2000 ; Maxson-Stein et al., 2002 ; Dugé de Bernonville et al., 2014 ; Aćimović et al., 2015 ; Marolleau et al., 2017). Parmi les gènes élicités par l'ASM, Warneys et al. (2018) ont identifié les *MdAGGs*

Polysaccharides bactériens			Mono-, di-, polysaccharides and autres traitements		
Inhibiteur testé	MdAGG10	Facteur agglutinant	Inhibiteur testé	MdAGG10	Facteur agglutinant
<i>K. pneumoniae</i> K21	+	nd	Chaleur (30 min / 100°C)	-	-
<i>K. pneumoniae</i> K26	+	nd	CaCl ₂ (5mM)	-	-
<i>K. pneumoniae</i> K74	+	nd	EDTA (5mM)	-	-
<i>E. amylovora</i> WT	+	+	D-glucose (5mM)	-	-
<i>L. helveticus</i> K16	-	nd	D-galactose (5mM)	-	-
			D-fructose (5mM)	-	-
			L-arabinose (5mM)	-	-
			L+rhamnose (5mM)	-	nd
			Acide galacturonique (5mM)	-	-
			D+tréhalose (5mM)	-	nd
			Sucrose (5mM)	-	-
			Maltose (5mM)	-	nd
			N-acétyl-D-galactosamine (5mM)	-	-
			4,6-Pyr-alfa-D-Galp-OMe (5mM)	-	nd
			Carboxyméthylcellulose (5mg.ml ⁻¹)	+	+
			Pectine (5mg.ml ⁻¹)	+	+

Charge négative ⊖	Glc	GlcA
Gal	Man	PyrGal

Figure 2.6.5.2 : Carbohydrates et traitements susceptibles d'affecter l'agglutination d'*Ea* *ams* par MdAGG10 comparé au facteur agglutinant identifié par Romeiro et al. (1981b). Les traitements et composés sont capables d'inhiber (+) ou pas (-) l'agglutination. nd : non déterminé. Les concentrations minimales d'inhibition des CPS/EPS bactériens sont de 10 à 60 µg.ml⁻¹. La concentration maximale des CPS/EPS bactériens testés est de 200 µl.ml⁻¹. L'unité répétée de l'EPS bactérien est présentée pour chaque souche bactérienne (Gal : galactose, Glc : glucose, Man : mannose, GlcA : acide glucuronique, PyrGal : galactose 4,6-O-pyruvylate).

codant des protéines appartenant à la superfamille des lectines. Ces dernières sont largement décrites pour leurs propriétés défensives contre les agents phytopathogènes, car capables de se fixer aux carbohydrates présents à leur surface. Nos travaux ont montré que le niveau d'expression et l'accumulation protéique des MdAGGs offrent une meilleure corrélation avec la résistance induite par les SDP que ceux des deux protéines PR, MdPR-2 et MdPR-10, largement étudiées par le laboratoire. La protéine MdPR-2 a peu de chance d'avoir un rôle direct sur les bactéries, s'agissant d'une β -1,3-glucanase capable d'hydrolyser les parois des cellules fongiques. Surexprimées dans des plantes transgéniques, elles améliorent la résistance contre des agents pathogènes fongiques chez diverses espèces végétales (Balasubramanian et al., 2012). L'activité ribonucléase conférée par certaines PR-10 montre, quant à elle, des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries, les champignons et les virus (Liu et Ekramoddoullah, 2006). Dans notre cas, l'expression et l'accumulation de MdPR-10 ne sont pas systématiquement associées à l'efficacité de protection conférée par les SDP, ce qui va à l'encontre d'un rôle de cette famille de protéines PR dans la résistance au feu bactérien.

Les MdAGGs sont fortement exprimées localement dans les semis de pommier suite à l'application d'ASM, qui provoque ensuite leur induction systémique dans l'ensemble des parties aériennes de la plante mais à une moindre intensité. L'analyse des fluides apoplastiques n'est pas en faveur d'une sécrétion et d'un transport extracellulaire, en accord avec l'absence de peptide signal décrit chez toutes les lectines de la famille des amaranthines (Dang et al., 2017). Il est probable que leur induction systémique soit associée à un signal déclenchant leur expression au niveau transcriptionnel. La tendance de ce signal à se diriger préférentiellement vers les jeunes organes depuis les tissus plus matures suggère un mouvement source/puit à partir des vaisseaux vasculaires. En effet, les différentes molécules « signales » connues de la SAR sont émises à partir du point d'infection et dispersées de manière systémique à travers les réseaux du phloème (Shine et al., 2019). Cependant, l'expression des MdAGGs n'est pas toujours corrélée à leur détection protéique, suggérant une latence traductionnelle, voire une inhibition de leur traduction. Une telle hypothèse a été proposée par Chizzali et al. (2012) pour un autre marqueur de résistance vis-à-vis d'*E. amylovora*, BIS2. Ce marqueur code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des biphényles, flavonoïdes qu'ils décrivent comme des phytoalexines du pommier, mais qui présente aussi une disparité entre accumulation des transcrits et des protéines après infection.

L'hypothèse de l'implication des MdAGGs dans la résistance au feu bactérien est plus ou moins étayée par l'étude de leur niveau d'expression dans d'autres matériels végétaux (arbres en verger, variétés greffées en serre) et dans différents organes (fleurs, feuilles de rosette, feuilles de pousse et fruits). Leur expression basale semble plus élevée dans les fleurs en pleine floraison (stade F2), atteignant pour certaines d'entre elles le même niveau d'expression que celui de feuilles traitées à l'ASM. Ce résultat est particulièrement intéressant puisque les fleurs constituent la principale voie d'entrée d'*E. amylovora*, suite à une dissémination par la pluie, le

vent ou les insectes pollinisateurs (Thomson, 2000). Cependant, l'accumulation protéique des MdAGGs dans les fleurs reste encore à être déterminée. De plus, le système expérimental utilisé pour cette expérience n'était pas optimal (fleurs récoltées sur des branches maintenues en survie dans de l'eau sans apport nutritif) et pourrait avoir provoqué un stress à l'origine du niveau d'expression élevé observé. Concernant l'expression des *MdAGGs* (basale ou après application de l'ASM) dans les feuilles d'une gamme de variétés (plants greffés en serre), elle ne semble pas corrélée à leur niveau de sensibilité au feu bactérien. Cela démontre que les MdAGGs, si elles ont un rôle dans la résistance à cette maladie, ne l'expliquent pas à elles seules. Elles pourraient y contribuer aux côtés d'autres mécanismes, comme par exemple la production de certains produits phénoliques démontrée dans d'autres études (Chizzali et al., 2012 ; Gaucher et al., 2013a).

Nos résultats ont montré que l'amylovorane et l'effecteur DspA/E sont impliqués dans la répression de l'expression des *MdAGGs* chez des génotypes sensibles, résultant en leur activation modérée par la souche *Ea* WT, à l'inverse d'une forte activation par les mutants *Ea ams* et *Ea dspA/E*. Malheureusement, aucune MdAGG n'est détectée en western blot dans les tissus infiltrés par ces mutants, suggérant une latence transcriptionnelle ou une élicitation trop faible. La détection des MdAGGs 5 jours après infiltration d'un inoculum 10 fois plus concentré va dans ce sens. En considérant seulement les résultats d'expression, les *MdAGGs* semblent être impliquées à la fois dans la PTI et l'ETI. La PTI est une réaction de défense rapide et à large spectre d'action qui peut être activée par des composants bactériens tels que la flagelline ou le LPS (Nicaise et al., 2009). Le fait que les MdAGGs soient plus fortement exprimées en réponse à *Ea ams* qu'en réponse à *Ea* WT suggère que l'EPS masque des PAMPs localisés à la surface membranaire d'*E. amylovora*, comme cela a déjà été démontré pour d'autres bactéries (Jang et Matthews, 2018). Une autre explication complémentaire réside dans la capacité de l'EPS d'*E. amylovora* à chélater le Ca^{2+} et ainsi bloquer les flux calciques aboutissant à l'induction des gènes de défense (Aslam et al., 2008 ; Lecourieux et al., 2006). Quant à l'ETI, il s'agit d'une réponse activée par la reconnaissance spécifique d'un produit de gène *avr* de l'agent pathogène pouvant être réprimée par des effecteurs, permettant ainsi à la maladie de se développer (Thordal-Christensen, 2020). La surexpression des *MdAGGs* par *Ea dspA/E* par rapport à *Ea* WT et *Ea t3ss* suggère que (i) DspA/E est impliqué dans la répression des *MdAGGs* et (ii) d'autres effecteurs de type III, sécrétés par *Ea dspA/E* mais pas par *Ea t3ss*, sont responsables dans leur induction. HrpN est impliquée dans la translocation des effecteurs de type III dans les cellules hôtes et est capable d'éliciter les défenses du pommier (Vergne et al., 2014), tel que le dépôt de callose (Boureau et al., 2011). Nos travaux ont montré que HrpN pourrait être aussi impliqué dans l'induction des *MdAGGs* puisque les semis infiltrés par *Ea hrpN* expriment autant les *MdAGGs* que ceux infiltrés par *Ea t3ss*. Il reste cependant à déterminer si cette activité inductrice repose sur la détection de HrpN en tant que tel, ou sur l'activité d'un autre effecteur HrpN-dépendant. En revanche, l'effecteur DspA/E semble clairement impliqué dans la répression des *MdAGGs*, ce qui concorde avec d'autres fonctions répressives déjà rapportées (Boureau et al., 2006 ; Dugé De Bernonville

et al., 2012) Ces résultats sont cohérents avec la détection des protéines MdAGGs dans les tissus infiltrés par *Ea DspA/E* et en moindre quantité dans ceux infiltrés par *Ea t3ss* 5 jours après infiltration. Cependant, cette analyse protéique est à considérer prudemment puisque la quantité de protéines totales déposée dans les puits est 5 fois plus importante qu'à l'accoutumée pour obtenir une détection clairement visible.

L'EPS est essentiel pour la colonisation d'*E. amylovora* dans l'apoplaste de l'hôte (Steinberger et Beer, 1988 ; Bellemann et Geider, 1992 ; Tharaud et al., 1994). Nos tests de compétition entre l'EPS et MdAGG10 montrent que l'EPS libre est impliqué dans l'inhibition de l'agglutination par la protéine MdAGG10. L'agglutination d'*Ea* WT est possible seulement i) en absence de son EPS libre, et ce phénomène est d'autant plus marqué avec la bactérie mutante *Ea ams*, totalement dépourvue d'EPS et ii) à des pH inférieurs à 4,8. Nos expériences *ex-planta* de mesure du pH apoplastique de disques foliaires indiquent un abaissement du pH suite à l'infection par *Ea* WT, comme cela a déjà été observé par Pontais et al. (2008). Néanmoins, le pH mesuré n'atteint jamais une valeur inférieure ou égale à 4,8 et ce même pour les disques issus de feuilles prétraitées à l'ASM. Cela n'exclut pas que la fuite de protons des cellules végétales puisse diminuer localement le pH apoplastique en dessous du pH mesuré dans le milieu comme suggéré par Thibaud et al (1988), et atteindre les conditions requises pour l'agglutination d'*E. amylovora in planta*. La modification rapide du pH de l'apoplaste induite par un agent pathogène est un phénomène qui a également été analysé chez *A. thaliana* lors d'une infection par *Fusarium oxysporum*. Dans ce cas, ce processus est étroitement régulé par les pompes à protons qui permettent une acidification très rapide de l'apoplaste suite à la perception d'une molécule dérivée de l'agent pathogène (Kesten et al., 2019).

Dans des conditions acides, *E. amylovora* est agglutinée par MdAGG10 seulement en absence d'EPS libre. A l'inverse, ajouter de l'EPS purifié inhibe l'agglutination du mutant *Ea ams*, dépourvue d'EPS. Romeiro et al. (1981b) avaient déjà identifié dans une fraction protéique obtenue à partir de graines de *Malus sylvestris* x *ranetka* ou de feuilles du génotype « Red Delicious » un facteur agglutinant capable d'agréger les cellules d'*E. amylovora*. Comme MdAGG10, ce facteur agglutinant est inhibé par des quantités croissantes d'EPS d'*E. amylovora* et n'est pas affecté par la dénaturation thermique, le CaCl₂, l'EDTA ou divers sucres simples (Romeiro et al., 1981b). Ces auteurs ont également démontré que le facteur agglutinant interagit spécifiquement avec la région centrale du LPS d'*E. amylovora* (Romeiro et al., 1981a). Notre étude montre que l'ajout du LPS d'*E. amylovora* est aussi capable d'inhiber l'agglutination des cellules bactériennes par MdAGG10. Nous rapportons également que l'agglutination de MdAGG10 est inhibée par le LPS d'*E. coli* O55:B5, qui possède des résidus chargés négativement dans sa région centrale et des chaînes latérales O non chargées (Rodriguez-Loureiro et al., 2018). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent fortement que le mystérieux facteur d'agglutination de Romeiro et al. (1981b) correspond aux MdAGGs. En raison du haut degré de conservation des

séquences protéiques, nous formulons l'hypothèse que l'ensemble de la famille des MdAGGs a une fonction redondante.

Les MdAGGs appartiennent à la famille des amaranthines, dont le membre fondateur a été isolé à partir de graines d'*A. caudatus* et est caractérisé par deux domaines agglutinines disposant chacun d'un site de liaison au Gal- β 1,3-GalNac- α -O-benzyl (Transue et al., 1997). Il a récemment été découvert que les lectines appartenant aux amaranthines sont répandues dans le règne végétal, bien qu'elles puissent coder une diversité de protéines contenant un ou plusieurs domaines agglutinines, éventuellement fusionnés à d'autres domaines protéiques (Dang et al., 2017). Pour le pommier, les 17 MdAGGs sont des lectines définies par un seul domaine agglutinine. Le modèle structural de MdAGG10 suppose une association dimérique en tête bêche qui permet la liaison de deux ligands (Warneys et al., 2018). Nos résultats de chromatographie d'exclusion fournissent des preuves expérimentales que MdAGG10 a tendance à s'auto-associer en tant que dimères dans des conditions modérément acides, conduisant finalement à la formation d'agrégats de plus hauts poids moléculaires lorsque le pH est abaissé davantage, soutenant ainsi cette prédiction. Le ligand de l'amaranthine, le Gal- β 1,3-GalNac- α -O-benzyl (Transue et al., 1997), n'est présent ni dans la composition de l'amylovorane (Nimtz et al., 1996) ni dans celle du LPS d'*E. amylovora* (Ray et al., 1986 ; Casillo et al., 2017). Cependant, nous avons constaté que les polysaccharides acides sont capables d'inhiber l'agglutination des cellules bactériennes par MdAGG10. Cette propriété semble évidente en particulier pour les polysaccharides bactériens acides arborant des résidus de galactose pyruvylés en position terminale de leurs chaînes latérales. De manière intéressante, des souches d'*E. amylovora* affectées dans la biosynthèse de ce résidu terminal de galactose pyruvylé se sont avérées incapables de se propager de manière systémique chez le pommier (Wang et al., 2012), conduisant les auteurs de ces études à émettre l'hypothèse que cet EPS pyruvylé apporte un avantage à la bactérie. La modélisation des charges de surface de MdAGG10 montre la présence d'une zone chargée positivement dont la position correspond au site de liaison de l'amaranthine, suggérant ainsi que cette surface est le site de liaison pour les chaînes latérales chargées négativement de l'EPS. Cette interaction charge-charge, déjà suggérée par Romeiro et al. (1981b), est renforcée par nos résultats montrant que divers polysaccharides acides inhibent l'agglutination cellulaire provoquée par MdAGG10. Bien que nous ayons montré que les polysaccharides acides sont impliqués dans cette liaison, nous n'avons pas encore été en mesure d'identifier le ligand minimal de la lectine MdAGG10.

D'autres lectines végétales montrent des propriétés agglutinantes des bactéries phytopathogènes (Peumans et Van Damme, 1995). Les agglutinines issues du maïs et de la pomme de terre sont capables d'agglutiner respectivement des souches avirulentes de *Pantoea stewartii* et de *Ralstonia solanacearum* ou des souches virulentes lavées de leur EPS diffus (Sequeira et Graham, 1977 ; Bradshaw-Rouse et al., 1981). L'agglutinine de la pomme de terre est capable de se fixer au LPS, de manière spécifique au lipide A (Sequeira et Graham, 1977) ou

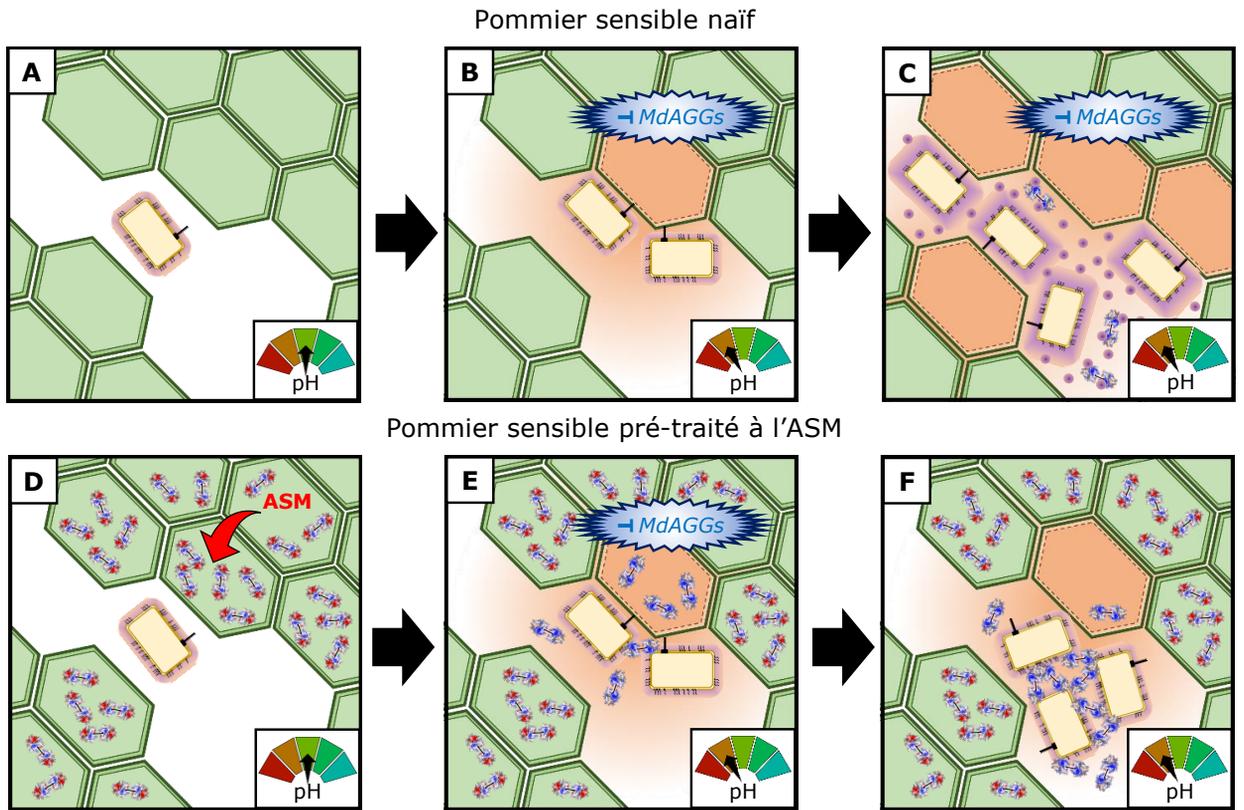


Figure 2.7 : Modèle de l'interaction *E. amylovora* - MdAGGs aux premiers stades de l'infection dans un pommier sensible naïf (A, B, C) ou préalablement traité par l'ASM (D, E, F). (A) *E. amylovora* pénètre dans l'apoplaste d'un jeune organe. La bactérie est modérément capsulée dans cet environnement pauvre en nutriments mais suffisamment pour masquer ses PAMPs et limiter l'élicitation des défenses. (B) Pour se nourrir et se développer, la bactérie injecte ses effecteurs dont DspA/E qui réprime l'expression des MdAGGs élicitées par d'autres effecteurs, provoque une acidification du pH apoplastique et induit la mort cellulaire. (C) La rupture de la membrane libère le contenu cellulaire et enrichit l'apoplaste en glucides (ex: sorbitol), permettant à la bactérie de produire une grande quantité d'EPS progressivement libérés sous forme d'EPS libres. Les cellules bactériennes, ainsi protégées de l'agglutination des MdAGGs éventuellement produites en amont de la progression bactérienne, se propagent et colonisent d'autres tissus. (D) Dans la plante traitée par l'ASM, les cellules contiennent déjà des protéines MdAGGs. (E) Les premières cellules de la plante tuées par les bactéries modérément capsulées permettent la libération des MdAGGs avec les nutriments et autres molécules de défense possibles ainsi qu'une acidification des espaces intercellulaires. Les MdAGGs se lient aux glycanes de la surface bactérienne, tels que les EPS et les LPS, et limitent ainsi l'action des bactéries. (F) La disponibilité limitée de nutriments empêche les bactéries de produire de grandes quantités d'EPS et de saturer complètement les MdAGGs avec de l'EPS libre. Les bactéries subissent une agglutination, limitant leur propagation systémique et rendant les corps agglutinés plus vulnérables aux autres défenses.

par des interactions charge-charge (Duvick et Sequeira, 1984). La WGA est connue pour inhiber la croissance de champignons phytopathogènes en se liant aux résidus N-acétylglucosamine de la chitine composant leur paroi (Ciopraga et al., 1999), mais nous avons aussi observé que la WGA est capable d'agglutiner *Ea ams* à pH acide. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les lectines végétales comme les MdAGGs sont capables, peut-être plus généralement qu'on ne le pense, de se lier aux glycanes chargés négativement dans la mesure où ils sont libérés dans un environnement électro-chimique approprié. Cela implique un spectre plus large de cibles pour les lectines défensives inductibles, où celles-ci pourraient se lier aux composants de surface des agents pathogènes fongiques et bactériens, mais aussi aux entérocytes intestinaux des insectes phytophages, entravant ainsi une nutrition efficace (Peumans et Van Damme, 1995).

Notre étude nous amène à établir un modèle d'invasion d'*E. amylovora* dans des génotypes de pommiers sensibles traités ou non à l'ASM (Figure 2.7). La relation entre *E. amylovora* et les protéines MdAGGs est un exemple de la course entre l'agent pathogène et son hôte qui repose sur un déploiement rapide et approprié des molécules de défense par rapport aux molécules d'attaque. Le succès de la maladie dépend de la capacité d'*E. amylovora* à se nourrir et à se défendre contre les défenses de l'hôte, tandis que la réaction de l'hôte est critique ; une réponse rapide peut affecter la résistance alors qu'une réponse retardée est ouverte à la manipulation par l'agent pathogène, conduisant à la sensibilité. Selon notre modèle, l'infection de plantes naïves par *E. amylovora* conduit à une expression retardée de l'expression des MdAGGs en raison de l'EPS masquant les PAMPs et de l'injection de DspA/E via le T3SS. Au fur et à mesure que la mort cellulaire se produit, les nutriments libérés alimentent la multiplication bactérienne. En particulier le principal sucre de transport des Rosacées, le sorbitol, connu pour stimuler la synthèse d'amylovorane (Wallaart, 1980), permet aux bactéries de libérer progressivement de l'EPS libre (Bellemann et al., 1994). Ainsi, même si quelques MdAGGs sont produites et libérées, les bactéries synthétisent suffisamment d'EPS libre pour échapper à l'agglutination et à l'exposition à d'autres composés de défense de la plante. *E. amylovora* est alors capable de se propager progressivement dans l'apoplaste et le long des tissus conducteurs, conduisant à une maladie systémique. Lorsque les défenses de la plante sont amorcées avant l'infection avec un éliciteur tel que l'ASM, notre modèle suppose que l'accumulation de composés défensifs tels que les MdAGGs permet à l'hôte d'être prêt, avant même que la bactérie n'ait atteint le statut métabolique approprié lui permettant d'échapper à ces éventuels effecteurs de résistance. La rupture membranaire induite par les bactéries conduit à leur agglutination par l'acidification de l'apoplaste ainsi que par la libération des MdAGGs accumulées. Bien que ce modèle soit construit sur des études *in vitro*, les travaux de Huang et al. (1975) vont dans ce sens : ils ont en effet réalisé des observations par microscopie électronique de tissus de feuilles de pommier infectés par *E. amylovora* non capsulée, et ont remarqué que des « granules semblent agglutiner des cellules bactériennes ». Le fait que ces granules puissent être composées notamment d'oligomères de MdAGGs reste encore à démontrer. A noter que notre

modèle n'exclut pas l'action antimicrobienne d'autres composés de défense produits en réponse à l'ASM, qui pourraient être d'autant plus efficaces que les bactéries sont agglutinées.

En conclusion, nos données démontrent que les MdAGGs sont de possibles candidats en tant qu'effecteurs de résistance du pommier vis-à-vis du feu bactérien et d'excellents marqueurs d'induction de défenses par les SDP. La confirmation du rôle de cette famille de protéines dans la résistance du pommier contre *E. amylovora* nécessite cependant des investigations complémentaires, notamment par une validation fonctionnelle *in planta* et une compréhension plus approfondie de leur mode d'action.

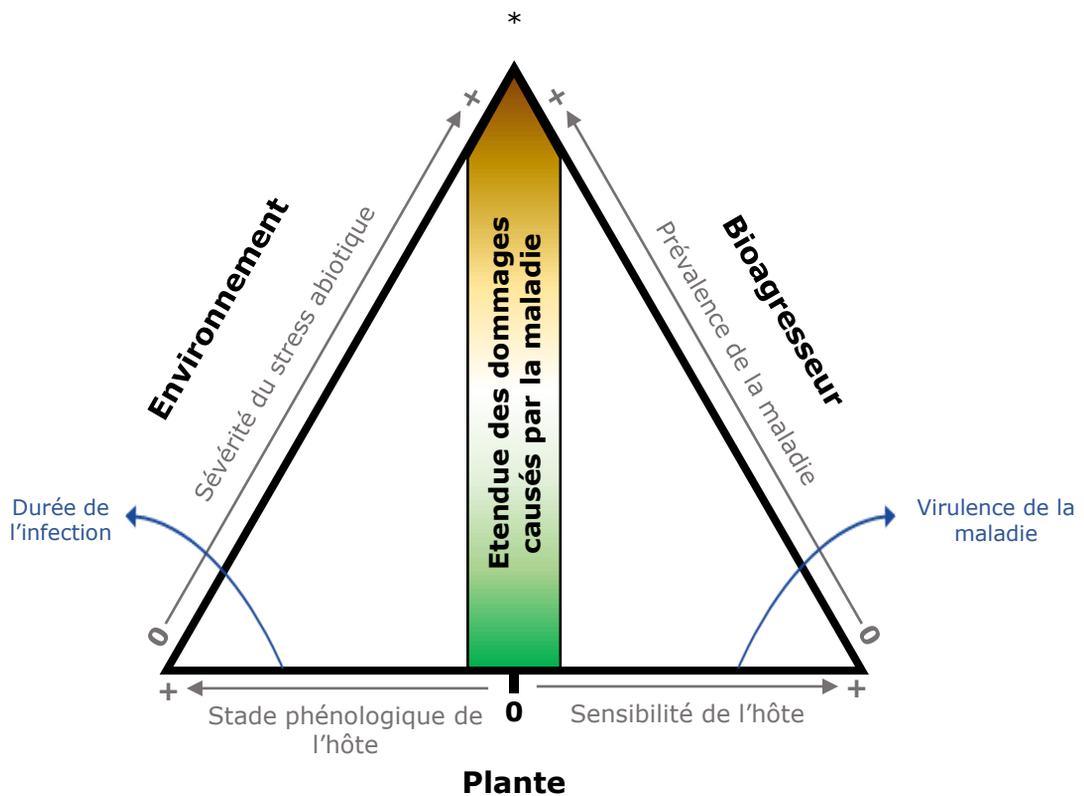


Figure 3 : Triangle de la maladie de McNew revisité par Scholthof (2007). Il présente les interactions entre les facteurs susceptibles de réduire une épidémie : la prévalence de la maladie, la sévérité du stress abiotique, la maturité de la plante et sa sensibilité génétique. L'échelon 0 correspond au niveau le moins impactant sur la santé de la plante et le sommet étoilé à l'état le plus altéré par la maladie. La durée de l'infection et la virulence de la maladie sont des facteurs susceptibles d'impacter les dommages causés, en interagissant respectivement avec la phénologie et l'environnement, et avec la sensibilité de l'hôte et l'agent responsable de la maladie (Scholthof, 2007).

3 Etude de l'effet de la chaleur sur l'efficacité de l'ASM

Les plantes sont des organismes sessiles assujettis aux contraintes multiples de leur environnement auxquelles elles doivent s'adapter pour survivre. Les facteurs abiotiques impactent à la fois l'incidence et l'agressivité des agents phytopathogènes ainsi que la capacité de la plante à réagir face aux maladies. Ces interactions qui définissent le devenir de la maladie peuvent être appréhendées avec le triangle de la maladie, formulé en 1960 par George McNew (Figure 3 ; Scholthof et al., 2007). Ces interactions sont complexes, notamment du fait que les réponses des plantes à des stress combinés diffèrent de celles induites par des stress individuels (Pandey et al., 2015 ; Zhang et Sonnewald, 2017). Il est cependant nécessaire de comprendre quelles conséquences les facteurs environnementaux ont sur les pathosystèmes, afin de mieux prévoir et contrôler les risques dans les cultures (Scholthof et al., 2007). Ainsi, la seconde partie de ma thèse cherche à déterminer l'impact combiné d'un stress abiotique, la chaleur, et de la stimulation des défenses par un SDP, l'ASM, sur la résistance du pommier vis-à-vis du feu bactérien.

3.1 Généralités sur les stress biotiques combinés aux stress abiotiques : exemple de la chaleur

3.1.1 Défenses des plantes faces aux contraintes environnementales

3.1.1.1 Rôle du statut physiologique dans la pathogénie

Lorsque les conditions environnementales sont favorables, les plantes vont privilégier leur croissance et leur développement. Cet état de croissance active est lié à un enrichissement en nutriments de la plante (Karthika et al., 2018) mais aussi en composés potentiellement favorables à l'établissement des bioagresseurs qui s'en nourrissent (Fatima et Senthil-Kumar, 2015). En effet, certaines études montrent que la fertilisation en potassium, magnésium ou azote, peut favoriser une sensibilité accrue aux maladies (Snoeiijers et al., 2000 ; Amtmann et al., 2008 ; Huber et Jones, 2012 ; Lekberg et al., 2021). Les réponses défensives aux bioagresseurs sont énergétiquement coûteuses pour la plante et nécessitent la relocalisation du

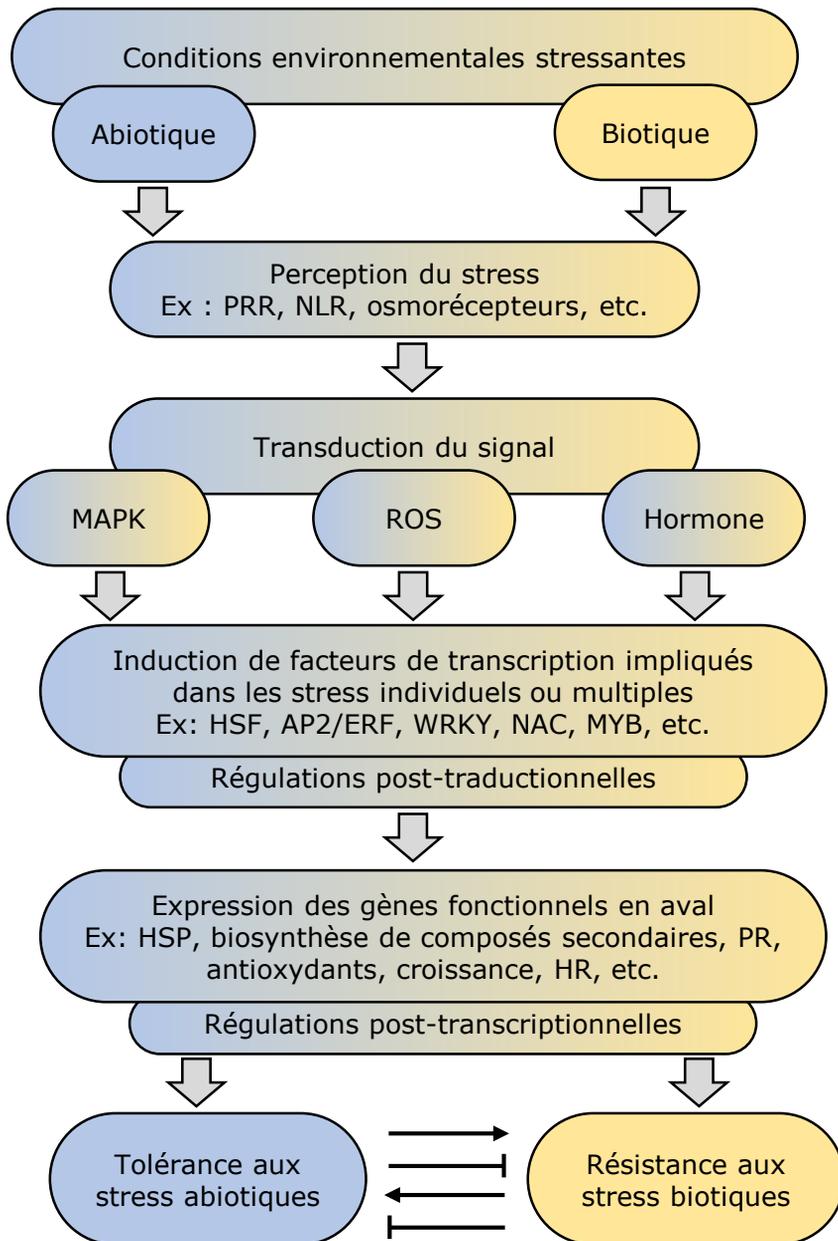


Figure 3.1.1.2 : Evènements clés impliqués dans la transduction de signaux activés en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Atkinson et Urwin, 2012)

métabolisme primaire au détriment de leur croissance et développement (Bolton, 2009 ; Huot et al., 2014). L'accumulation préalable de composés défensifs carbonés suite à l'apport en excès de photosynthétats dans des tissus susceptibles d'être attaqués, tels que les tannins (polyphénols) ou la lignine, augmente les chances de survie face aux bioagresseurs (Chapin et al., 1987 ; Lerdaou et Coley, 2002). De même, l'accumulation de ressources mobilisables pour les défenses actives peut favoriser la résistance face aux maladies (Bhaduri et al., 2014). Ainsi, des situations de résistance peuvent aussi être corrélées à l'apport des nutriments évoqués précédemment (Snoeiijers et al., 2000 ; Amtmann et al., 2008 ; Huber et Jones, 2012). L'impact nutritionnel diffère selon le pathosystème. Par exemple, l'apport d'azote confère une sensibilité accrue de la tomate vis-à-vis de *Pst* et *O. lycopersicum*, mais ce n'est pas le cas vis-à-vis de *B. cinerea*. (Hoffland et al., 2000). Ces situations de résistance peuvent aussi varier selon la forme d'azote disponible et sa métabolisation, notamment chez le concombre, pour qui l'apport de nitrate confère une meilleure résistance contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* que l'apport en ammonium (Wang et al., 2016a).

3.1.1.2 Impact des stress abiotiques sur les défenses

Les facteurs abiotiques engendrant des stress peuvent influencer l'issue de l'interaction dans un sens ou dans l'autre. En effet, la plupart de ces facteurs conditionnent l'état physiologique et le métabolisme de la plante et impactent par la même occasion le déroulement des maladies (Mittler et Blumwald, 2010 ; Suzuki et al., 2014). De nombreuses perturbations abiotiques peuvent être des facteurs aggravant de la maladie, tels que la sécheresse pour des maladies fongiques (*F. solani* sur pois chiche ; Sinha et al., 2019), le froid pour des maladies virales (*Cymbidium* ringspot virus sur tabac Szittyta et al., 2003) ou le stress salin pour des maladies causées par des oomycètes (*Phytophthora* spp. sur tomate ; DiLeo et al., 2010). Pour ces deux derniers exemples, l'accroissement de sensibilité est lié à l'inhibition de mécanismes de résistance, tel que le *silencing* d'ARN viral par le froid (Szittyta et al., 2003), ou à l'activation de facteurs de sensibilité, tel que l'accumulation d'ABA par le stress salin (DiLeo et al., 2010). Certains acteurs de la tolérance aux stress abiotiques modulent négativement la résistance aux agents pathogènes. C'est le cas d'une MAPK du riz (*OsMAPK5*) qui est induite en réponse à divers stress abiotiques (la sécheresse, le sel, le froid, etc.) et biotiques (*Magnaporthe grisea*, etc.). La surexpression du gène *OsMAPK5* dans des plantes transgéniques confère une tolérance aux stress abiotiques alors que sa délétion confère une résistance à des maladies bactériennes (*Burkholderia glumae*) et fongiques (*M. grisea*) avec une induction de protéines PR (Xiong et Yang, 2003). A l'inverse, ces mêmes stress abiotiques peuvent promouvoir la résistance contre d'autres agents pathogènes, notamment s'ils surviennent avant l'infection et potentialisent les mécanismes de résistance. C'est le cas de la résistance à *P. syringae* pv. *tabaci* promue par la sécheresse chez le tabac, et qui est corrélée à l'accumulation préalable de ROS durant le stress abiotique (Ramegowda et al., 2013). Une autre étude a montré que le stress salin et la

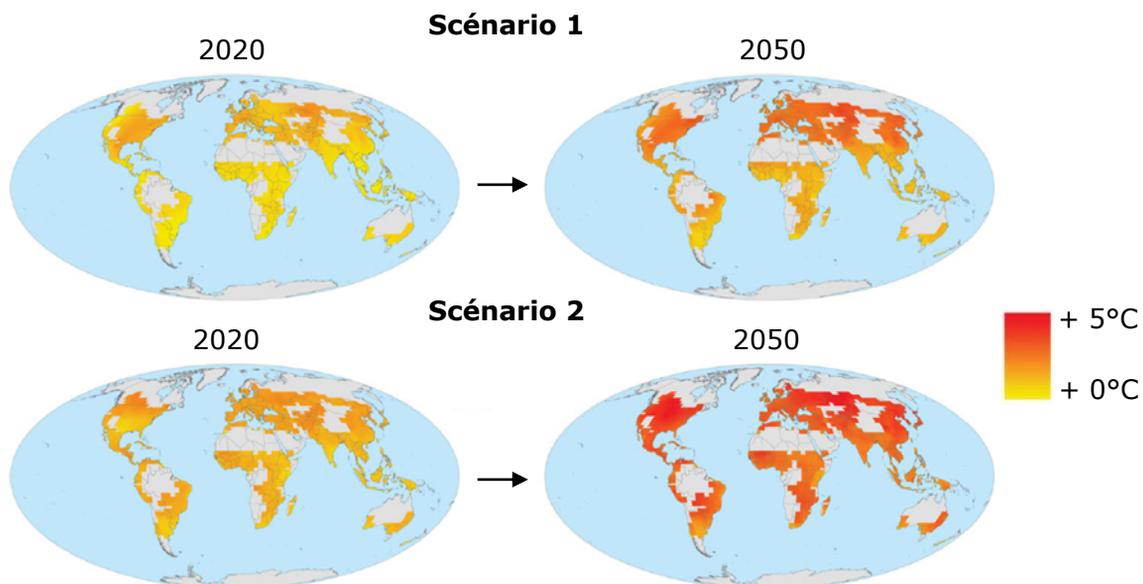


Figure 3.1.2 : Prévisions des changements de températures moyennes des terres cultivées sur 30 années, centrées sur 2020 et 2050. Les scénarios sont déterminés par le modèle climatique HadCM3 (Hadley Centre Coupled Model, version 3). Les scénarios 1 et 2 représentent les plus grands et moins grands changements de températures annuelles du modèle (Gornall et al., 2010).

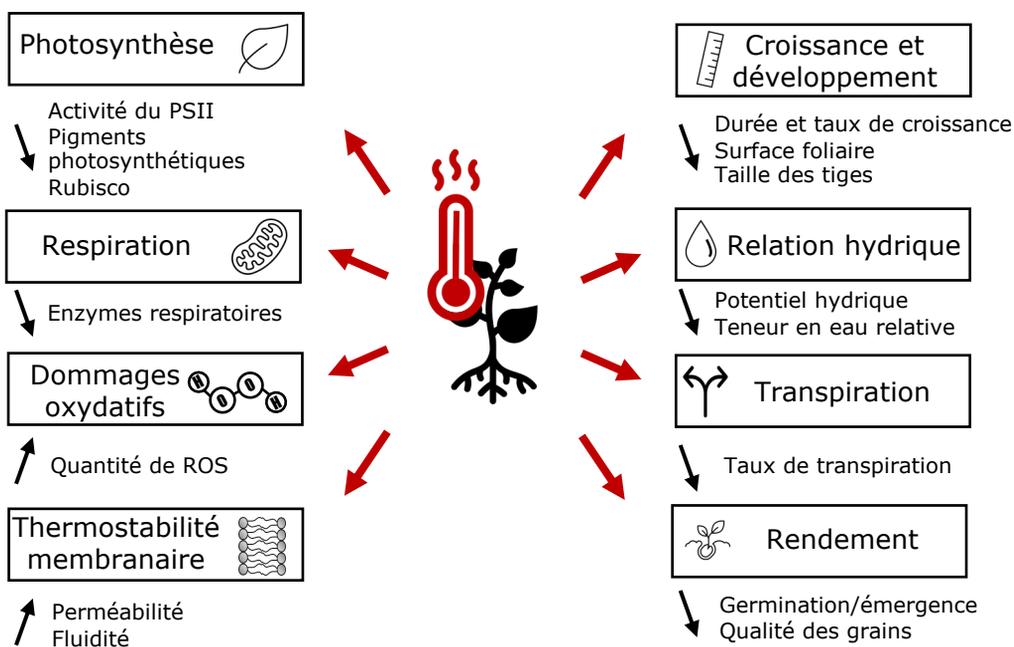


Figure 3.1.2.1 : Effet du stress chaleur sur la physiologie des plantes. Les flèches noires vers le haut et le bas indiquent respectivement les processus induits/activés ou réprimés/désactivés. PSII : photosystème II ; Rubisco : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase ; ROS : reactive oxygen species (Zhao et al., 2020).

sécheresse conféraient une résistance à *O. neolycopersici* chez la tomate (Achoo et al., 2006). Un passage au froid avant infection par *Pst* contribue à la réduction de la maladie chez *A. thaliana*, notamment en induisant les défenses liées à la voie du SA (Wu et al., 2019). Ainsi, certains acteurs induits en réponse aux stress abiotiques et biotiques confèrent une résistance synergique à ces stress multiples. Par exemple, un facteur de transcription ERF/AP2 du poivron (*CaPF1*) est induit en situation incompatible (*Xanthomonas axonopodis* pv *glycines*, etc.) et au cours de stress abiotiques (sécheresse, froid, stress salins, etc.). La surexpression de *CaPF1* chez *A. thaliana* confère une résistance à *Pst* et au froid (Yi et al., 2004). Globalement, de nombreux exemples d'antagonisme, mais aussi de synergie, entre tolérance aux stress abiotiques et résistance aux bioagresseurs ont été caractérisés et impliquent différents acteurs des voies de signalisation (Figure 3.1.1.2). Il n'est donc pas possible, à l'heure actuelle, de dresser un tableau universel de l'interaction stress biotique x stress abiotique.

3.1.2 Impact de la chaleur sur la physiologie et les défenses

Le changement climatique, défini par la variation significative des paramètres climatiques sur une période étendue (Dow et Downing, 2016), oblige à anticiper les dégâts qui seront occasionnés sur les cultures par les bouleversements en cours. Ce phénomène intègre le réchauffement global planétaire, correspondant à l'augmentation des températures moyennes (Figure 3.1.2), mais aussi des événements climatiques extrêmes, comme de fortes vagues de chaleur. Ces changements de températures ont des conséquences directes sur l'état physiologique des plantes, mais aussi sur les maladies (Gornall et al., 2010). Ainsi, une augmentation des températures peut augmenter/diminuer la virulence d'agents pathogènes capables ou non de tolérer ces nouvelles conditions, mais aussi interférer avec le déploiement des mécanismes de défense de la plante. Les prédictions actuelles suggèrent que l'élévation des températures engendrerait globalement des impacts négatifs sur l'agriculture, puisque ce phénomène participerait aussi à l'émergence de nouvelles maladies (Elad et Pertot, 2014 ; Velásquez et al., 2018). Ainsi, la chaleur représente l'un des stress les plus préoccupants pour l'avenir, dont l'effet sur la mise en place des défenses doit être élucidé pour mieux s'y préparer.

3.1.2.1 Impacts négatifs d'un stress chaleur sur la plante

La chaleur est le stress abiotique le plus préjudiciable pour l'agriculture puisqu'il altère sévèrement la croissance et le développement des plantes et peut parfois être létale (Hasanuzzaman et al., 2013 ; Zhao et al., 2020 ; Figure 3.1.2.1). Ainsi, au niveau physiologique, les répercussions d'une température élevée sont multiples. Tout d'abord, la chaleur affecte négativement le taux et la durée de croissance, ainsi que la taille des organes aériens comme

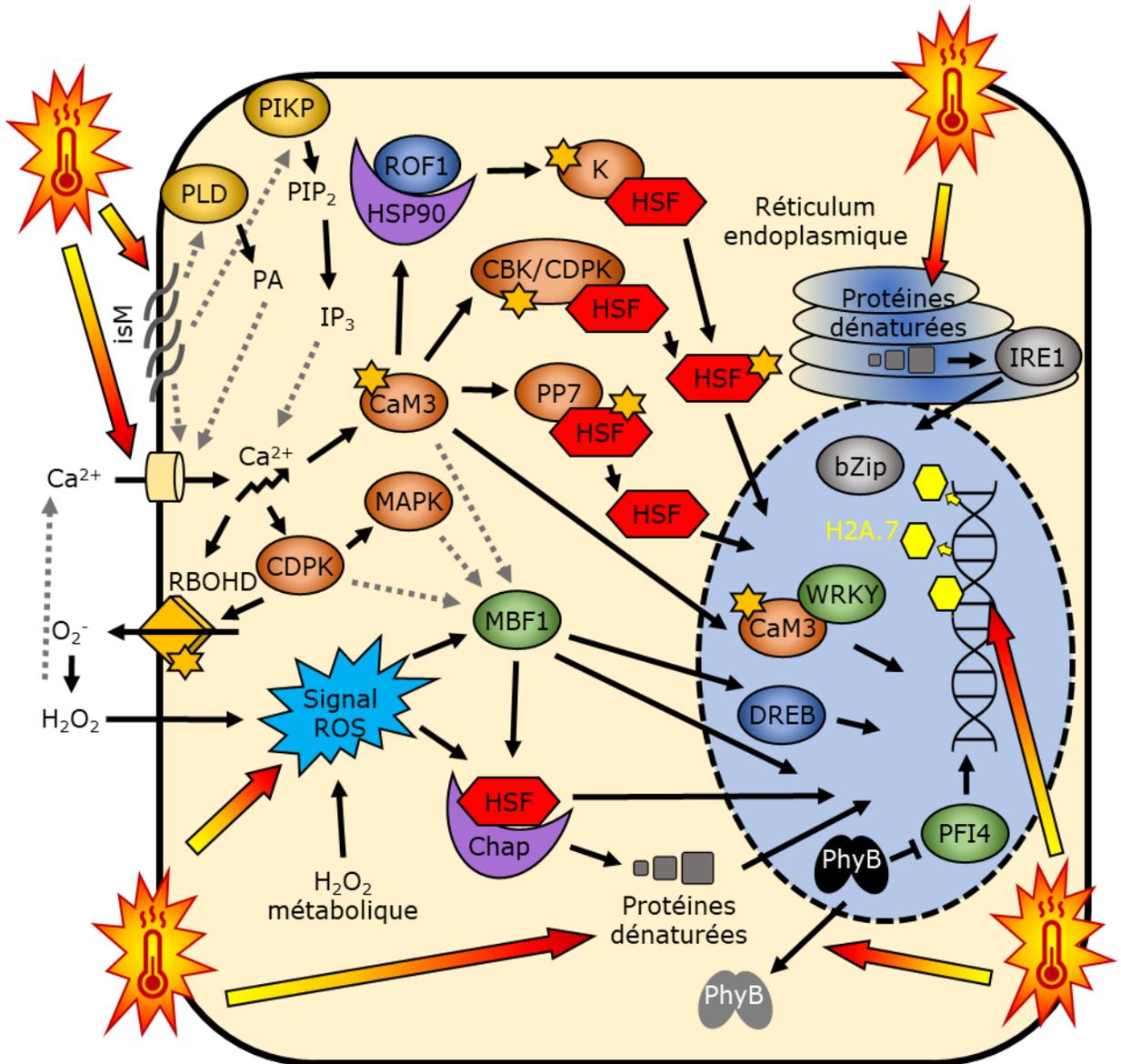


Figure 3.1.2.2 : Transduction du signal d'un stress de chaleur chez *A. thaliana*. La chaleur affecte la fluidité membranaire et déclenche l'entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule par l'activation de canaux calciques. L'instabilité membranaire (isM) déclenche une signalisation lipidique à travers l'activation des enzymes PLD (Phospholipase D) et PIPK (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) qui engendrent l'accumulation de signaux lipidiques, respectivement PA (acide phosphatidique) et PIP_2/IP_3 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate/d-myo-inositol-1,4,5-trisphosphate). Le Ca^{2+} se lie à la CaM3 (Calmoduline 3) pour activer de nombreuses kinases (CBK, CDPK, et les phosphatases PP7) et facteurs de transcription spécifiques de la chaleur (HSF) ou les WRKY. La CaM3 peut activer un complexe HSP90 chaperonnant ROF1 qui déclenche l'accumulation d'HSF. L'accumulation de Ca^{2+} déclenche directement la protéine membranaire RBOHD ("respiratory burst oxidase homolog D"), ou par le biais de CDPK qui la phosphoryle. RBOHD engendre l'accumulation de ROS, par la conversion de O_2^- en H_2O_2 , créant une dépolarisation membranaire et le déclenchement du réseau de signalisation ROS/rédox (signal ROS). Le signal ROS active un régulateur transcriptionnel MBF1 ("multiprotein bridging factor 1") et les HSF associés à des chaperones (Chap). MBF1, qui peut être aussi régulé par l'ET, le SA et le tréhalose, peut aussi activer ces HSF chaperonnées ainsi que le facteur de transcription DREB ("dehydration-responsive element-binding") impliqué lui aussi dans la tolérance à la sécheresse. La dénaturation des protéines dans le cytoplasme est régulée par la chaleur et par des HSF chaperonnées. L'accumulation de protéines dénaturées dans le réticulum endoplasmique déclenche le senseur IRE1 qui régule le clivage de différents facteurs de transcription bZIP. La chaleur peut aussi diminuer l'occupation d'histones H2A.Z au niveau des promoteurs des gènes *HSP*. La chaleur peut inactiver les PhyB et provoque sa translocation dans le cytosol, permettant la dérégulation de PFI4 qui va activer des gènes de réponse à la chaleur. Les étoiles jaunes sont des phosphates. Les interactions caractérisées sont indiquées par les flèches noires et celles soupçonnées par des flèches grises en pointillées (d'après Mittler et al., 2012).

les feuilles et la tige. De plus, la chaleur diminue le rendement des cultures, en altérant la qualité des graines, leur faculté de germination ainsi que l'émergence des plantules. Enfin, la déshydratation causée par la chaleur impacte le potentiel hydrique de la plante qui verra la concentration intracellulaire en solutés (sucres solubles, protéines, etc.) augmenter, modifiant ainsi l'osmolarité cellulaire. De plus, de fortes températures génèrent souvent des dommages oxydatifs sous forme de ROS, une détérioration des photosystèmes par l'inhibition des photosystèmes I et II ainsi que des perturbations respiratoires et membranaires. En effet, la chaleur augmente la fluidité membranaire, et par conséquent leur perméabilité. Cela se traduit par une altération des membranes des chloroplastes, et notamment des thylakoïdes, ce qui affecte directement le transport d'électrons. La chaleur impacte aussi l'efficacité photosynthétique en réduisant la quantité des pigments et l'activité de la Rubisco, impliquée dans la fixation du carbone. Les dégâts causés par la chaleur entraînent une mort cellulaire dans les cas les plus sévères, qui peut s'étendre à l'organe entier, et provoquer sa sénescence. Pour le pommier, une température atteignant les 29°C diminue la division et l'expansion cellulaire du fruit (Flaishman et al., 2015) et des températures situées dans un intervalle de 30 à 40°C diminuent l'efficacité photosynthétique foliaire (Greer, 2015).

3.1.2.2 Perception de la chaleur

Une élévation de température peut être perçue de différentes manières chez les plantes (Figure 3.1.2.2). D'une part, l'agitation des particules augmente avec la température, ce qui entraîne des changements de conformation des macromolécules impliquées dans d'importantes fonctions cellulaires (fluidité membranaire, ROS, stress osmotique, dénaturation des protéines, désassemblage du cytosquelette, etc.). Cette perturbation globale peut déjà être perçue comme un indicateur de chaleur par la cellule végétale (Ruelland et Zachowski, 2010). Quatre senseurs réagissant spécifiquement et différemment à l'élévation de température sont identifiés chez *A. thaliana*. Il s'agit (i) d'un phytochrome (ii), de canaux calciques, (iii) d'un variant histone et (iv) de protéines non repliées situées dans le réticulum endoplasmique et le cytosol (Mittler et al., 2012 ; Legris et al., 2016 ; Jung et al., 2016).

Le phytochrome B (phyB) est une chromoprotéine homodimérique dont chaque unité est liée de manière covalente à un chromophore nommé phytychromobiline. La lumière rouge et la chaleur conditionnent son état, l'activant ou au contraire le désactivant. La lumière rouge active PhyB alors que le rouge lointain (ombrage) et la chaleur provoque son inactivation (Legris et al., 2016 ; Jung et al., 2016). L'inactivation de PhyB entraîne l'activation de régulateurs positifs de la croissance de l'hypocotyle, une réponse typique à la chaleur chez *A. thaliana*. Le facteur de transcription PIF4 (pour « phytochrome interacting factor 4 ») est un de ces régulateurs positifs (Legris et al., 2017).

Certains canaux calciques de la membrane plasmique participent à la réponse à la chaleur en déclenchant l'entrée d'ions calcium dans la cellule végétale. Ces canaux sont probablement activés par l'augmentation de la fluidité membranaire (Hofmann, 2009 ; Finka et al., 2012), ou par des signaux lipidiques catalysés par des phospholipases membranaires, elles-mêmes activées par la chaleur (Singh et al., 2015).

L'altération de la structure des protéines provoquée par l'élévation de la température dans le cytosol ou le réticulum endoplasmique est un mécanisme jouant le rôle de senseurs thermiques conservés chez les eukaryotes. En conditions normales, les chaperonnes moléculaires (HSP pour « heat shock protein ») sont liées à des facteurs de transcription (ex : HSF ; « heat shock transcription factor ») ce qui maintient ces derniers dans un état inactif. Lors d'un stress thermique, les HSP sont recrutées pour pallier au mauvais repliement des protéines, libérant les facteurs de transcription qui peuvent ainsi activer les gènes liés à la réponse à la chaleur. De plus, il existe des récepteurs reconnaissant les mauvaises conformations protéiques dans le réticulum endoplasmique ; ce phénomène déclenche le mécanisme nommé *unfolded protein response* (UPR). Un acteur majeur de l'UPR est IRE1 (pour « inositol-requiring enzyme 1 »), qui, lorsqu'il est activé en réponse à la détection de protéines altérées, catalyse l'épissage alternatif d'un ARNm qui conduira à la production de facteurs de transcription de type BZip60 fonctionnels, activant à leur tour la transcription des gènes de réponse à la chaleur (Sugio et al., 2009 ; Iwata et Koizumi, 2012 ; Li et al., 2020). Toutefois, la réponse UPR est moins sensible à la chaleur que celle impliquant les canaux calciques puisque la dénaturation des protéines nécessite une élévation thermique très élevée (Mittler et al., 2012).

Enfin, la température peut influencer le degré de compaction/relaxation de la chromatine, en provoquant notamment la dissociation des variants d'histones H2A.Z de leurs sites de fixation préférentiels. Les promoteurs de nombreux gènes de réponse à la chaleur, normalement inaccessibles à l'ARN polymérase se retrouvent ainsi libérés, ce qui permet l'activation du programme transcriptionnel permettant à la plante de lutter contre les dégâts provoqués par ce stress (Kumar et Wigge, 2010 ; Cortijo et al., 2017).

3.1.2.3 Régulation de la réponse à la chaleur

Suite à la perception d'un changement de température, plusieurs régulateurs transcriptionnels sont à l'œuvre pour déclencher une réponse de tolérance. Ces régulateurs peuvent activer cette réponse par 4 mécanismes distincts : épigénétique (méthylation ADN, etc.), transcriptionnel (facteurs de transcription liés à la chaleur), post-transcriptionnel (ARN non-codant) et hormonal.

Régulation épigénétique

Les méthylations et les acétylations post-traductionnelles d'histones contribuent à la structure de la chromatine, ainsi qu'à l'activation/répression des gènes (Chinnusamy et Zhu, 2009). De nombreuses méthyltransférases/déméthylases et acétyltransférases/déacétylases sont mobilisées pour modifier l'accessibilité des promoteurs (Zhao et al., 2020). Par exemple, l'acétylation chaleur-dépendante d'histones peut décondenser la chromatine au niveau de régions promotrices, améliorant leur accessibilité et ainsi la transcription. Certaines acétyltransférases, telles que GCN5 acétylant l'histone H3 sur les résidus lysine K9 et K14, sont par exemple essentielles au développement d'*A. thaliana* sous contrainte thermique. Leur délétion ne permet pas de rendre accessible les gènes impliqués dans la tolérance à la chaleur (*HSFA2*, *HSFA3*, *MBF1* pour « *Multiprotein Bridging Factor 1* » et *UVH6* pour « *UV-hypersensitive 6* ») chez les mutants, qui présentent alors un hypocotyle plus court que les plantes sauvages (Hu et al., 2015). L'hyperacétylation chaleur-dépendante des histones associée à l'élévation de la transcription de *HSF* est aussi observée dans d'autres espèces, telles que *Zea mays* (Hou et al., 2019) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Strenkert et al., 2011). Les désacétylases, à l'inverse, retirent le groupe acétyl des histones et provoquent la répression de mécanismes essentiels à la tolérance à la chaleur par condensation de la chromatine. Par exemple chez *A. thaliana*, HD2C (pour « histone deacetylase 2 ») associée à un complexe de remodelage de la chromatine réprime certains gènes permettant d'éviter un retard de croissance dû à la chaleur (Buszewicz et al., 2016).

L'élévation de température modifie également le degré de méthylation des acides nucléiques, ce qui participe à une répression de l'expression des gènes situés à proximité (Chinnusamy et Zhu, 2009). La méthylation de l'ADN implique le placement d'un groupe méthyl (CH_3) sur les cytosines de trois patterns possibles : CG, CHG, et CHH (H représentant A, T, ou C ; Cokus et al., 2008). L'exposition à la chaleur provoque une augmentation globale du degré de méthylation de l'ADN chez *A. thaliana* (Boyko et al., 2010) ou *Quercus suber* (Correia et al., 2013). L'hyperméthylation de l'ADN peut être associée à une meilleure tolérance à la chaleur puisque chez le coton, les génotypes thermosensibles ont une expression de méthyltransférases moins élevée à la chaleur contrairement à un génotype thermorésistant (Min et al., 2014). Cependant, la méthylation thermo-inductible affecte la tolérance à la chaleur différemment selon les espèces, puisque les génotypes thermorésistants de *Brassica napus* sont à l'inverse hypométhylés par rapport aux génotypes thermosensibles (Gao et al., 2014). La méthylation de l'ADN et des histones chez les plantes est majoritairement assurée par un système complexe dirigé par l'ARN (RdDM pour « RNA-directed DNA methylation »), qui permet par ailleurs le *silencing* d'éléments transposables (TE pour « transposable element »). Chez *A. thaliana*, la RdDM est essentielle pour la tolérance à la chaleur puisqu'elle permet de réprimer l'activation des TE induits par ce stress (Ito et al., 2011 ; Popova et al., 2013 ; Matzke et Mosher, 2014). Les TE sont des séquences mobiles capables de s'insérer dans d'autres régions du génome et

sont classifiés selon leur mode de transposition : les TE qui se copient/collent à l'aide d'un ARN intermédiaire (classe I), et les TE qui se déplacent par un système couper/coller (classe II) (Wicker et al., 2007). Les TE représentent une grande partie du génome, et nécessitent d'être inactivés pour éviter que leur multiplication ne soit délétère. Sous conditions stressantes, les TE sont parfois exprimés de manière transitoire, et sont généralement associés à une expression de gènes de réponse au stress (Horváth et al., 2017). Les TE peuvent influencer l'expression des gènes, notamment en modifiant la structure de la chromatine ou en devenant des promoteurs par insertion à proximité de sites susceptibles d'être transcrits (Hirsch et Springer, 2017).

Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Après perception de la chaleur, que ce soit *via* l'entrée de calcium qui déclenche l'activation de protéines kinases (CDPK, MAPK, etc.), la dénaturation protéique ou le changement de conformation d'histones, des HSF sont activés (Mittler et al., 2012 ; Figure 3.1.2.3) Les HSF disposent d'un domaine N-terminal capable de se lier aux éléments de stress chaleur (HSE pour « heat stress element ») situés sur les promoteurs de gènes, comme codant des chaperonnes moléculaires HSP, pour activer leur transcription. Les HSF contrôlent et déclenchent une grande partie de la réponse de tolérance à la chaleur mais certains HSF sont aussi induits par d'autres stress ou impliqués dans la croissance et le développement (Guo et al., 2016). Leur implication dans la thermotolérance est avérée puisque leur surexpression dans des plantes transgéniques leur confèrent une meilleure résistance à la chaleur, et ce, pour plusieurs espèces (Zhu et al., 2006 ; Liu et Charng, 2013 ; Xue et al., 2014). Des gènes homologues à la plupart des HSF ont été identifiés dans le génome du pommier. Le niveau d'expression des gènes codant ces MdHSF varie selon le stade de développement des feuilles, selon l'organe considéré et en fonction d'une exposition ou non à la chaleur (Giorno et al., 2012). D'autres facteurs de transcription appartenant à la famille des WRKY, MYB, bZIP et NAC sont également activés en réponse à l'élévation de la température et participent à la régulation de la chaleur (Zhao et al., 2020). Parmi les WRKY, notons WRKY25, WRKY26 et WRKY33 qui coopèrent par exemple dans l'acquisition de la thermotolérance *via* une voie associée à l'éthylène et aux HSP chez *A. thaliana*. (Li et al., 2011). Même si les facteurs de transcription sont les principaux régulateurs de la transcription des gènes impliqués dans la tolérance à la chaleur, d'autres régulateurs jouent aussi un rôle important. C'est notamment les cas des ARN non codants de type micro-ARN (miR) qui sont impliqués dans le *silencing* d'ARNm par des processus de dégradation ou d'inhibition de la transcription (Roger et Chen, 2013). Chez *A. thaliana*, miR156 permet l'induction soutenu des gènes de tolérance à la chaleur (*HSFA2*, *HSP*) en ciblant des régulateurs négatifs comme les facteurs de transcription SPL (pour « squamosa-promoter binding -like » ; Stief et al., 2014). L'ensemble des acteurs transcriptionnels et post-traductionnels forme ainsi un réseau complexe de régulation de la réponse face à la chaleur (Zhao et al., 2020).

Régulation hormonale

Les phytohormones impliquées dans les défenses, SA, JA et l'éthylène, semblent aussi contribuer à la tolérance à une température élevée. Ces hormones sont accumulées suite à la chaleur et des mutants surexpresseurs de leurs voies de biosynthèse possèdent une meilleure tolérance à la chaleur. De plus, des invalidations génétiques au niveau des voies de biosynthèse du SA et de l'éthylène augmentent la sensibilité à l'élévation de température. Ces hormones participent à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la tolérance à la chaleur, tels que les WRKY et les HSF. D'autres hormones, l'ABA, les auxines, les cytokinines, les GA et les brassinostéroïdes, plutôt liées à la croissance et au développement, sont aussi accumulées en réponse à la chaleur et induisent des gènes liés à cette réponse. Des mutants déficients au niveau de la voie de l'ABA, des auxines et des cytokinines sont altérés dans les réponses physiologiques normalement induites par réchauffement. De plus, pour l'ensemble des phytohormones décrites, leur application exogène contribue à l'amélioration de la tolérance à la chaleur, à l'exception de l'éthylène (Ahammed et al., 2016). Chez le pommier, l'accumulation des phytohormones peut être modulée dans le fruit par l'exposition au soleil qui génère un stress photo-oxydant et de la chaleur. Une augmentation des concentrations en SA, JA, ET et ABA est observée dans les tissus présentant des symptômes de brûlure solaire (Torres et al., 2017).

3.1.2.4 Acteurs de la tolérance à la chaleur

Les plantes assujetties à la chaleur sont contraintes de mobiliser leurs ressources pour reprogrammer leur protéome, transcriptome et métabolome afin de prévenir et réparer les dommages causés (Mittler et al., 2012).

HSP

Les nombreux facteurs de transcription induits par la chaleur déclenchent la transcription de nombreux gènes impliqués dans la tolérance thermique, notamment les gènes *HSP*. Les protéines HSP sont classées selon leur poids moléculaire en 6 familles : HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s, HSP40s et les petites HSP. Le rôle principal de ces protéines chaperonnes est d'empêcher le mauvais repliement des protéines et leur agrégation, deux phénomènes provoqués par l'élévation de la température. Elles peuvent aussi être impliquées dans la réponse à d'autres stress abiotiques comme la sécheresse, et jouer un rôle dans l'immunité, la signalisation hormonale et le développement (Kotak et al., 2007 ; Al-Whaibi, 2011 ; Jacob et al., 2017). Les HSP représentent seulement une portion minimale du transcriptome induit par la chaleur. Le reste des gènes induits codent des protéines impliquées dans divers processus du métabolisme primaire et secondaire, de signalisation (calcium, phytohormones, sucres et lipides) et de régulation transcriptionnelle et traductionnelle (Mittler et al., 2012). Chez le pommier,

l'induction des HSP par la chaleur a été diagnostiquée après le stress, dans le fruit en verger pour des températures supérieures à 30°C (Ferguson et al., 1998), dans des cultures cellulaires de fruit à des températures comprises entre 30 et 36°C (Bowen et al., 2002) mais aussi dans les feuilles de semis exposées à 40°C (Yao et al., 2020). Dans cette dernière étude, la caractérisation génétique et transcriptionnelle de la famille des HSP20 a révélé qu'une partie d'entre elles sont fortement exprimées après une exposition à 40°C pendant 4 h.

Antioxydants et osmoprotectants

L'un des mécanismes de tolérance à l'élévation de température est le piégeage et la séquestration des ROS. La production d'enzymes antioxydantes, telles que les catalases (CAT), les SOD, glutathion réductases (GR), peroxydases (POX) et ascorbates peroxydases (APX), protège du stress oxydatif occasionné par la chaleur. D'ailleurs, la surexpression d'une APX chez le pommier lui confère une meilleure résistance vis-à-vis de la chaleur (Wisniewski et al., 2002). Cependant, leur activité est optimale dans une plage de température restreinte, déclinant à partir d'un certain seuil de température élevée, variable selon les espèces et les génotypes considérés. La synthèse de métabolites antioxydants, tels que l'ascorbate et le glutathion, contribue à la diminution des dommages des ROS induits par la chaleur (Hasanuzzaman et al., 2013). Une corrélation entre la résistance à la chaleur de certains génotypes et l'accumulation d'enzymes et/ou métabolites antioxydants est étayée dans la littérature par de nombreux exemples, notamment chez le blé (Almeselmani et al., 2009), la tomate (Rainwater et al., 1996), le colza (Zou et al., 2016) ou le maïs (Wu et al., 2020).

Par ailleurs, des osmolytes peuvent s'accumuler dans le cytoplasme pour préserver les fonctions cellulaires lors de la perte en eau par osmose. La proline permet par exemple de maintenir une pression osmotique intracellulaire qui compense la déshydratation provoquée par la chaleur, la sécheresse, le froid ou encore le stress salin. De plus, elle stabilise les structures et les activités des enzymes et des complexes protéiques, et maintient l'intégrité des membranes contre les dommages causés par ces stress. Par ailleurs, la proline est aussi un chélateur de métaux, un antioxydant et une molécule signalale (Siddique et al., 2018). L'accumulation de proline en réponse à la chaleur est recensée dans une multitude d'espèces, telles que le maïs et le riz (Kumar et al., 2011). Il a été montré chez certaines espèces comme le piment et le blé que des génotypes résistants à la chaleur accumulent davantage de proline que les génotypes sensibles (Ahmed et Hassan, 2011 ; Rajametov et al., 2021). D'ailleurs, l'application exogène de proline ou la stimulation de sa production par l'application de SA apporte une protection vis-à-vis de la chaleur (Rasheed et al., 2011 ; Oukarroum et al., 2012 ; Khan et al., 2013 ; Tonhati et al., 2020).

Les protéines riches en proline (PRP) sont généralement ancrées dans la paroi ou la membrane et impliquées dans l'entretien et le renforcement de la paroi cellulaire suite à un stress. Elles peuvent être produites par l'accumulation de proline (Stein et al., 2011). Il a récemment été mis en évidence que les gènes *MdPRP* du pommier sont modulés par la température, notamment *MdPRP6* qui confère une meilleure tolérance à la chaleur, une meilleure activité antioxydante et photosynthétique, ainsi qu'une préservation de l'intégrité des membranes lorsque ce gène est exprimé dans des tabacs transgéniques (Zhang et al., 2021).

Dégradation des protéines

La chaleur peut engendrer un mauvais repliement et la dénaturation des protéines, toxiques pour la cellule en se liant non spécifiquement à des constituants cellulaires, et altérant la signalisation protéique. Ces constituants cellulaires altérés peuvent être dégradés par le processus d'autophagie. Les mutants présentant des invalidités fonctionnelles dans ce processus sont plus sensibles à la chaleur (Zhou et al., 2013), alors que la surexpression d'un gène lié à ce processus, *MdATG18a* (ATG pour « autophagosome-related »), active ce mécanisme chez le pommier, ce qui confère à la plante une meilleure tolérance à la chaleur (Huo et al., 2020). De manière intéressante, la surexpression de *MdATG18a* augmente l'expression de gènes *HSP*, l'activité d'enzymes antioxydantes (SOD, POX et CAT) et l'accumulation d'antioxydants (ascorbate, dehydroascorbate, glutathion), indiquant que *MdATG18a* est impliqué dans la coordination de différents processus de réponse à la chaleur.

Modification de la composition lipidique

Suite à l'élévation de température, les plantes peuvent changer la composition de leurs lipides pour inhiber l'hyperfluidité membranaire et leur peroxydation. En effet, l'augmentation de la proportion en lipides saturés, supportant mieux la chaleur, est un mécanisme de tolérance maintenant une fluidité membranaire appropriée (Higashi et Saito, 2019). Des génotypes résistants à la chaleur de blé ou d'agrostide rampante (*Agrostis stolonifera*) ont une plus forte proportion en acides gras saturés que les génotypes sensibles (Larkindale et Huang, 2004 ; Narayanan et al., 2016). Chez *A. thaliana*, une température élevée change les profils lipidiques membranaires, en diminuant notamment certains acides gras très insaturés (18:3) au profit d'autres moins insaturés (18:2) ou saturés (acide palmitique, 16:0 ; Falcone et al., 1990). Par ailleurs, les mutants déficients en désaturase des acides gras ω 9 du chloroplaste accumulent davantage d'acide palmitique (16:0), ce qui améliore leur croissance à température élevée (Kunst et al., 1989). Ce constat peut être transposé sur d'autres espèces, telles que le tabac et le soja, où les mutants déficients en désaturases d'acides gras sont davantage résistants à la chaleur (Murakami et al., 2000 ; Alfonso et al., 2001).

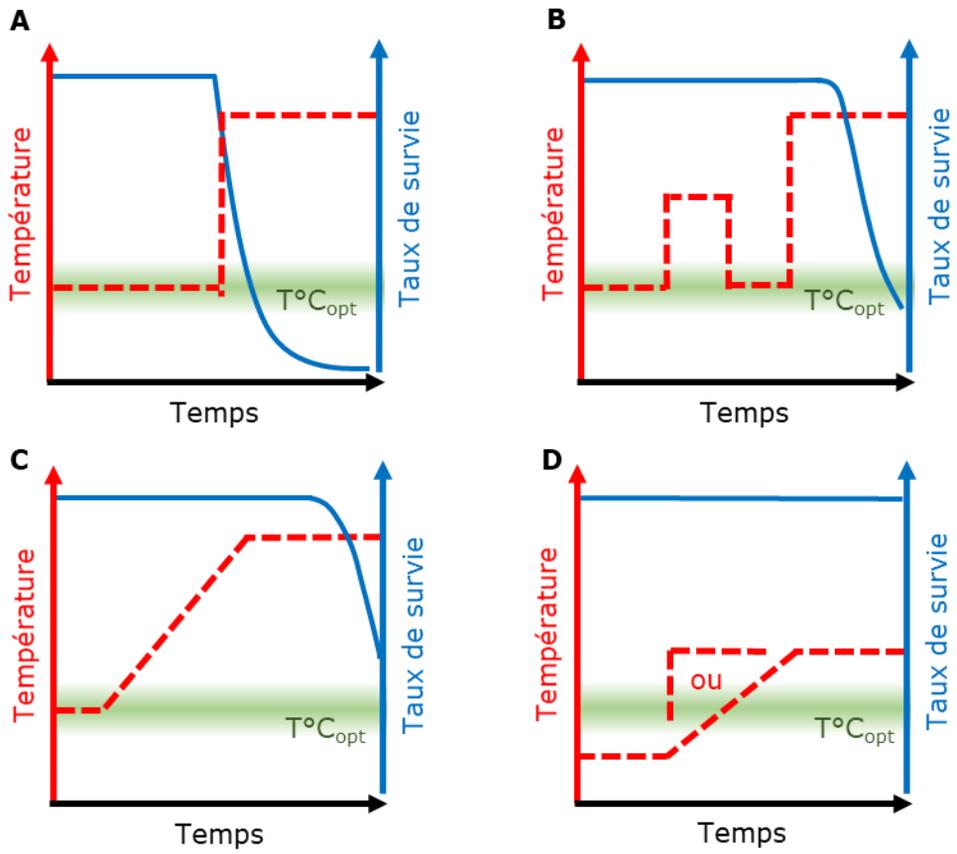


Figure 3.1.2.5 : Effet de différentes élévations de température sur la survie des plantes : thermotolérance basale (A), thermotolérance acquise par étape (B) ou graduelle (C) et réchauffement (D). $T^{\circ}C_{opt}$: température optimale de croissance (Mittler et al., 2012).

Thermorégulation

Les plantes sont capables de thermorégulation (homéothermie limitée), et peuvent ajuster leur température vis-à-vis de leur environnement (Mahan et al., 1988 ; Michaletz et al., 2016), notamment en abaissant la température par la transpiration (Sadok et al., 2020). En effet, au cours de leur développement, les plantes soumises à une chaleur s'adaptent en augmentant leur perte en eau, leur conductance stomatique et leur transpiration afin de refroidir les feuilles (Crawford et al., 2012). Ce refroidissement est souvent associé à un changement de morphologie, comme l'épaississement de la feuille (Konrad et al., 2020) et l'inclinaison des organes aériens vers le haut, chez le tournesol par exemple (*Helianthus annuus* ; Kalyar et al., 2013).

3.1.2.5 Réchauffement et thermotolérance

Les plantes possèdent une tolérance basale à la chaleur mais celle-ci est limitée. Cette thermotolérance peut être appréhendée en mesurant le taux de survie des plantes après qu'elles aient été soumises à un stress thermique brutal (Figure 3.1.2.5A). La capacité des plantes à s'acclimater face à ce type de stress peut être améliorée en appliquant des prétraitements thermiques de moindre intensité (Mittler et al., 2012 ; Yeh et al., 2012 ; Bokszczanin et al., 2013). Un prétraitement constitué d'un ou plusieurs épisodes de température modérée amorce une thermotolérance acquise par étape (Figure 3.1.2.5B) alors qu'un changement progressif de la température jusqu'à atteindre la température la plus stressante amorce, quant à lui, la thermotolérance acquise graduelle (Figure 3.1.2.5C). Le succès d'acclimatation en cas d'élévation de température est corrélé avec l'accumulation de protéines et de métabolites liés à la tolérance à la chaleur. Cette accumulation est plus élevée dans le cas d'une thermotolérance acquise, et d'autant plus si celle-ci est graduelle. En plus des différences quantitatives d'accumulation de transcrits entre la thermotolérance acquise et basale, des différences qualitatives sont observées entre ces deux types de réponse. En effet, certains contributeurs de la thermotolérance basale, tels que des régulateurs transcriptionnels, des antioxydants ou encore l'accumulation de SA ne sont pas impliqués dans la thermotolérance acquise (Larkindale et al., 2005 ; Yoo et al., 2006 ; Clarke et al., 2004). Néanmoins, certains mécanismes sont communs, tels que la production de protéines HSP (Nieto-Sotelo et al., 2002 ; Chi et al., 2009 ; Sun et al., 2019). Les thermotolérances basale et acquise par étape ont déjà été étudiées sur des cultures cellulaires de pommes. Une forte mortalité est observée lorsqu'elles sont placées au-delà de 42°C pendant 1 h. La transcription de *MdHSP1* et *MdHSP2* atteint une activité maximale pour des températures comprises entre 30 et 36°C, mais décroît fortement après 40°C. Cependant, une exposition au préalable à 38°C pendant 1 h augmente le taux de survie des plantes, en corrélation avec l'accumulation transitoire de *MdHSP1* et plus durable de *MdHSP2* (Bowen et al., 2002).

Une élévation de température oscillant autour de la température optimale de croissance ($T^{\circ}C_{op}$) constitue un réchauffement (entre deux températures respectivement plus basses et plus élevées que la $T^{\circ}C_{op}$, Figure 3.1.2.5D). Un réchauffement se différencie d'un stress chaleur, qui implique quant à lui une élévation de température plus forte. Un stress chaleur et un réchauffement peuvent avoir le même écart de température entre les températures minimale et maximale, mais elles diffèrent pour la température maximale atteinte, plus nocive dans le cas du stress (Mittler et al., 2012). Même si les plantes ont des réponses communes face à un stress chaleur et un réchauffement (Yeh et al., 2012), elles peuvent également y répondre différemment au niveau de la perception (Foreman et al., 2010 ; Kumar et al., 2010 ; Yeh et al., 2012) et de la régulation (Yeh et al., 2012 ; Zhu et al., 2021), notamment pour maintenir la croissance en situation de réchauffement (Foreman et al., 2010 ; Zhu et al., 2021). Par exemple, les HSP jouent un rôle mineur dans le réchauffement contrairement à la thermotolérance (Yeh et al., 2012). Contrairement à un stress thermique qui déclenche une réponse à court terme, le réchauffement apporte une adaptation à plus long terme, qui peut se traduire par des modifications du développement (Mittler et al., 2012).

3.1.2.6 Impact de la chaleur dans les interactions plante- pathogène

La chaleur peut être favorable ou aller à l'encontre de la maladie. Desaint et al. (2020) ont répertorié 45 études combinant 142 cas de réponses de résistance aux agents pathogènes face à la chaleur (36 pathosystèmes, 21 espèces végétales et 27 espèces pathogènes dont 8 champignons, 3 oomycètes, 3 nématodes, 3 bactéries et 9 virus). Les auteurs estiment que 55% des résistances étudiées sont impactées négativement par la chaleur. Cet antagonisme entre la résistance et l'élévation de température ne semble pas lié à une espèce hôte ou un agent pathogène particulier, ni à la stratégie parasitaire de l'agent en question (biotrophe, hémibiotrophe ou nécrotrophe). Dans la majorité des cas d'antagonisme, la chaleur est appliquée en même temps que l'inoculation. Les 45% d'études restantes faisant état d'un effet nul (résistance thermostable) ou positif de la chaleur sur la résistance au bioagresseur regroupent une forte proportion de pathosystèmes blé/riz-champignons, et concernent majoritairement des situations où l'inoculation est réalisée au moins 24 h après la période de stress thermique. Pour l'ensemble des études référencées dans cette revue, tous les types de résistance peuvent être impactés négativement ou positivement, mais davantage de cas d'inhibition de l'ETI sont recensés. Nous allons ici parcourir quelques exemples pour faire le portrait de la complexité de la combinaison de la chaleur et des défenses sur le devenir de la maladie.

L'inhibition de l'ETI peut parfois s'expliquer par une sensibilité des gènes R à la chaleur avec une diminution de leur transcription, comme dans le cas du gène de résistance *RPW8* chez *A. thaliana* (Xiao et al., 2003). Une autre étude montre que la chaleur réduit la localisation

nucléaire de certains récepteurs NLR, qui en condition normale est nécessaire pour induire les défenses ETI-dépendantes (Zhu et al., 2010). De plus, la plupart des effecteurs de virulence de bactéries phytopathogènes pouvant être reconnus sont davantage sécrétés pour des températures comprises entre 16 et 24°C et sont réduits au-delà de 28°C. Ainsi, l'effet négatif de la chaleur sur les facteurs Avr et R peut perturber le déclenchement de l'ETI (Smirnova et al., 2001 ; de Jong et al., 2002 ; Cheng et al., 2013a), notamment pour *E. amylovora* (Wei et al., 1992). L'impact négatif sur la résistance pourrait aussi être lié à la capacité des agents pathogènes à se développer au-delà des températures optimales de croissance de l'hôte (Desaint et al., 2020).

Même si la chaleur est parfois antagoniste à l'ETI, cette règle n'est pas absolue puisque la chaleur peut aussi la favoriser. En effet, certains exemples montrent des ETI thermostables à la chaleur (Cohen et al., 2017 ; Onaga et al., 2017b ; Tao et al., 2018 ; Wang et al., 2019b). Dans le cadre du pathosystème *Magnaporthe oryzae*/riz, la chaleur peut amplifier l'ETI dépendante du gène de résistance *Pi54*, en induisant l'accumulation de SA et de H₂O₂ et la formation de callose (Onaga et al., 2017a). Pour une bactérie pathogène du riz, *Xanthomonas oryzae*, la chaleur amplifie la résistance conférée par le gène R indépendamment du SA, en réprimant la biosynthèse de l'ABA (Cohen et al., 2017).

La chaleur peut affecter les réponses défensives basales de la plante aux bioagresseurs (PTI). Huot et al. (2017) remarquent que *A. thaliana* est plus sensible à *Pst* en condition de stress chaleur modérée (30°C) après inoculation, notamment si les plantes sont acclimatées à la chaleur avant infection. Cette sensibilité accrue est indépendante de la voie PIF4/phyB mais est associée à une répression des niveaux de SA, de sa biosynthèse (*ICS1*) ainsi que des voies de défense qui en dépendent (*PR-1*). Cette diminution des défenses SA-dépendantes causée par la chaleur favorise la translocation des effecteurs de type III et de ce fait, la maladie. De plus, ces mêmes auteurs réalisent une étude transcriptomique sur l'effet de l'ASM combiné à la chaleur, révélant que ce stress impacte 60% des gènes modulés par l'ASM. En effet, à 30°C, l'ASM ne permet plus l'induction du SA, de *ICS1*, de *PR-1* et de la callose même s'il apporte toujours une protection contre l'agent pathogène d'une manière indépendante de la voie SA/*ICS1* (Huot et al., 2017). De même, une autre étude montre que la PTI contre *Pst* est affectée par une chaleur modérée (28°C) au moment de l'inoculation mais que cette sensibilité accrue est indépendante de certains acteurs de la voie du SA, *EDS1* et *PAD4* (Wang et al., 2009). Janda et al. (2019) se sont intéressés à la signalisation ROS-dépendante de la PTI en situation de chaleur chez *A. thaliana*. L'éliciteur flg22 et le domaine N-terminale de EF-Tu (elf18) constituent des inducteurs de la PTI en condition normale de température, mais ceux-ci s'avèrent affectés chez des plantes préalablement exposées à la chaleur. Dans le cas de flg22, ce phénomène est lié à la répression transcriptionnelle et protéique de son récepteur spécifique *FLS2*. De plus, certains acteurs de signalisation et de réponse (*ICS1* et déposition de callose) sont aussi

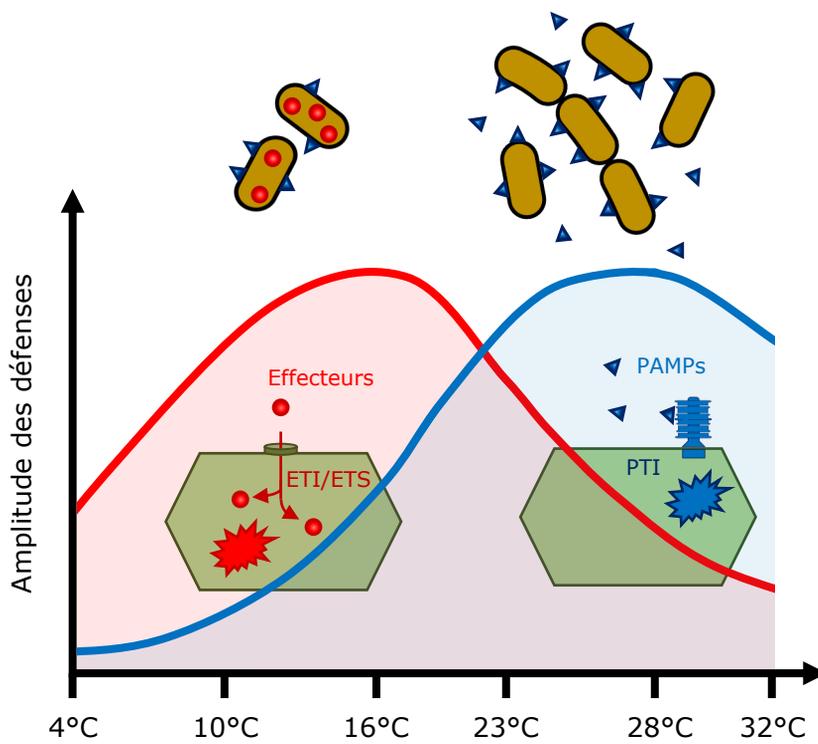


Figure 3.1.2.6 : Modèle de l'effet de la température sur les interactions entre les défenses des plantes et les bactéries phytopathogènes, proposé par Cheng et al. (2013).

réprimés transitoirement par la chaleur, en corrélation avec une sensibilité accrue à *Pst* (Janda et al., 2019).

Dans d'autres cas, la chaleur est plutôt propice au déclenchement de la PTI. D'ailleurs, des modèles suggèrent que l'ETI est préférentiellement activée à basse température (10 à 23°C) alors que la PTI est plutôt activée à des températures plus élevées (23 à 32°C). Ce constat est plutôt en accord avec la physiologie des bactéries phytopathogènes dont la prolifération peut être stimulée à températures élevées, alors que la sécrétion d'effecteurs est inhibée (Figure 3.1.2.6 ; Cheng et al., 2013a).

Ainsi, les réponses vis-à-vis d'un stress de chaleur combiné à une attaque par un bioagresseur sont complexes et différent de la réponse à chacun des stress individuels. La réponse globale est souvent proche de la réponse au stress unique le plus sévère ou de celui appliqué en dernier. La combinaison de stress contraint davantage la plante et implique donc une plus forte remobilisation du transcriptome que des stress individuels (Desaint et al., 2020).

Peu d'études se sont intéressées à la combinaison de la chaleur avec un stress biotique chez le pommier. Spadoni et al. (2015) ont testé l'effet de la chaleur (10 min à 45°C) avant ou après l'inoculation de pommes par un agent pathogène de conservation (*P. expansum*). Il s'avère que l'incidence de la maladie est nulle pour les pommes inoculées avant le stress chaleur et moins réduite (30%) pour celles inoculées après. Une analyse transcriptomique sur les pommes traitées à la chaleur montre une induction de gènes impliqués dans la thermotolérance (*HSF*, *HSP*, etc.), mais leurs rôles dans la résistance à la maladie n'est pas démontré (Spadoni et al., 2015).

3.2 Mise au point des conditions thermiques impactant l'efficacité de l'ASM

L'effet de la chaleur sur les voies de défense s'avère complexe, et ne permet pas de déterminer par avance le devenir de l'interaction entre un bioagresseur et son hôte (résistance ou sensibilité ; Desaint et al., 2020). De ce fait, certaines défenses stimulées par les SDP pourraient être exacerbées ou réprimées par une élévation de température.

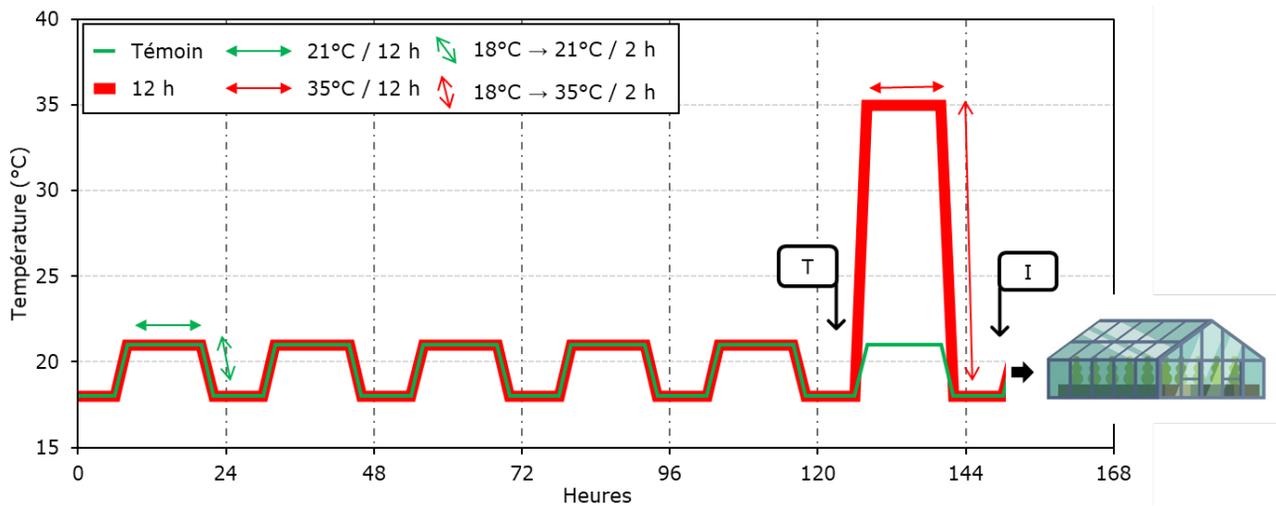


Figure 3.2.1.1 : Régimes thermiques appliqués sur semis de Golden Delicious pendant 6 jours pour évaluer l'effet d'un stress chaleur de 12h sur l'efficacité de protection de l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora*. Les plantes, préalablement cultivées en serre, sont placées en armoires climatiques à T0 et exposées à 2 séquences différentes : la séquence « témoin » (vert) ou une séquence « chaleur brutale » (rouge). Tous les programmes élémentaires débutent par une température nuit de 18°C pendant 8 h. La séquence témoin est constituée de programmes élémentaires similaires avec des passages rapides (2 h) de 18°C à un palier de 12 h à 21°C pour revenir (2h) à 18°C. La séquence « chaleur brutale » est identique à la séquence témoin excepté au 6^{ème} jour où est appliqué un stress de 35°C pendant 12h, avec des transitions rapides de 2h par rapport à la température nuit de 18°C. Les plantes sont traitées à l'ASM ou à l'eau le matin du jour 6 (T), puis remises en serre le matin du 7^{ème} jour pour être immédiatement inoculées par *E. amylovora* (I).

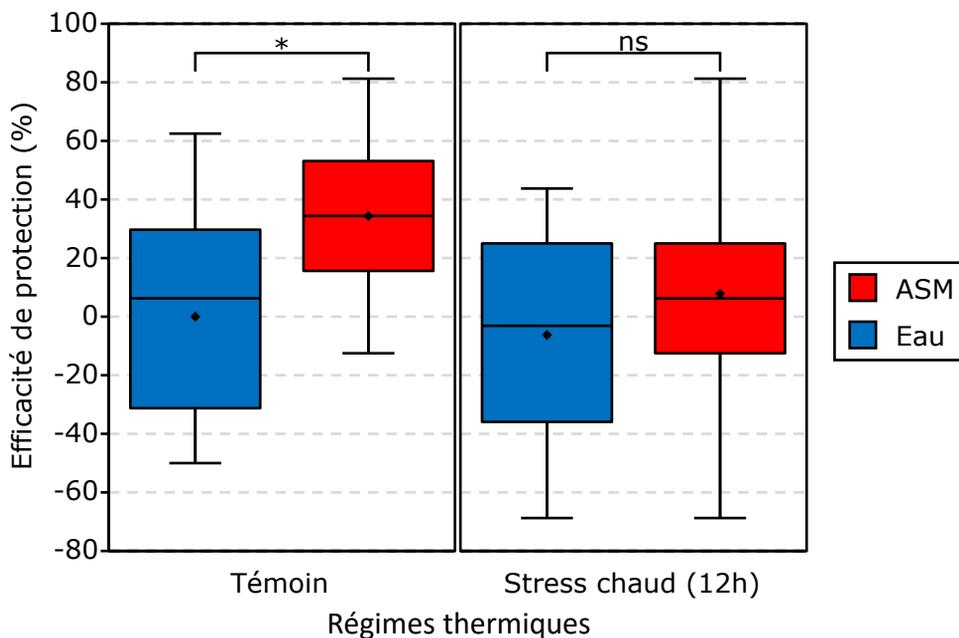


Figure 3.2.1.2 : Effet d'un stress chaleur de 12h sur l'efficacité de protection vis-à-vis d'*E. amylovora* conféré par l'ASM à des semis Golden Delicious. Régimes thermiques et successions des interventions décrits dans la Figure 3.2.1.1. Box-plots avec moyennes et médianes représentées respectivement par des losanges et des lignes horizontales. Efficacités de protection calculées à partir de l'incidence mesurée sur des blocs de 10 plantes, et rapportées à l'incidence moyenne des plantes traitées à l'eau et exposées à la séquence « témoin ». Valeurs issues de 4 expériences indépendantes comportant pour moitié 2 ou 4 répétitions biologiques par modalité de prélèvement et de traitement (n=12). Différences statistiques entre traitements pour chaque régime thermique obtenues par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (* : $p < 0,05$; ns : non-significatif).

3.2.1 Etude préliminaire vérifiant un effet de la chaleur sur l'ASM

Une expérience préliminaire a permis d'évaluer l'effet d'un stress de chaleur sur la capacité de l'ASM à protéger des semis Golden Delicious contre *E. amylovora*. Pour ce faire, les semis ont été placés en armoires climatiques pour y subir deux séquences différentes de programmes thermiques de 24 h sur 6 jours (Figure 3.2.1.1) :

- une séquence « témoin » constituée de 6 programmes identiques sur 24 h qui simulent les conditions en serre (18/21°C nuit/jour) : 0-8 h à 18°C, 10-22 h à 21°C avec pentes de 2h d'élévation/diminution de T°C (palier de 12 h à 21°C).
- une séquence de programmes appelée « chaleur brutale - 12 h », identique à la précédente exceptée l'application d'une journée de chaleur brutale de 35°C au 6^{ème} jour pendant 12 h juste après le traitement à l'ASM ou à l'eau : 0-8 h à 18°C, 10-22 h à 35°C avec pentes de 2h d'élévation/diminution de T°C (palier 12 h à 35°C).

Le matin du 7^{ème} jour, les semis ont été replacés en serre pour être inoculés par *E. amylovora*. Les évaluations de symptômes ont mis en évidence une perte d'efficacité de l'ASM induite par la chaleur (Figure 3.2.1.2). En effet, l'ASM ne confère plus une efficacité de protection significativement différente du traitement à l'eau lorsque les plantes sont exposées à un régime « chaleur brutale - 12 h », contrairement à la séquence « témoin ». Il est important de noter que dans cette expérience, l'ASM apporte en moyenne une faible protection sous le régime témoin (d'environ 35%) qui peut s'expliquer par une inoculation réalisée précocément, avant que les défenses ne soient pleinement déployées par l'ASM (au lieu de l'inoculation réalisée habituellement 3 jours après traitement). La chaleur semble être antagoniste aux voies de défenses stimulées par l'ASM. Cependant, cette expérience ne permet d'écarter l'hypothèse d'une perte d'efficacité causée par une évaporation ou une dégradation de l'ASM par la chaleur, puisque l'élévation de température est appliquée juste après le traitement.

3.2.2 Etude des conditions environnementales en verger

Dans l'expérience précédente, les conditions de températures appliquées (12 h à 35°C) n'étaient pas représentatives des températures auxquelles sont exposés les vergers sous nos latitudes. Pour se rapprocher de la réalité, les données de températures, d'humidité relative et de luminosité recueillies entre février 2016 et juillet 2018 sur le site de l'unité expérimentale de Beaucozé ont été analysées. L'évolution journalière de ces trois paramètres est présentée uniquement pour les jours les plus chauds, c'est-à-dire ceux dont la température atteint au moins les 35°C, afin de comprendre la dynamique journalière d'une vague de chaleur. Sur ces deux années, 13 jours atteignent au moins 35°C, essentiellement au mois de juin, juillet et août, avec un pic journalier de chaleur moyen de 36,2°C (Figure 3.2.2.1). Ces jours chauds peuvent

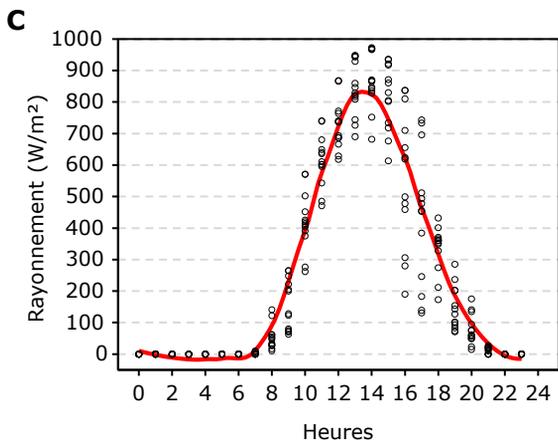
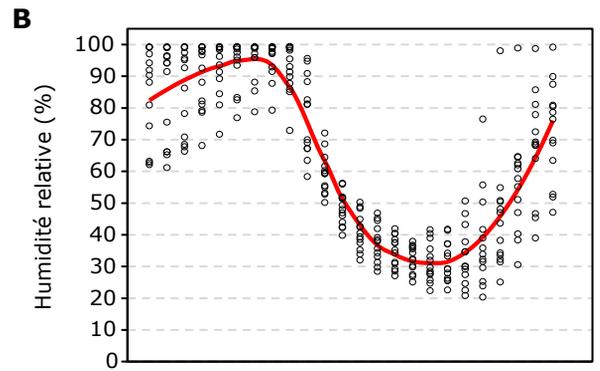
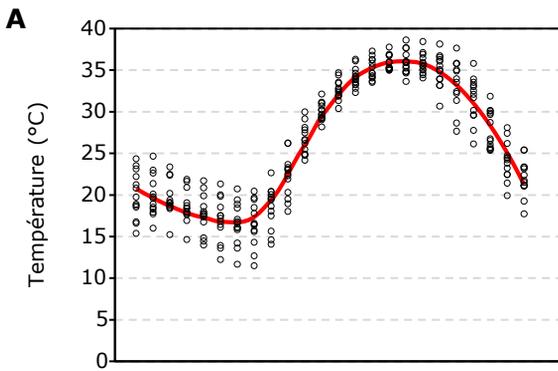


Figure 3.2.2.1 : Températures (A), humidités relatives (B) et rayonnements (C) des 13 jours les plus chauds ($T^{\circ}\text{C} > 35^{\circ}\text{C}$) dans le verger expérimental de l'INRAE entre février 2016 et juillet 2018. Durant cette période, seulement 13 jours atteignent les 35°C : 18-19/07/2016 ; 23-24-25/08/2016 ; 19-20-21/06/2017 ; 18/07/2017 ; 28-29/08/2017 ; 01-26/07/2018. En moyenne, les 13 jours atteignent des températures maximales de $36,2^{\circ}\text{C}$. Les courbes représentent la tendance moyenne des valeurs selon la méthode de Loess (span = 0,5).

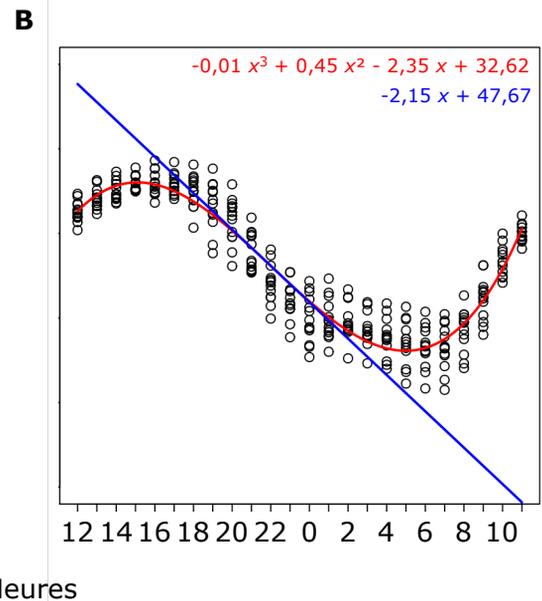
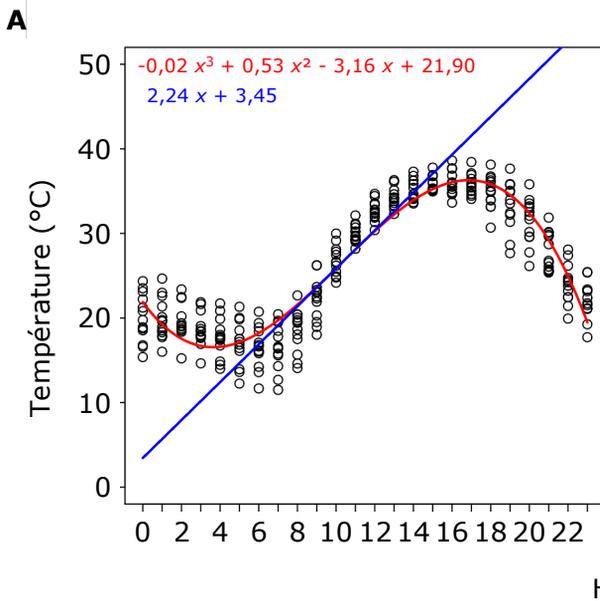


Figure 3.2.2.2 : Modélisation de l'élévation (A) et de l'abaissement (B) de la température sur les données des jours les plus chauds (atteignant au moins une température 35°C) dans le verger expérimental de l'INRAE d'Angers entre février 2016 et juillet 2018. Les courbes modélisant la température et leur équation respective sont affichées en rouge et les tangentes au point d'inflexion et leur équation respective en bleu.

être des évènements ponctuels ou bien se succéder sur une période de 3 jours maximum. La température est corrélée négativement avec l'humidité relative. Cette dernière oscille entre 30% au moment du pic maximal de chaleur et 100% pendant les températures les plus froides de la nuit. L'augmentation de la température débute entre 6 et 8 h et atteint en moyenne les 35°C à partir de 14 h, ce qui représente au minimum 6 h d'augmentation progressive de température. La température moyenne descend en dessous des 35°C à partir de 18 h, ce qui expose le verger à une chaleur moyenne de 36,2°C pendant 4 h. La température retombe progressivement à une température située entre 10°C et 25°C pendant la nuit qui dure environ 12 h, de 20 h à 8 h. La luminosité du jour augmente progressivement jusqu'à 12 h puis diminue de la même manière à partir de 14 h.

Les données de température permettent d'établir un modèle pour les pentes de changement de température (Figure 3.2.2.2). Le coefficient directeur de l'équation de la tangente au point d'inflexion de ces courbes indique le nombre de degrés moyen augmentant ou diminuant par heure :

- Pour l'augmentation de température :
 - Modèle d'élévation de la température : $-0,02 x^3 + 0,53 x^2 - 3,16 x + 21,90$
 - Point d'inflexion : 10 h 15
 - Equation de la tangente : $2,24 x + 3,45$
- Pour la diminution de température :
 - Modèle d'élévation de la température : $-0,01 x^3 + 0,45 x^2 - 2,35 x + 32,62$
 - Point d'inflexion : 22 h
 - Equation de la tangente : $-2,15 x + 47,67$

Ainsi, durant l'élévation ou l'abaissement de température, la température progresse de 2,24 °C.h⁻¹ ou diminue de 2,15 °C.h⁻¹ respectivement.

3.2.3 Effet de vagues de chaleur « naturelles » sur l'efficacité de protection de l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora*

Afin d'évaluer si des vagues de chaleur simulant les conditions du verger impactent aussi l'efficacité de l'ASM, une nouvelle expérience a été réalisée avec deux nouveaux régimes de températures ajoutés aux précédents (Figure 3.2.3.1) :

- une séquence de programmes appelée « chaleur naturelle - 4 h » incluant une journée de chaleur naturelle de 35°C dans les heures suivant le traitement, avec montée très progressive de température (6h) jusqu'à un palier à 35°C pendant 4h, puis redescente progressive.

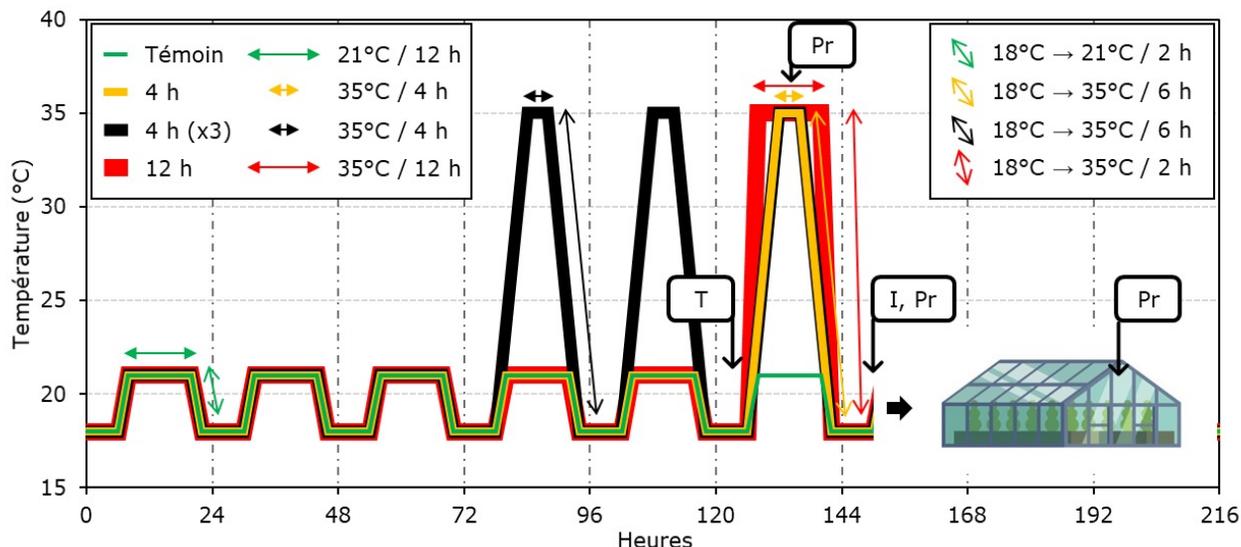


Figure 3.2.3.1 : Régimes thermiques appliqués sur semis Golden Delicious pendant 6 jours pour évaluer l'effet de la chaleur sur l'efficacité de protection de l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora* ainsi que sur l'induction de gènes marqueurs du stress chaleur. Les plantes, préalablement cultivées en serre, sont placées en armoires climatiques à T0 et exposées à 4 séquences différentes : la séquence « témoin » (vert), les séquences «chaleur naturelle/1 jour» (orange) et «chaleur naturelle/3 jours» (noir) mimant 1 ou 3 jours de chaleur « naturelle », ou une séquence « chaleur brutale » (rouge). Tous les programmes élémentaires débutent par une température nuit de 18°C pendant 8 h. La séquence témoin est constituée de programmes sur 24 h similaires avec des passages rapides (2 h) de 18°C à un palier de 12 h à 21°C pour revenir (2h) à 18°C. Les séquences appliquant un stress chaleur sont identiques à la séquence témoin excepté les jours d'application du stress. Séquences « chaleur naturelle » (1 ou 3 jours) : le passage à 35°C est progressif (6 h) jusqu'à un palier de 4 h à 35°C et est appliqué au 6^{ème} jour ou à partir du 4^{ème} jour sur 3 jours consécutifs. Séquence « chaleur brutale » : passage brutal (2 h) de 18°C à un palier de 12 h à 35°C le 6^{ème} jour. Traitements à l'ASM ou à l'eau le matin du jour 6 (T). Retour en serre le matin du 7^{ème} jour et inoculation par *E. amylovora* (I). Des prélèvements (Pr) sont réalisés 8 h, 24 h et 72 h après les traitements pour vérifier l'expression de gènes marqueurs (HSP) du stress chaleur.

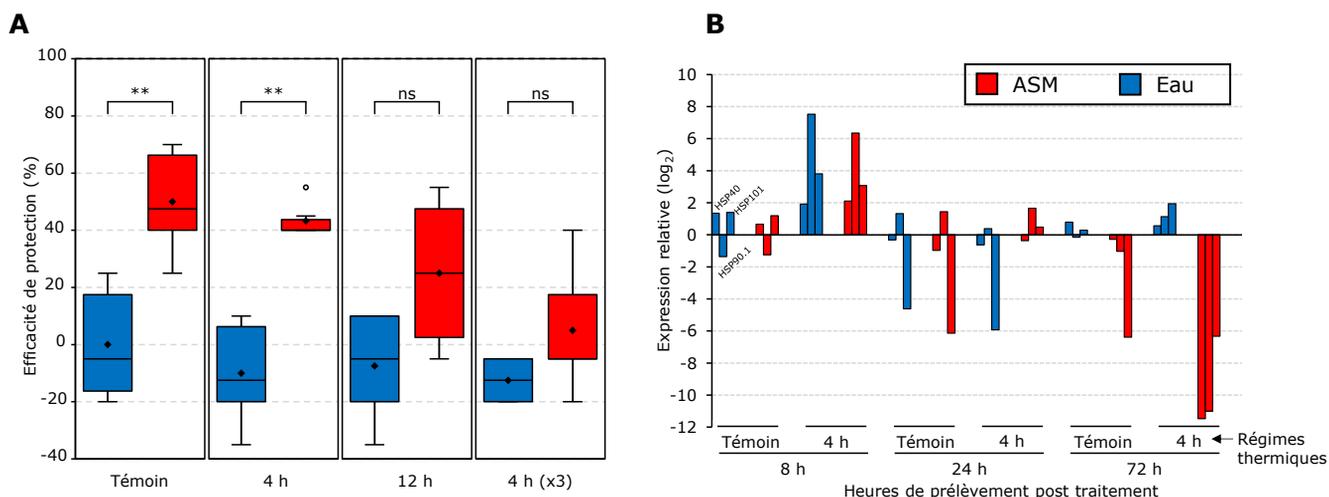


Figure 3.2.3.2 : Effet de différents régimes thermiques sur A) l'efficacité de protection vis-à-vis d'*E. amylovora* conférée par l'ASM et B) l'expression de 3 gènes *HSP* (*HSP40*, *HSP90.1* et *HSP101*) à/dans des semis Golden Delicious. Régimes thermiques et successions des interventions décrits dans la Figure 3.2.3.1. (A) Box-plots avec moyennes, médianes, et valeurs aberrantes représentés respectivement par des losanges, des lignes, et des cercles vides. Les efficacités de protection sont calculées à partir de l'incidence mesurée sur des blocs de 10 plantes et rapportées à l'incidence moyenne des plantes traitées à l'eau et exposées au programme témoin. Les valeurs de protection sont issues de 2 expériences indépendantes contenant chacune 3 répétitions biologiques (n=6). Pour chaque régime thermique, les différences statistiques entre les traitements sont obtenues par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (** : p < 0,01; ns : non-significatif). (B) Une seule valeur d'expression de chaque gène est représentée par modalité de prélèvement et de traitement (n=1) et est rapportée à la moyenne des 3 temps de prélèvements de plantes non-traitées en serre. Chaque échantillon est constitué d'un pool de 5 jeunes feuilles issues de plantes différentes.

- une séquence de programmes appelée « chaleur naturelle - 4 h x 3 » cumulant 3 jours de chaleur (identiques à la précédente) consécutifs, le traitement à l'ASM ou à l'eau ayant lieu le matin du 3^{ème} jour.

Le matin du 7^{ème} jour, les semis ont été replacés en serre pour être inoculés par *E. amylovora* et des prélèvements ont été effectués 8, 24 et 72h après les traitements pour évaluer l'expression de gènes de stress.

Chaque programme au sein de ces 4 séquences présente une humidité relative, inversement proportionnelle à la température, et une luminosité mimant les conditions naturelles rencontrées en verger (Annexe 1). Mises à part les séquences « témoin » et « chaleur brutale - 12 h » qui représentent des conditions totalement artificielles, les séquences « chaleur naturelle » (4 h et 4 h x 3) reproduisent au mieux les variations de températures observées en verger et décrites dans la section précédente. Comme les conditions naturelles relevées au verger, le palier maximum de 35°C est atteint entre 14 h et 18 h. De plus, l'augmentation/diminution de la température est progressive avec des pentes de 6 h, débutant et finissant respectivement à 8 h et minuit. Néanmoins, la pente est légèrement plus forte, puisque la température s'élève/s'abaisse de 2,83°C.h⁻¹ (+0,59 et -0,68°C par rapport aux conditions naturelles observées).

Concernant les résultats de protection vis-à-vis d'*E. amylovora*, une perte d'efficacité de l'ASM est de nouveau observée pour les plantes soumises à la séquence « chaleur brutale - 12 h », comparées aux plantes placées dans les conditions « témoin » (Figure 3.2.3.2A). Une seule journée de chaleur naturelle (« chaleur naturelle - 4 h ») n'affecte pas significativement l'efficacité de l'ASM, en offrant une protection de 42,5%. Par contre, le cumul de trois jours de « chaleur naturelle » ne permet plus de protection significative par l'ASM. De plus, l'efficacité de protection est davantage diminuée sous le régime « chaleur naturelle - 4 h x 3 » (5%) que le régime « chaleur brutale - 12 h » (25%). Le design expérimental de cette expérience permet d'écarter l'hypothèse d'une perte d'efficacité causée par une dégradation/évaporation de l'ASM pour le régime « chaleur naturelle - 4 h x 3 ». En effet, l'efficacité de l'ASM ne semble pas être affectée par l'exposition à une journée unique de chaleur suite au traitement. De plus, une expérience complémentaire montre que de l'ASM placé pendant 4 h à 35°C et appliqué ensuite sur les semis apporte toujours une protection (efficacité de protection de près de 58% par rapport à l'eau chauffée dans les mêmes conditions ; données non montrées), ce qui élimine l'hypothèse d'une dégradation de l'ASM par la chaleur pour ces 3 régimes.

Notre régime témoin est supposé être optimal pour la croissance du pommier et à l'inverse, nos vagues de chaleur sont supposées être perçues comme un stress thermique. Pour le vérifier, l'expression de 3 gènes *HSP* (*HSP40*, *HSP90.1* et *HSP101*) a été quantifiée dans des plantes exposées au régime « témoin » et « chaleur naturelle - 4 h » (la plus courte chaleur appliquée) et comparée à des semis cultivés en serres. Les résultats (Figure 3.2.3.2B) montrent

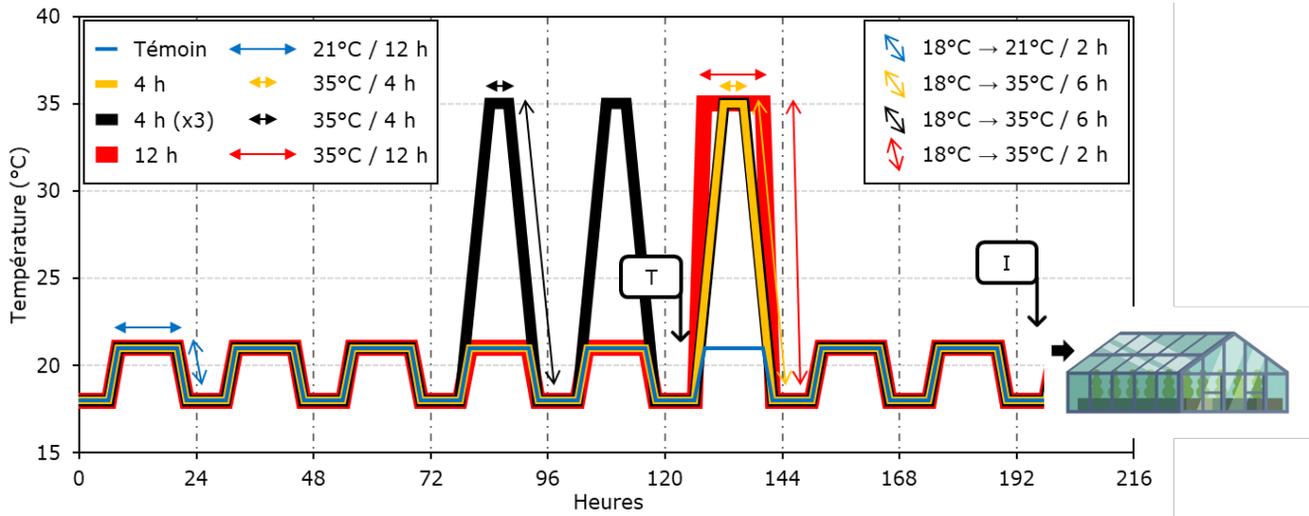


Figure 3.2.3.3 : Régimes thermiques appliqués à GDDH13 pendant 9 jours pour évaluer l'effet de la chaleur sur l'efficacité de protection de l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora*. Les plantes, préalablement cultivées en serre, sont placées en armoires climatiques à T0 et exposées à 4 séquences différentes : la séquence « témoin » (bleu), les séquences « chaleur naturelle/1 jour » (orange) et « chaleur naturelle/3 jours » (noir) mimant 1 ou 3 jours de chaleur « naturelle », ou une séquence « chaleur brutale » (rouge). Tous les programmes élémentaires débutent par une température nuit de 18°C pendant 8 h. La séquence témoin est constituée de programmes élémentaires similaires avec des passages rapides (2 h) de 18°C à un palier de 12 h à 21°C pour revenir (2h) à 18°C. Les séquences appliquant un stress chaleur sont identiques à la séquence témoin excepté les jours d'application du stress. Séquences « chaleur naturelle » (1 ou 3 jours) : passage à 35°C est progressif (6 h) jusqu'à un palier de 4 h à 35°C et est appliqué au 6^{ème} jour ou à partir du 4^{ème} jour sur 3 jours consécutifs. Séquence « chaleur brutale » : passage brutal (2 h) de 18°C à un palier de 12 h à 35°C le 6^{ème} jour. Traitements à l'ASM ou à l'eau le matin du jour 6 (T). Retour en serre le matin du 7^{ème} jour et inoculation par *E. amylovora* (I).

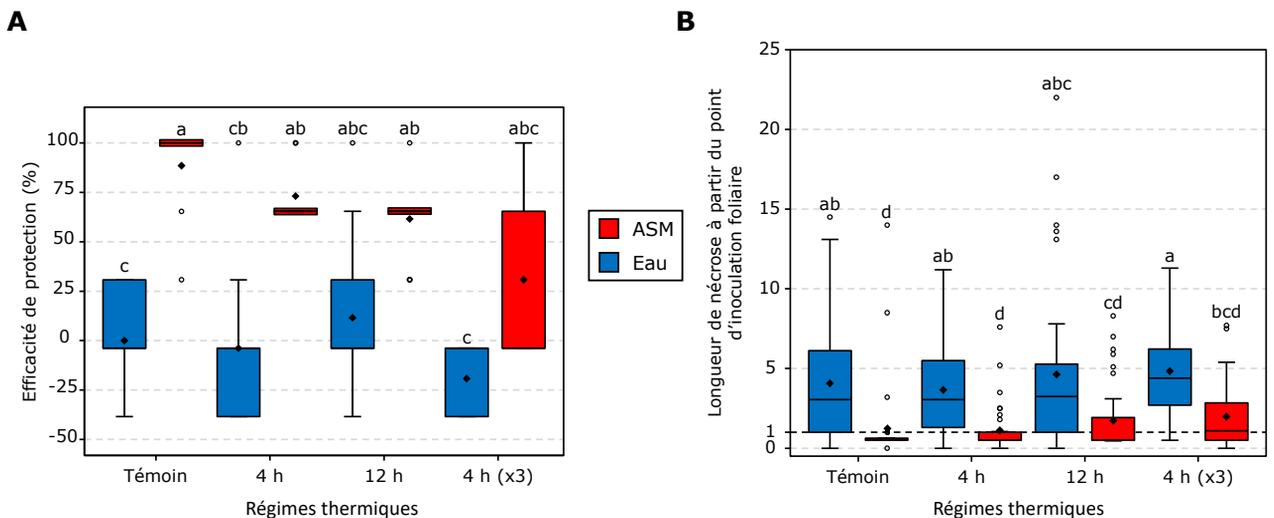


Figure 3.2.3.4 : Effet de différents régimes thermiques sur A) l'efficacité de protection vis-à-vis d'*E. amylovora* conféré par l'ASM et B) la sévérité des symptômes dans GDDH13. Régimes thermiques et successions des interventions décrits dans la Figure 3.2.3.3. Box-plots avec moyennes, médianes, et valeurs aberrantes représentés respectivement par des losanges, des lignes, et des cercles vides. Les différences statistiques globales sont établies par un test de Kruskal-Wallis (A : $p = 7,339e-07$; B : $p = 3,209e-14$) et les lettres désignent les différences statistiques établies par un test « post-hoc » de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni ($\alpha = 0,05$). (A) Efficacités de protection calculées à partir de l'incidence mesurée sur des blocs de 4 plantes et rapportées à l'incidence moyennes des plantes traitées à l'eau et exposées au régime témoin. Valeurs de protection issues de 3 expériences indépendantes contenant chacune 3 répétitions biologiques ($n=9$). (B) Notes attribuées selon la progression de la nécrose : pas de nécrose (0) ; nécrose atteignant la nervure (0,5), le pétiole (1), la tige (x cm sur tige + 1). Valeurs issues de 36 plants greffés par modalité, réparties équitablement sur 3 expériences indépendantes.

que les 3 gènes *HSP* ont tendance à être induits de manière transitoire uniquement pendant le palier de 4 h de chaleur (prélèvement 8 h), et que la *HSP90.1* est la plus réactive des 3 *HSP* suivies. Ces données d'expression confirment donc que le régime « chaleur naturelle - 4 h » est perçu comme un stress de chaleur transitoire, ce qui suppose que les autres régimes « chaleur brutale - 12 h » et « chaleur naturelle - 4 h x 3 » sont au moins perçus de la même façon, voire de manière plus intense.

L'effet antagoniste de la chaleur sur l'efficacité de l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora* a ensuite été vérifié sur des plants greffés du double haploïde Golden (GDDH13), un matériel végétal dont le génome séquencé est de bonne qualité, facilitant les études transcriptomiques. Les 4 mêmes séquences de régimes thermiques que précédemment ont été appliquées, la seule nuance étant que l'inoculation a été réalisée 3 jours après traitement à l'ASM au lieu de 24 h (Figure 3.2.3.3). L'évaluation des symptômes montre, un mois après inoculation, que l'ASM protège significativement dans la condition « témoin » uniquement, et ce de manière exceptionnellement forte (à 100%) (Figure 3.2.3.4A). Même si l'efficacité de protection n'est pas significativement différente entre le traitement eau et ASM pour tous les autres régimes thermiques, elle semble la plus faible pour le régime « chaleur naturelle - 4 h x 3 », avec une variabilité beaucoup plus importante pour cette dernière. Pour compléter ces mesures d'efficacité de protection basées sur l'incidence, la taille des nécroses a été mesurée à partir du point d'inoculation foliaire (Figure 3.2.3.4B). L'ASM diminue significativement la sévérité (par rapport au témoin eau) pour les régimes « témoin » et « chaleur naturelle - 4 h ». En effet, la plupart des nécroses s'arrêtent au pétiole (≤ 1 cm) pour les plantes traitées à l'ASM dans ces conditions, alors qu'elles se développent sur tige (> 2 cm en moyenne) pour les plantes traitées à l'eau. En revanche, l'effet de l'ASM diminue sur les plants greffés exposés aux séquences « chaleur brutale - 12 h » et « chaleur naturelle - 4 h x3 », avec notamment l'apparition de nécroses sur tige (> 1 cm) pour un nombre conséquent de plants. L'ASM réduit cependant toujours de manière significative la sévérité des symptômes par rapport au traitement eau dans le régime « chaleur naturelle - 4 h x 3 », bien que les longueurs de nécroses observées soient en moyenne plus élevées par rapport aux autres régimes, que ce soit pour le traitement eau ou ASM. Ainsi, l'accumulation au préalable de deux vagues de chaleur « naturelles » avant le traitement semble sensibiliser le pommier vis-à-vis d'*E. amylovora*, peu importe le traitement appliqué.

La diminution de l'efficacité de l'ASM observée après 12 h à 35°C pourrait être attribuée à un effet direct de la chaleur sur le produit, soit en le dégradant, soit en provoquant une évaporation plus rapide du produit à la surface des feuilles, limitant ainsi la pénétration de la substance active dans la plante. Cependant, l'ASM subit la même exposition thermique dans les enchaînements « chaleur naturelle - 4 h » et « chaleur naturelle - 4 h x 3 », alors que dans ce dernier régime, l'efficacité de l'ASM a tendance à être davantage variable. Le cumul de deux vagues de chaleur a donc tendance à aggraver la perte d'efficacité de l'ASM.

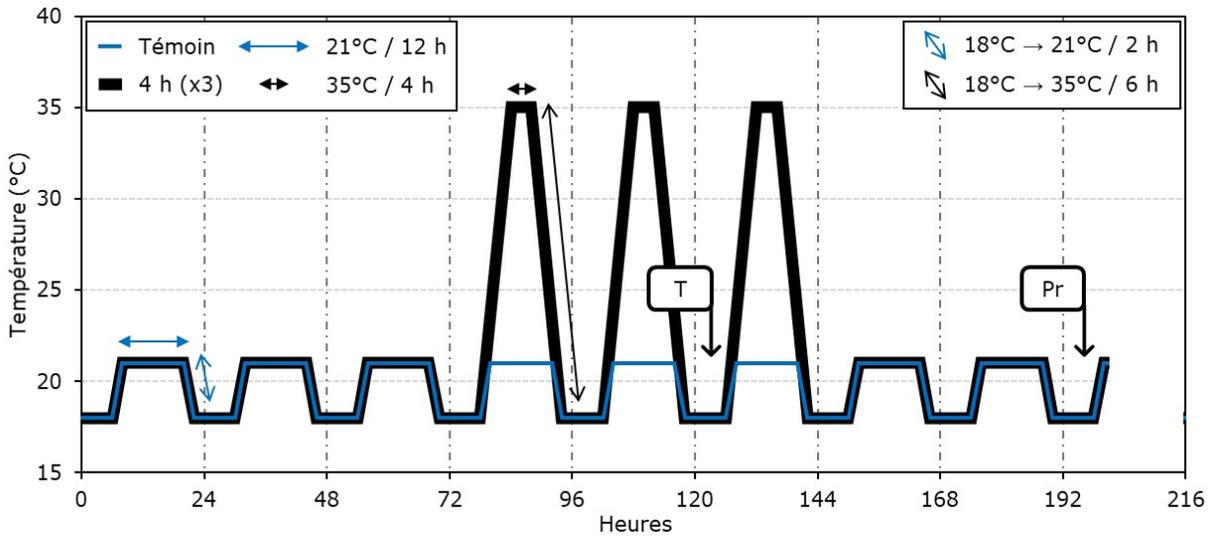


Figure 3.3.1.1 : Régimes thermiques appliqués à GDDH13 pendant 9 jours pour évaluer l'effet de l'ASM combiné à la chaleur sur le transcriptome. Les plantes, préalablement cultivées en serre, sont placées en armoires climatiques à T0 et exposées à 2 séquences différentes : une séquence témoin (bleu) et une séquence mimant 3 jours caniculaires successifs avec un pic de 4 h à 35°C (4 h (x3) ; noir). Tous les programmes élémentaires débutent par une température de 18°C pendant 8 h. Séquence témoin : programmes élémentaires similaires avec des passages progressifs (2 h) de 18°C à un palier de 12 h à 21°C pour revenir (2h) à 18°C. Séquence « chaleur » identique à la séquence témoin excepté les 3 jours consécutifs de chaleur démarrant le 4^{ème} jour avec un passage progressif (6 h) de 18°C à un palier de 4 h à 35°C, puis d'une diminution progressive (6 h) pour atteindre 18°C. Traitements à l'ASM ou à l'eau le matin du jour 6 (T), prélèvements le 9^{ème} jour (Pr).

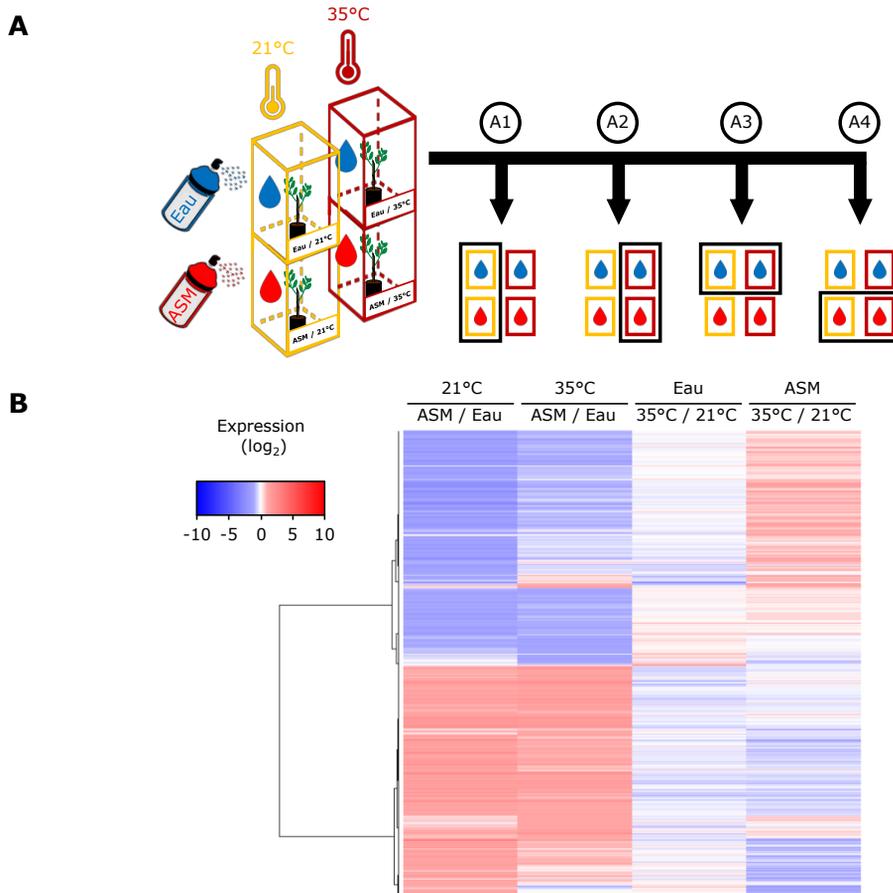


Figure 3.3.1.2 : Modulation du transcriptome de GDDH13 jours après application de l'ASM comparé à l'eau, et exposés à la modalité témoin ou à la modalité chaleur. A) A1, A2, A3, A4 : co-hybridations effectuées. B) Transcrits significativement ($p \leq 0,05$) sur-exprimés ($\log_2 \geq 1$) ou sous-exprimés ($\log_2 \leq -1$) dans au moins 1 des 4 comparaisons (3517 transcrits). Classification hiérarchique réalisée à partir d'une matrice de dissimilarité.

3.3 Reprogrammation transcriptomique du pommier en réponse à l'ASM et/ou à la chaleur

3.3.1 Expériences et comparaisons réalisées pour l'analyse transcriptomique

Pour déterminer l'impact de la chaleur sur le transcriptome du pommier et sur sa capacité à éliciter ses défenses après traitement à l'ASM, une analyse microarray a été entreprise. Pour ce faire, la séquence de programmes mimant des vagues de chaleur naturelles et affectant le plus l'efficacité de l'ASM (« chaleur naturelle - 4 h x 3 ») a été comparée à la séquence témoin. Ces conditions seront par la suite appelées respectivement « modalité chaleur » et « modalité témoin » (Figure 3.3.1.1). Les échantillons dédiés à cette analyse sont issus de 2 des 3 répétitions expérimentales dédiées aux tests de protection de l'ASM, grâce à la collecte des portions de feuilles excisées au cours de l'inoculation (coupure des feuilles au $\frac{2}{3}$ par des ciseaux préalablement trempés dans l'inoculum). Ainsi les feuilles ont été prélevées 3 jours après traitement (le même jour que l'inoculation), les plantes ayant toutes été remises en conditions « témoin » deux jours avant inoculation. Ce choix présente l'avantage de permettre d'évaluer l'état transcriptionnel des tissus au moment où l'inoculation par *E. amylovora* a été réalisée. Une comparaison en dye-swap a été réalisée, c'est-à-dire que deux répétitions biologiques issues de deux expériences indépendantes ont été marquées respectivement par chacun des fluorochromes. Ainsi, 4 types de comparaison ont été réalisés (Figure 3.3.1.2A) pour évaluer :

- L'effet de l'ASM par rapport à l'eau sur des plants greffés exposés à la modalité témoin (ASM/Eau - 21°C).
- L'effet de l'ASM par rapport à l'eau sur des plants greffés exposés à la modalité chaleur (ASM/Eau - 35°C).
- L'effet de la modalité chaleur par rapport à la modalité témoin sur les plants greffés traités à l'eau (35°C/21°C - Eau).
- L'effet de la modalité chaleur par rapport à la modalité témoin sur les plants greffés traités à l'ASM (35°C/21°C - ASM).

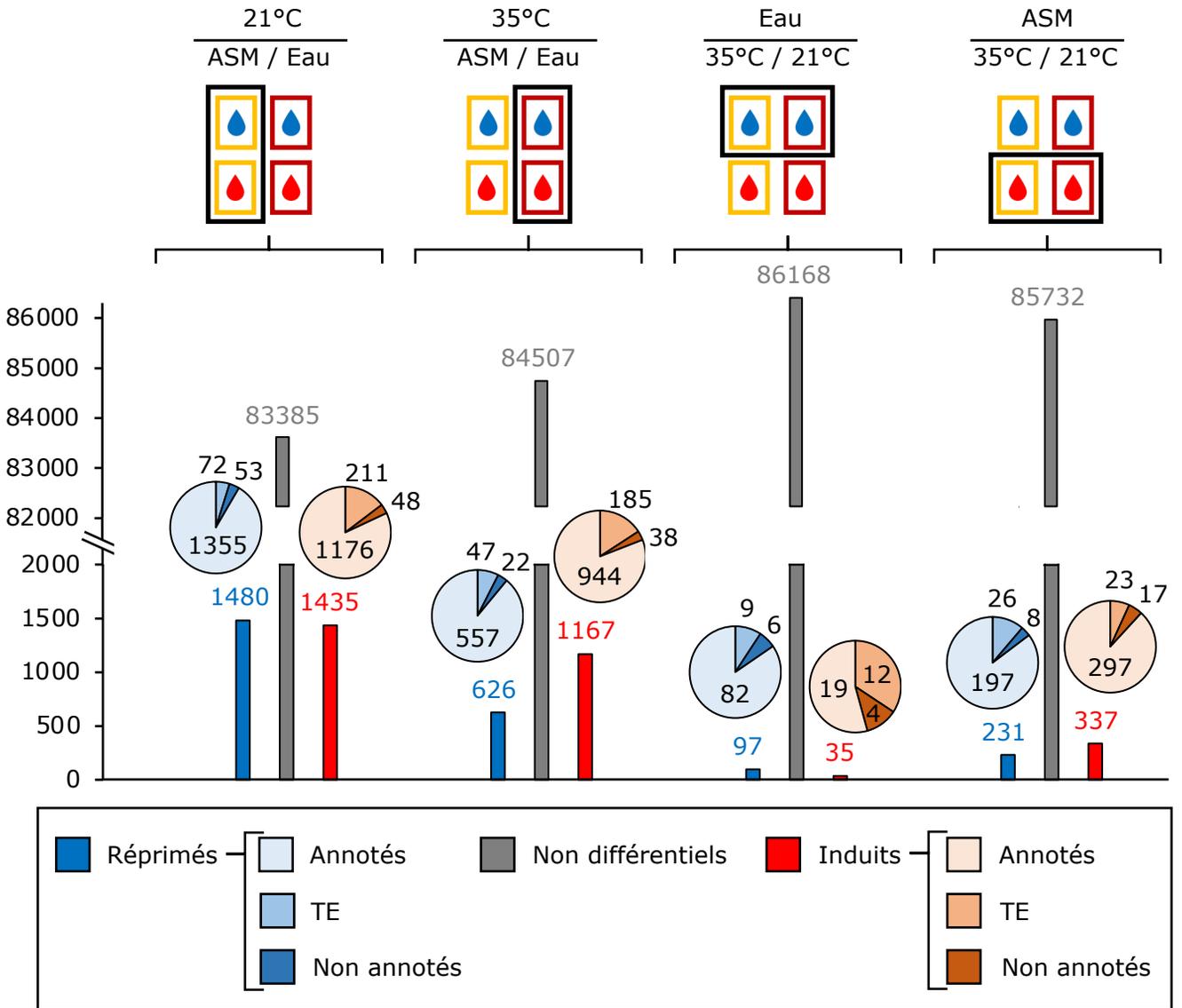


Figure 3.3.2 : Effectifs des transcrits non-différentiellement exprimés, induits ou réprimés dans les 4 co-hybridations effectuées (voir Figure 3.3.1.2). Les camemberts représentent la part des gènes dont la fonction est annotée ou non dans le génome séquencé de GDDH13, ainsi que la part des éléments transposables (TE) au sein de l'ensemble des gènes induits ou réprimés d'une comparaison. Seuil de significativité appliqué de $p = 0,05$ pour les gènes induits et réprimés avec des \log_2 ratios respectivement supérieurs à 1 et inférieurs à -1.

3.3.2 Effectifs des transcrits différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons

L'analyse statistique globale identifie 3517 transcrits significativement ($p \leq 0,05$), sur-exprimés ($\log_2 \geq 1$) ou sous-exprimés ($\log_2 \leq -1$) dans au moins une des 4 comparaisons, et regroupés en 2 clusters principaux (Figure 3.3.1.2B) :

- Des transcrits sur-exprimés en réponse à l'ASM par rapport à l'eau quelles que soient les températures appliquées, mais souvent à un niveau d'expression moins élevé dans la modalité chaleur que dans la modalité témoin (ce qui se traduit sur la heatmap par la répression de ces mêmes transcrits dans la comparaison « 35°C/21°C – ASM »). Ce type de profil est susceptible de révéler des facteurs de résistance vis-à-vis d'*E. amylovora*, induits par l'ASM mais en partie réprimés par la chaleur, qui nous intéressent particulièrement.
- Des transcrits sous-exprimés en réponse à l'ASM par rapport à l'eau quelles que soient les températures appliquées, mais souvent à un niveau d'expression plus élevé dans la modalité chaleur par rapport à la modalité témoin (ce qui se traduit sur la heatmap par l'induction de ces mêmes transcrits dans la comparaison « 35°C/21°C – ASM »). Ce type de profil est susceptible de receler des facteurs de sensibilité à *E. amylovora*, réprimés par l'ASM mais en partie induits par la chaleur, qui nous intéressent également.

La Figure 3.3.2 détaille le nombre de transcrits différentiellement modulés ou non dans chaque comparaison ainsi que l'état de leur annotation (annoté en tant que gène, inconnu, ET). Elle révèle globalement que davantage de transcrits sont significativement modulés par le traitement ASM (« ASM/Eau - 21°C » : 2915 transcrits ; « ASM/Eau - 35°C » : 1793 transcrits) que par un passage à 35°C (« 35°C/21°C – Eau » : 132 transcrits ; « 35°C/21°C – ASM » : 568 transcrits). De plus, l'impact de la température semble plus marqué dans les plantes traitées à l'ASM que dans celles traitées à l'eau, le transcriptome de ces dernières n'étant que très faiblement modulé (568 vs 132 transcrits différentiels respectivement). Ainsi, c'est seulement en combinaison avec l'ASM que la chaleur impacte durablement (c'est-à-dire après retour aux conditions « normales ») le transcriptome. Les données de la comparaison « 35°C/21°C – ASM » devraient permettre de mettre en lumière i) des facteurs de résistance induits par l'ASM mais réprimés par la chaleur et ii) des facteurs de sensibilité réprimés par l'ASM mais induits par la chaleur.

Parmi tous les transcrits différentiellement exprimés dans chaque comparaison, ceux qui correspondent à des gènes annotés dans le génome de GDDH13 sont largement majoritaires par rapport aux gènes de fonction inconnue et aux TE. Ils représentent environ 80 à 90 % des transcrits différentiels alors qu'ils correspondent à moins de la moitié (40420/86300) des gènes

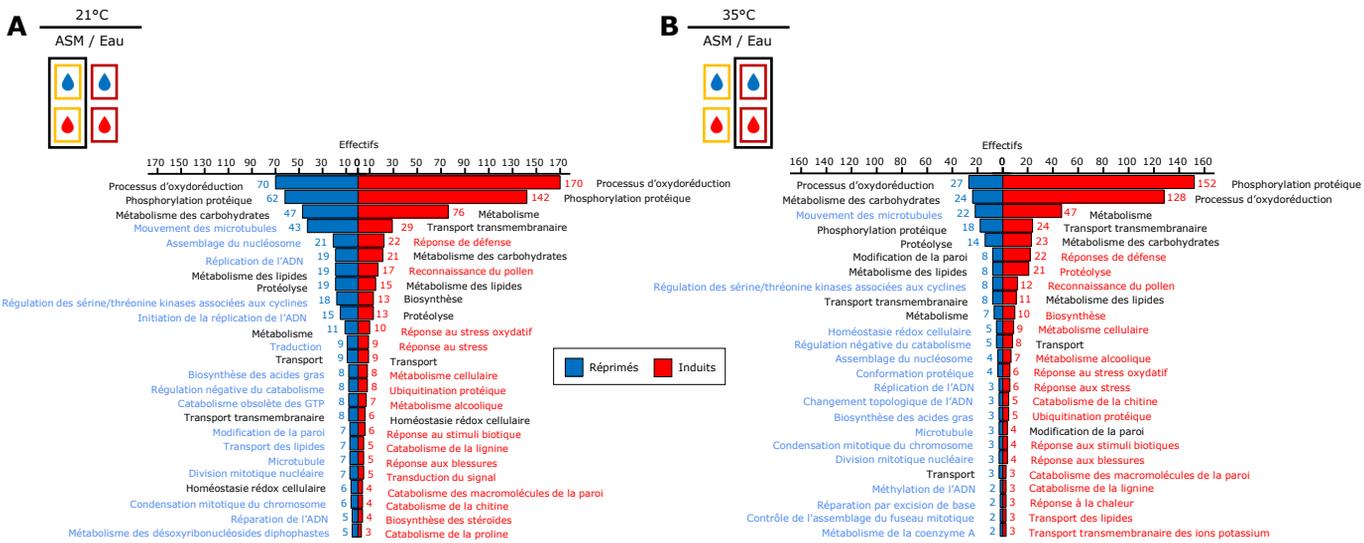


Figure 3.3.3.1 : Ontologie des processus biologiques dans lesquels sont impliqués les gènes réprimés ou induits par l'ASM dans GDDH13 exposé à la modalité témoin (A) ou à la modalité chaleur (B). Processus biologiques figurés en rouge si qu'induits, en bleu si que réprimés et en noir s'ils sont à la fois induits et réprimés.

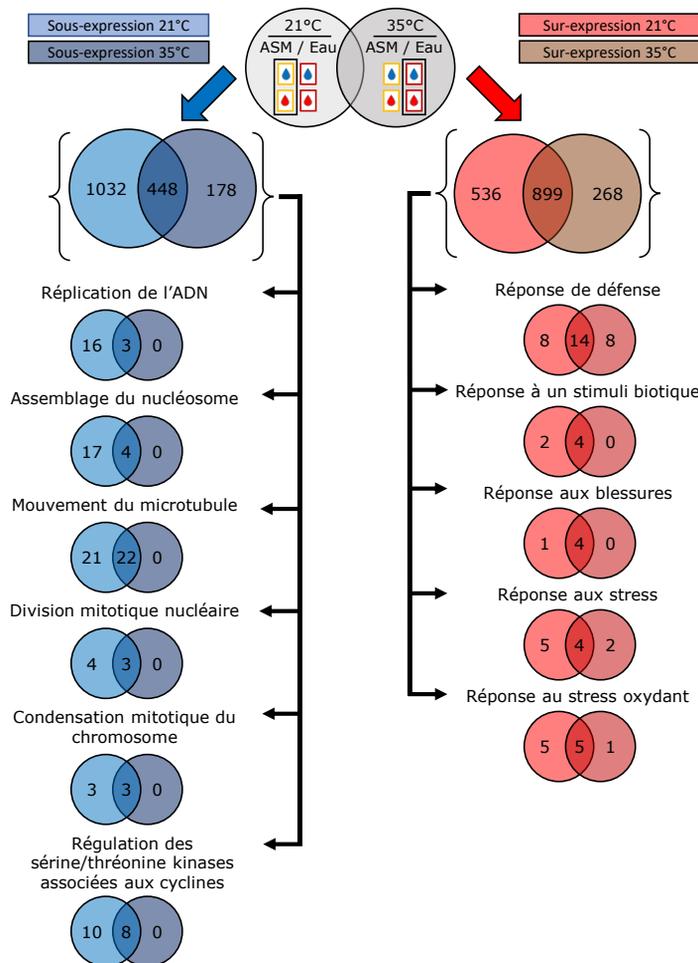


Figure 3.3.3.2 : Diagrammes de Venn du nombre de gènes participant aux processus biologiques (ontologie GO) sous- (gauche) ou sur-exprimés (droite) par l'ASM dans GDDH13 exposé à la modalité témoin ou la modalité chaleur. Analyse globale et détail des processus biologiques communs susceptibles d'être impliqués dans les défenses contre les agents phytopathogènes (à droite) et dans le cycle cellulaire (à gauche).

présents sur la puce. La seule exception concerne les transcrits induits dans la comparaison « 35°C/21°C – Eau », mais cela ne représente qu'un total de 35 transcrits sur-exprimés en réponse à la chaleur, rendant l'étude des catégories de transcrits peu pertinente. Globalement, la proportion de transcrits différentiels non annotés est négligeable dans toutes les comparaisons. La proportion de transcrits correspondants à des TE est 2 à 3 fois supérieure parmi ceux induits que parmi ceux réprimés par l'ASM, quelle que soit la température. Par contre, la modalité chaleur provoque la sur- ou sous-expression d'un nombre quasiment égal de TE par rapport à la modalité témoin, que les plantes soient traitées à l'eau (9 sous-exprimés contre 12 sur-exprimés) ou à l'ASM (26 sous-exprimés contre 23 sur-exprimés).

3.3.3 Ontologie des gènes différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons

Pour avoir une vue globale de la fonction des gènes différentiellement exprimés, une étude des annotations fonctionnelles issues de l'ontologie GO a été réalisée. Une première approche a consisté à évaluer les effectifs de gènes sur- et sous-exprimés dans chaque catégorie fonctionnelle des trois grands axes de la classification GO : « processus biologique », « compartiment cellulaire » et « fonction moléculaire » (Annexe 2). Pour les deux derniers axes, de nombreuses catégories fonctionnelles se sont révélées sur-représentées à la fois en induction et en répression de gènes, rendant les résultats difficilement interprétables. Seul l'axe « processus biologiques » a montré une nette différence entre les catégories de gènes sur- ou sous-exprimés malgré quelques redondances pour des catégories aux fonctions très diverses telles que « processus d'oxydoréduction », « phosphorylation protéique » ou « métabolisme des carbohydrates ». La suite de l'analyse est donc focalisée sur les gènes classés « processus biologiques ».

Catégories fonctionnelles modulées par l'ASM dans les deux modalités de température

Les mêmes catégories fonctionnelles sur-représentées après traitement à l'ASM sont retrouvées dans les deux modalités de température (Figure 3.3.3.1). Les gènes induits sont plutôt liés à la résistance aux agents pathogènes avec des catégories fonctionnelles telles que « réponse de défense », « réponse aux stimuli biotiques », « réponse aux blessures », « réponse au stress », « réponse au stress oxydatif » alors que les gènes réprimés sont plutôt liés à la croissance et au développement avec des catégories fonctionnelles associées au cycle cellulaire telles que « réplication de l'ADN », « assemblage du nucléosome », « mouvement des microtubules », « division mitotique nucléaire », « condensation mitotique du chromosome », « régulation des sérines/thréonines kinases associées aux cyclines ».

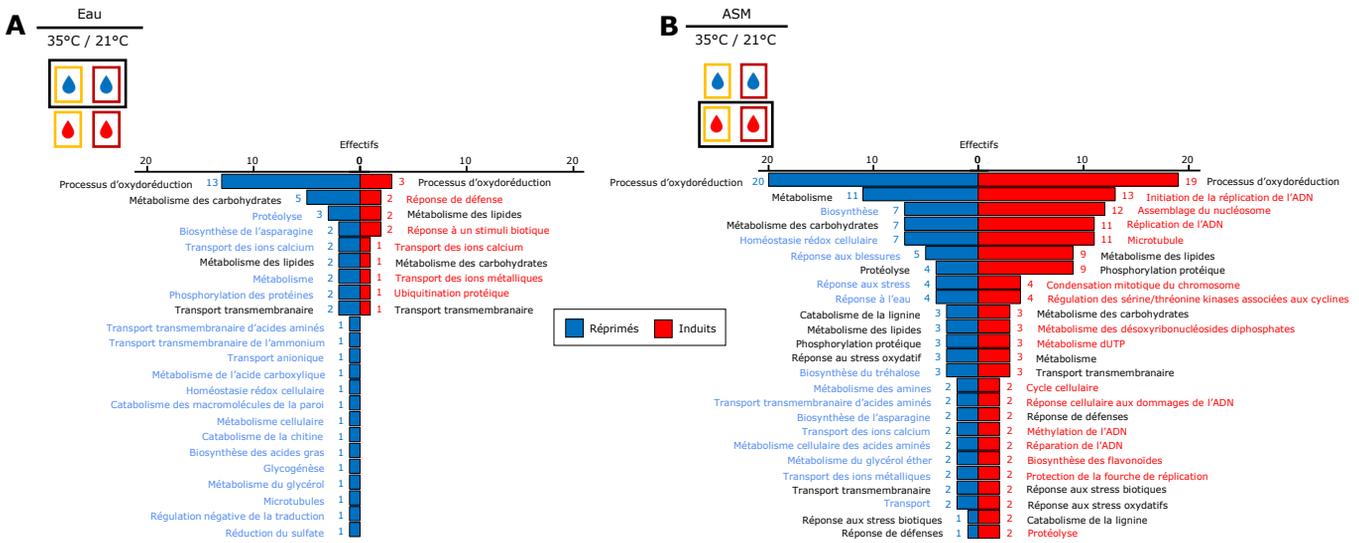


Figure 3.3.3.3 : Ontologie des processus biologiques dans lesquels sont impliqués les gènes réprimés ou induits par la modalité chaleur par rapport à la modalité témoin dans GDDH13 prétraité à l'eau (A) ou à l'ASM (B). Processus biologiques figurés en rouge si qu'induits, en bleu si que réprimés et en noir s'ils sont à la fois induits et réprimés.

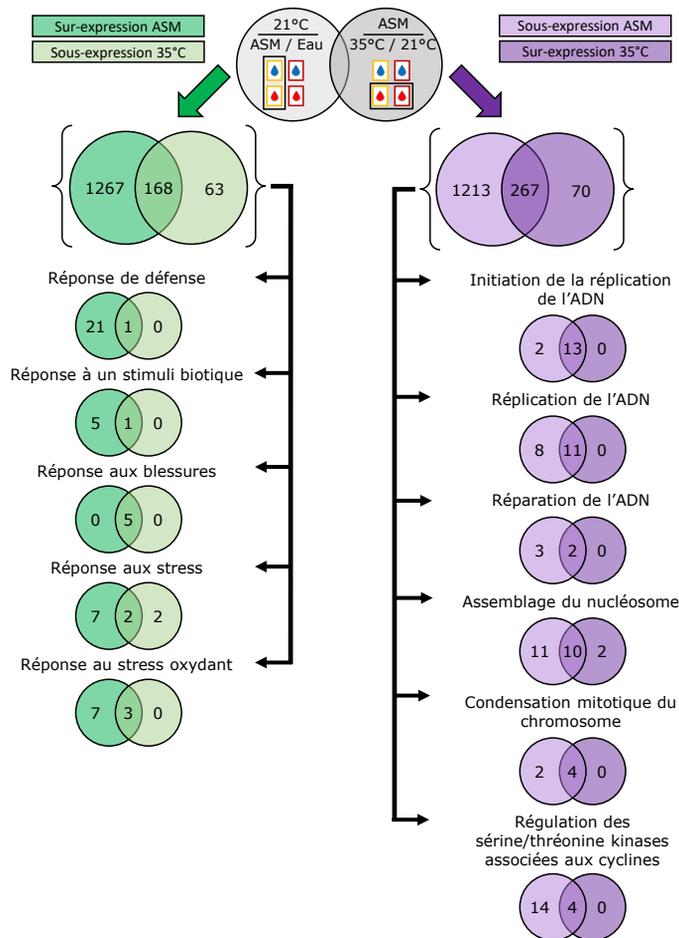


Figure 3.3.3.4 : Diagrammes de Venn du nombre de gènes participant aux processus biologiques (ontologie GO) inversement exprimés dans GDDH13 entre les comparaisons ASM/Eau-21°C d'une part et 35°C/21°C-ASM d'autre part. Analyse globale et détail des processus biologiques communs susceptibles d'être impliqués dans les défenses contre les agents phytopathogènes (à gauche) et dans le cycle cellulaire (à droite).

Concernant les transcrits induits, plus de la moitié sont communs entre les deux modalités de température (899/1435 pour la modalité témoin et 899/1167 pour la modalité chaleur ; Figure 3.3.3.2). L'exposition à la modalité chaleur réduit le nombre de gènes induits par l'ASM dans la majorité des processus biologiques susceptibles d'être impliqués dans la réponse aux agents phytopathogènes (1 à 4 gènes en moins selon les classes), à l'exception de ceux appartenant à la classe « réponse de défense » dont les effectifs sont identiques entre les deux modalités de température. Pour cette catégorie, même si l'effectif est identique (22), seuls 14 gènes sont communs entre les deux comparaisons (Figure 3.3.3.2). Parmi les 8 gènes de « réponse de défense » induits par l'ASM spécifiquement dans la modalité témoin (et potentiellement impliqués dans une meilleure protection induite), 4 codent des récepteurs immunitaires (type TIR-NBS-LRR, NB-ARC ou ADR1), 2 codent des protéines transmembranaires (MLO) et 2 codent des protéines impliquées dans la réponse aux stress (homologue de MLP 423). Les gènes de « réponse à un stimuli biotique » induits par l'ASM, essentiellement des homologues de MLP 423, sont communs aux deux modalités de température à deux exceptions près mises en évidence dans la modalité témoin uniquement. Les gènes de « réponse aux blessures » induits par l'ASM codent des inhibiteurs de protéase à sérine, et sont communs aux deux modalités de température, à l'exception d'un induit uniquement dans la modalité témoin. Les gènes liés à « la réponse au stress oxydant » codent essentiellement des peroxydases, dont 5 sont communes aux deux conditions de température et 1 et 5 spécifiques à la modalité 21°C et 35°C respectivement.

Concernant les transcrits réprimés par l'ASM, seuls 448 sont communs aux deux modalités de température, ce qui correspond à moins de la moitié des transcrits pour les plantes exposées à la modalité témoin (448/1480) et à plus de $\frac{2}{3}$ pour la modalité chaleur (448/626 ; Figure 3.3.3.2). L'exposition à la chaleur semble réduire très fortement le nombre de transcrits réprimés par l'ASM (Figure 3.3.2). Pour les classes fonctionnelles liées au cycle cellulaire (Figure 3.3.3.2), il est intéressant de noter qu'aucun gène réprimé par l'ASM n'est propre à la modalité chaleur : la totalité des gènes mis en évidence sont réprimés spécifiquement dans la modalité témoin ou commune aux deux modalités.

Catégories fonctionnelles modulées par la température dans les plantes traitées à l'eau d'une part et à l'ASM d'autre part

Comme déjà évoqué (Figure 3.3.2), la chaleur a peu d'effet sur l'accumulation différentielle de transcrits, notamment pour les plantes traitées à l'eau, comparaison pour laquelle peu de processus biologiques sont identifiés comme spécifiquement induits (Figure 3.3.3.3A). Et quelle que soit la comparaison, les catégories fonctionnelles apparaissant sur-représentées, que ce soit en induction ou en répression, comportent très peu de gènes (Figure 3.3.3.3A et B). Aucune catégorie ne ressort comme réellement majoritaire mis à part la catégorie

« processus d'oxydoréduction » que l'on retrouve dans toutes les situations (Eau vs ASM et induction vs répression) ce qui rend difficile l'interprétation. Néanmoins, concernant les plantes traitées à l'ASM, la chaleur a tendance à réprimer certaines ontologies liées aux défenses vis-à-vis d'agents phytopathogènes (« réponses aux blessures », « réponse aux stress ») et à induire des gènes liés aux cycles cellulaires (« Assemblage du nucléosome », « Réplication de l'ADN », etc. ; Figure 3.3.3.3B). Pour poursuivre l'analyse avec l'objectif d'identifier des gènes modulés par l'ASM dans la modalité témoin mais qui ne le sont pas - ou moins - dans la modalité chaleur, nous nous sommes directement intéressés au croisement des comparaisons « ASM/Eau - 21°C » et « 35°C/21°C – ASM » (cf ci-dessous).

Catégories fonctionnelles modulées par l'ASM en condition normale, mais au comportement modifié par la chaleur

La Figure 3.3.3.4 compare le nombre de transcrits induits (ou réprimés) par l'ASM dans la modalité témoin au nombre de transcrits réprimés (ou induits) par la chaleur dans des plantes traitées à l'ASM. Les transcrits communs, c'est-à-dire ceux dont l'induction ou la répression par l'ASM semblent réduites par des conditions de chaleur, sont particulièrement intéressants car susceptibles d'expliquer la baisse d'efficacité de l'ASM en conditions stressantes de température. On nommera ceux-ci les transcrits « induits/réprimés par l'ASM affectés par la chaleur ». Globalement, on observe que parmi les transcrits dont l'expression est modulée par la chaleur chez des plantes traitées à l'ASM, plus de 70 % d'entre eux présentent un comportement d'expression inverse en réponse à l'ASM dans les plantes de la modalité témoin :

- 168/231 soit 73 % des transcrits réprimés par la chaleur chez des plantes traitées à l'ASM sont à l'inverse activés par l'ASM à 21 °C.
- 267/337 soit 79 % des transcrits induits par la chaleur chez des plantes traitées à l'ASM sont à l'inverse réprimés par l'ASM à 21°C.

Il est donc intéressant de noter que l'effet principal de la chaleur sur le transcriptome de pommiers traités à l'ASM est d'affecter négativement l'effet de l'ASM sur le transcriptome de pommiers cultivés à 21 °C.

Parmi les transcrits codant des gènes induits par l'ASM affectés par la chaleur, les classes fonctionnelles spécifiquement induites et retenues précédemment comme liées à la résistance aux agents pathogènes, on peut remarquer que :

dans les deux catégories « réponse de défense » et « réponse à un stimuli biotique », il s'agit du même homologue de MLP 423,

- dans la catégorie de « réponse aux blessures », tous les inhibiteurs de protéase à sérine sont concernés,
- dans la catégorie de « réponse au stress », les 2 gènes concernés correspondent à 2 déhydrines,

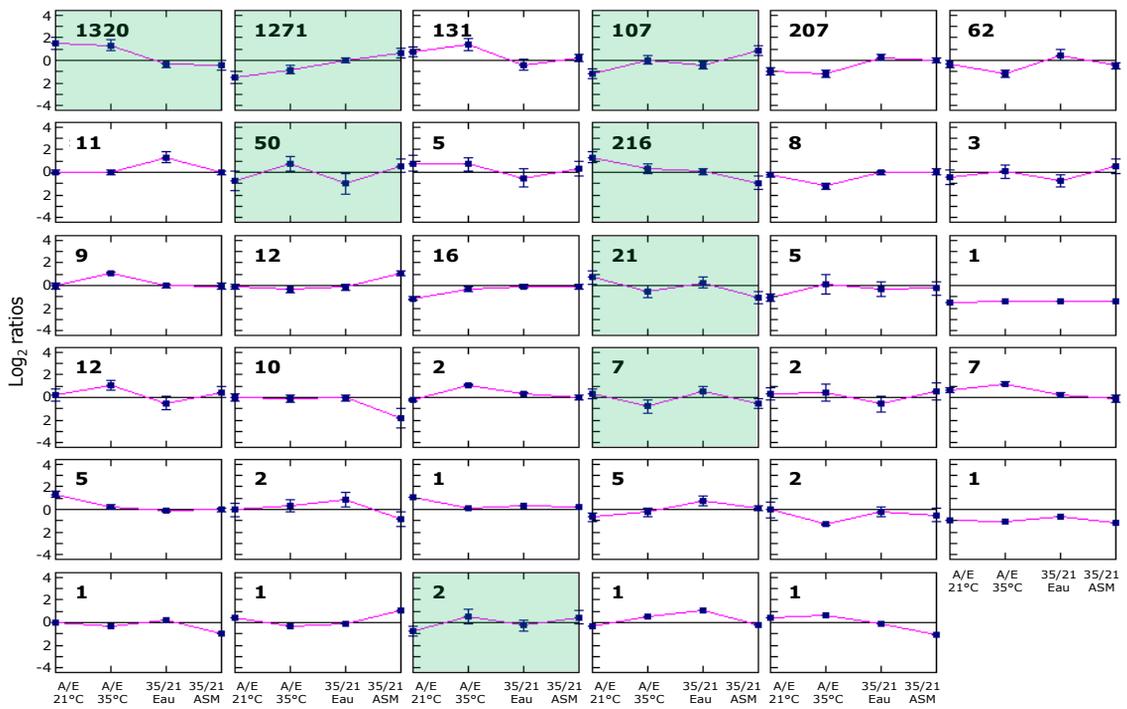


Figure 3.3.4.1 : Partitionnement CAST des gènes différentiellement exprimés dans au moins une des 4 comparaisons : « ASM/Eau - 21°C » (A/E 21°C), « ASM/Eau - 35°C » (A/E 35°C), « 35°C/21°C - Eau » (35/21 Eau) et « 35°C/21°C - ASM » (35/21 ASM). Seuil d'affinité de 0,95 permettant de créer 35 patterns différents d'expression de gènes. Centroides (et écart-types) des ratios d'expression avec le nombre de gènes concernés indiqué au coin supérieur gauche de chaque pattern. En vert, patterns corrélés avec la perte d'efficacité de l'ASM par la chaleur.

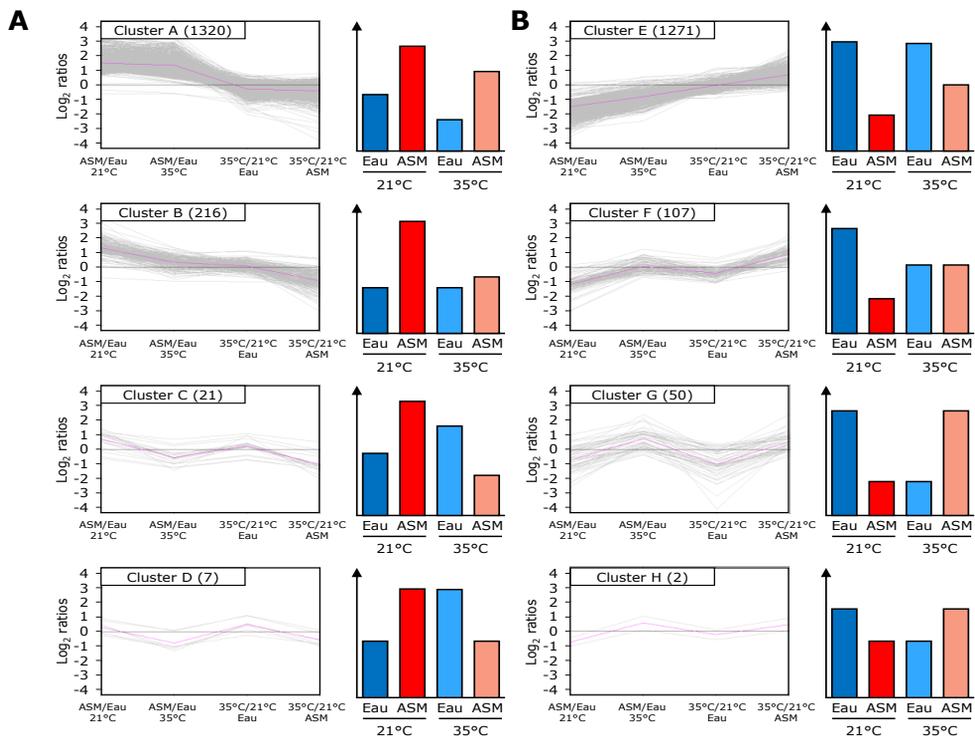


Figure 3.3.4.2 : Patterns CAST et modèles d'expression des gènes corrélés avec la perte d'efficacité de l'ASM par la chaleur susceptible de receler des facteurs de résistance (A) ou de sensibilité (B) respectivement réprimés ou induits par la chaleur. Gènes différentiellement exprimés dans au moins une des 4 comparaisons : « ASM/Eau - 21°C », « ASM/Eau - 35°C », « 35°C/21°C - Eau » et « 35°C/21°C - ASM ». Seuil d'affinité CAST de 0,95. Pour chaque pattern : code attribué au cluster et nombre de gènes correspondants indiqués au coin supérieur gauche ; ligne rose : profil d'expression type passant par les centroides ; histogrammes : modèle d'expression attendu en RT-qPCR proposé à droite.

- dans la catégorie « réponse aux stress oxydant », il s'agit de 3 peroxydases.

Ces processus biologiques ne représentent cependant qu'une infime partie des gènes sur les 168 transcrits repérés comme induits par l'ASM et affectés par la chaleur. D'autres catégories fonctionnelles apparaissent comme sur-représentées, telles que 4 déhydrines liées à la réponse à l'eau ainsi qu'une hydrolase et 2 phosphates synthases liées à la synthèse du tréhalose.

Pour un comportement d'expression inverse (répression par l'ASM affectée par la chaleur), toutes les catégories fonctionnelles liées au cycle cellulaire voient des gènes activés par la chaleur (Figure 3.3.3.4). Il est même étonnant de noter que la quasi-totalité des gènes appartenant à ces catégories et qui sont induits par la chaleur chez des plantes traitées à l'ASM sont réprimés par l'ASM à 21 °C.

Ainsi, pour des plantes traitées à l'ASM, on remarque que la modalité chaleur a tendance à abaisser le niveau d'expression de gènes impliqués dans les défenses contre les phytopathogènes et à augmenter le niveau d'expression de gènes liés au cycle cellulaire alors que l'ASM provoque l'effet inverse chez des plantes cultivées en modalité témoin. La chaleur semble ainsi agir sur la balance défense/croissance modulée par l'ASM chez le pommier. Ce phénomène, corrélé avec la perte de résistance vis-à-vis d'*E. amylovora* observée, suggère que la chaleur a un rôle important non seulement sur la perte d'efficacité des défenses déclenchées par l'ASM mais également sur l'établissement d'un état physiologique de la plante favorable au développement de la bactérie.

3.3.4 Partitionnement des données par la méthode CAST

L'étape suivante a consisté à affiner le clustering des transcrits différentiellement exprimés dans au moins une des 4 comparaisons effectuées en Figure 3.3.1.2 afin d'obtenir un nombre de clusters « raisonnable » regroupant des transcrits au comportement similaire. La méthode de partitionnement CAST (Technique de recherche par affinité de partitionnement pour « Clustering Affinity Search Technique ») a été privilégiée pour notre jeu de données. D'une part, cette méthode ne nécessite pas de définir un nombre de partitionnement optimal (contrairement à d'autres méthodes) puisqu'elle classe un à un chaque transcrit dans un groupe selon la distance qui le sépare des autres. D'autre part, un seuil d'affinité peut être choisi, que l'on peut considérer comme l'inverse de la distance métrique nécessaire pour associer deux transcrits à un même cluster. Les transcrits en dessous ou égal à ce seuil sont donc assignés à un même cluster et dès qu'ils dépassent ce seuil, ils sont ajoutés à un nouveau groupe.

En prenant un seuil d'affinité de 0,95, 35 profils différents sont obtenus pour les 3517 transcrits différentiellement exprimés dans au moins une des comparaisons (Figure 3.3.4.1).

Tableau 3.3.4 : Potentiels marqueurs de résistance et de sensibilité du pommier vis-à-vis d'*E. amylovora*, modulés par l'ASM et et moins modulés par ce même SDP si une journée à 35°C fait suite au traitement. Leur nom codifié, leur fonction, le cluster auquel ils appartiennent (A, B, C, E et F) et leur ratio dans les 4 comparaisons (« ASM/Eau - 21°C », « ASM/Eau - 35°C », « 35°C/21°C - Eau » et « 35°C/21°C - ASM ») sont indiqués. Les potentiels marqueurs de résistance sont ceux qui ont un ratio $\log_2 \geq 1$ dans la comparaison « ASM/Eau - 21°C » et un ratio $\log_2 \leq -1$ dans la comparaison « 35°C/21°C - ASM ». Les potentiels marqueurs de sensibilité sont ceux qui ont un ratio $\log_2 \leq 1$ dans la comparaison « ASM/Eau - 21°C » et un ratio $\log_2 \geq -1$ dans la comparaison « 35°C/21°C - ASM ».

Cluster	Code	Fonction	Gène	Log ₂ ratios				
				ASM/Eau 21°C	ASM/Eau 35°C	35°C/21°C Eau	35°C/21°C ASM	
A	MdBIS2	Biphenyl synthase	MD04G1111500	2,50	1,33	0,00	-1,17	
			MD14G1160800	3,07	2,00	-0,10	-1,50	
			MD15G1131700	3,26	1,97	-0,37	-1,69	
			MD15G1132000	2,67	1,29	-0,22	-1,60	
			MD15G1132100	3,31	1,87	-0,45	-1,65	
			MD15G1132300	2,98	2,01	-0,71	-1,50	
	MdBXL1	Beta-xylosidase 1	MD13G1157400	2,49	1,65	-2,02	-3,00	
			MD16G1158300	1,96	1,56	-1,84	-2,64	
	MdGST7	Glutathione S-tranferase 7	MD05G1184300	2,75	2,29	-0,50	-1,20	
			MD14G1232200	2,66	2,85	-1,75	-1,07	
	MdLKR/SDH	Lysine-cetoglutarate reductase/saccharopine deshydrogenase	MD02G1105000	1,28	0,75	-0,42	-1,02	
			MD02G1105300	1,25	0,66	-0,41	-1,07	
	MdExCaNa	sodium/calcium exchanger family protein	MD10G1284700	2,18	1,18	-0,37	-1,03	
			MD10G1284800	2,11	1,50	-0,38	-1,07	
MD13G1122100			3,36	2,68	-0,35	-1,07		
MdWRKY75	WRKY75 transcriptional factor	MD16G1122400	2,66	1,82	-0,86	-1,00		
		MD13G1208400	3,18	1,74	-0,01	-1,87		
A	MdPR-6	Serine protease inhibitor (PR-6)	MD13G1208500	3,29	2,25	-0,12	-1,48	
MD13G1208700			4,39	2,57	-0,86	-2,57		
MD13G1208300			2,20	0,29	-0,10	-1,63		
B			MD16G1210300	3,37	1,33	0,15	-2,36	
A	MdTPS4	Terpene synthase 4	MD17G1080500	2,55	1,44	-0,36	-1,06	
B			MD17G1080700	1,82	0,73	-0,11	-1,02	
A	MdTRX	Thioredoxin superfamily protein	MD05G1336400	1,14	0,44	-0,52	-1,22	
B			MD10G1311900	1,22	0,48	-0,36	-1,26	
C			MD13G1172100	2,04	0,35	-0,34	-1,85	
			MD03G1278100	1,10	-0,60	0,32	-1,17	
B	MdARA	Arabinose kinase	MD08G1124400	1,45	0,55	-0,01	-1,15	
			MD08G1196300	1,91	0,75	-0,18	-1,31	
	MdAHL	Protéine préde de la famille des liaisons AT-hook à l'ADN	MD15G1384100	1,51	0,57	-0,15	-1,03	
			MD02G1079200	1,69	0,05	0,05	-1,91	
	MdBGA12	Beta-galactosidase 12	MD15G1206800	1,97	0,35	-0,28	-2,02	
			MD10G1121200	2,32	-0,54	0,69	-2,64	
	MdCDNAJ	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	MD17G1224600	1,40	-0,01	0,40	-1,33	
			MD04G1142300	1,68	1,11	0,16	-1,11	
		MdLAC7	Laccase 7	MD16G1147100	2,19	0,84	-0,20	-1,23
				MD09G1199000	2,01	0,22	-0,51	-2,01
		MdCrypt	Cryptine	MD03G1242400	1,32	-0,60	-0,49	-2,12
	MdGAL	Lectine	MD11G1262100	1,55	0,47	-0,32	-1,32	
	MdG76E2	UDP-glucosyltransferase 76E2	MD03G1082200	2,11	1,17	0,34	-1,00	
C	MdGibOx1	Gibberelline 2-oxidase 1	MD10G1194100	1,09	-0,31	0,42	-1,09	
E	MdAP2B3	AP2/B3-like transcriptional factor	MD03G1047900	-2,13	-0,44	-0,53	1,21	
			MD01G1224300	-2,69	-0,91	0,27	1,97	
	MdATXR6	Trithorax-related protein 6	MD05G1060000	-2,25	-1,07	0,04	1,37	
	MdBRC1	breast cancer susceptibility1	MD01G1008700	-1,92	-0,77	-0,19	1,25	
	MdBRC2	BRCA2-like B	MD03G1072700	-2,25	-0,62	-0,15	1,43	
	MdCDC6	Control of cell division 6	MD11G1078800	-2,22	-0,98	-0,06	1,65	
			MD02G1149400	-2,05	-0,95	-0,05	1,32	
	MdDDM1	chromatin remodeling 1	MD15G1264100	-1,85	-0,84	-0,02	1,32	
			MD03G1011100	-2,09	-1,12	-0,22	1,19	
	MdCMT3	Chromomethylase 3	MD11G1012800	-1,97	-1,02	0,01	1,16	
			MD06G1181700	-2,43	-0,93	-0,28	1,42	
	MdDEL1	DP-E2F-like 1 (DEL1)	MD08G1034400	-2,23	-0,64	0,16	1,62	
			MD08G1034500	-2,19	-0,88	-0,11	1,47	
			MD15G1031300	-2,42	-0,78	0,11	1,70	
	MdH2A.W7	Histone H2A7	MD04G1201800	-1,19	-0,24	0,16	1,72	
			MD12G1215400	-2,91	-0,90	0,03	2,36	
	MdHop2	Hop2 Homolog	MD16G1044800	-1,82	-0,83	0,11	1,07	
			MD08G1064300	-3,15	-1,53	-0,45	1,86	
	MdIQ6	IQ-6 domain	MD15G1057400	-2,94	-1,35	-0,38	1,69	
			MD03G1189700	-2,52	-1,82	-0,17	1,12	
		MdKin	Kinesin motor family protein	MD11G1206000	-2,57	-1,59	-0,18	1,01
		MdENODL17	early nodulin-like protein 17	MD17G1223900	-2,19	-1,28	-0,21	1,21
		MdNPK1	NPK1-related protein kinase 3	MD13G1186500	-2,14	-1,08	-0,24	1,04
	MdRING1	Breast cancer associated RING 1	MD05G1192200	-2,48	-1,05	-0,15	1,55	
			MD10G1178800	-2,24	-1,01	-0,13	1,40	
	MdRPA70	RPA70-kDa subunit B	MD06G1225500	-2,63	-1,03	-0,05	1,38	
			MD14G1212400	-3,16	-1,14	-0,19	2,00	
	MdStMC2	structural maintenance of chromosomes 2	MD01G1182300	-2,20	-1,07	-0,17	1,27	
			MD07G1252800	-2,10	-1,08	-0,15	1,09	
	MdSubt1.3	Subtilase 1.3	MD01G1189600	-1,90	-0,37	-0,37	1,08	
			MD01G1190400	-2,05	-1,07	-0,23	1,04	
	MdThyk	Thymidine kinase	MD09G1121200	-3,05	-1,18	-0,16	1,82	
			MD17G1112200	-2,77	-1,04	-0,26	1,82	
MdWEE1	kinase WEE1 homolog	MD03G1283400	-1,38	-0,78	-0,47	1,31		
		MD11G1302700	-1,58	-0,59	0,09	1,02		
		MD11G1303200	-2,47	-0,64	-0,30	1,40		
E	MdPAT9	Patatine 9 homolog	MD11G1284700	-1,80	-0,35	-0,45	1,04	
F			MD03G1264100	-1,73	-0,29	-0,63	1,13	
F	MdANT	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	MD08G1077100	-1,74	0,21	-0,70	1,48	
			MD13G1023500	-1,52	-0,14	-0,50	1,30	
	MdCLV3	CLAVATA3/ESR-RELATED 16	MD03G1114600	-1,48	-0,01	-0,29	1,13	
			MD03G1114700	-1,54	0,32	-0,32	1,34	
	MdFLA12	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 12	MD11G1133200	-1,60	0,17	-0,22	1,25	
MdMYB66	MYB66 domain	MD15G1050300	-1,14	-0,47	-0,51	1,38		
		MD16G1093200	-1,62	0,85	-0,61	2,20		

Nous nous sommes particulièrement intéressés à 8 clusters regroupant 85% des transcrits (soit 2994 transcrits) et dont les profils pourraient expliquer la perte d'efficacité de l'ASM contre *E. amylovora* à la chaleur (Figure 3.3.4.2) : i) induction par l'ASM plus forte dans la modalité à 21°C que dans la modalité chaleur, associée à une répression provoquée par la chaleur dans des plantes traitées à l'ASM et ii) répression par l'ASM observée à 21°C et levée - tout au moins en partie - dans la modalité chaleur, associée à une surexpression dans la modalité chaleur, dans les plantes traitées à l'ASM. Deux types de cluster se distinguent et regroupent :

- 4 clusters formés d'un total de 1564 gènes induits plus fortement par l'ASM dans la modalité témoin que dans la modalité chaleur (Figure 3.3.4.2A). Ces clusters renferment probablement des facteurs de résistance à la maladie. Le cluster A (1320 gènes) contient des gènes réprimés par la chaleur quel que soit le traitement (comparaisons « 35°C/21°C - Eau » et « 35°C/21°C - ASM »). Le cluster B (216 gènes) regroupe des gènes dont l'expression est réprimée par la chaleur uniquement si les plantes ont été traitées à l'ASM (« 35°C/21°C - ASM »). Dans les clusters C (21 gènes) et D (7 gènes), la chaleur a pour effet d'induire l'expression des gènes dans les plantes traitées à l'eau alors qu'elle les réprime dans les plantes traitées à l'ASM.
- 4 autres clusters regroupent un total de 1430 gènes tous réprimés par l'ASM à 21°C mais moins réprimés, voire induits si les plantes ont préalablement subi un passage à 35°C (Figure 3.3.4.2B). Ces clusters contiennent probablement des facteurs de sensibilité à la maladie. La particularité du cluster E (1271 gènes) est qu'il est formé de gènes dont l'expression n'est pas modifiée par la température dans les plantes traitées à l'eau. Par contre, les clusters F (107 gènes), G (50 gènes) et H (2 gènes) regroupent tous des gènes dont l'expression est réprimée par la chaleur dans les plantes traitées à l'eau.

Ces clusters sont constitués des gènes différentiellement exprimés dans au moins une des 4 comparaisons. Pour espérer identifier les facteurs de sensibilité ou de résistance modulés par la chaleur, seuls les gènes significativement ($p \leq 0,05$) sur-exprimés ($\log_2 \geq 1$) ou sous-exprimés ($\log_2 \leq -1$) à la fois dans les deux comparaisons « ASM/Eau - 21°C » et « 35°C/21°C - ASM » ont été conservés :

- Pour les clusters A, B, C et D contenant les facteurs de résistance potentiels, cette analyse retient respectivement 82/1320, 81/216, 5/21 et 0/7, soit un total de 168 transcrits.
- Pour les clusters E, F, G et H contenant les facteurs de sensibilité potentiels, l'analyse retient respectivement 240/1271, 25/107, 2/50 et 0/2, soit un total de 267 transcrits.

Ces transcrits correspondent à ceux identifiés dans la section précédente comme étant modulés par l'ASM et affectés par la chaleur. Il est logique de parvenir au même résultat puisque les critères de sélection des transcrits sont identiques entre les deux approches, bien que les méthodes diffèrent.

Le Tableau 3.3.4 regroupe une sélection de ces gènes (18 marqueurs des clusters A, B, C et 26 marqueurs des clusters E et F), choisis en fonction de leur annotation et de leur ontologie

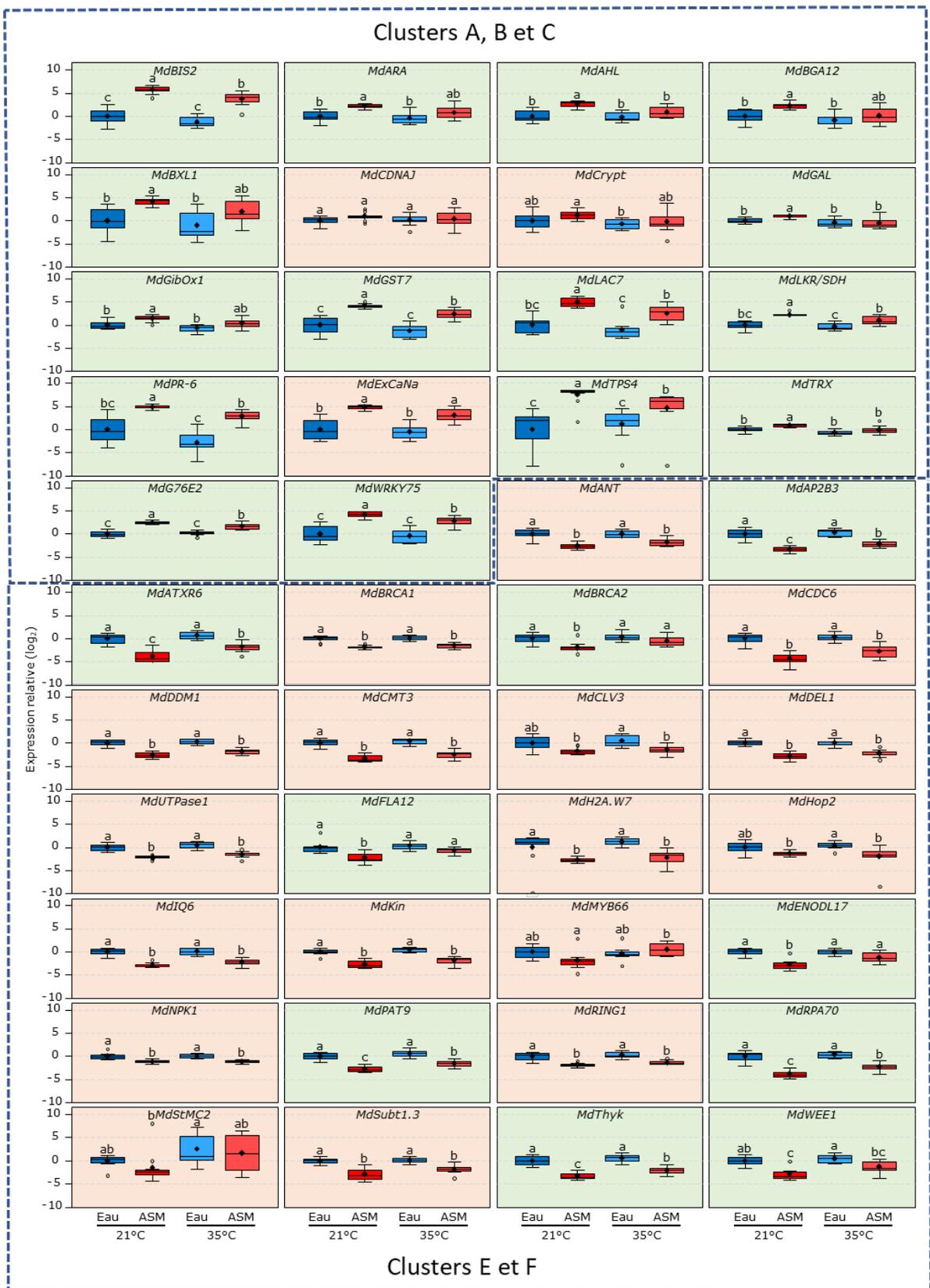


Figure 3.3.5 : Niveau d'expression des gènes sélectionnés dans les clusters A, B, C d'une part et E, F d'autre part, dans GDDH13 prétraité 3 jours avant à l'ASM ou à l'eau, et exposé à la modalité témoin ou à la modalité chaleur. Box-plots avec moyennes, médianes, et valeurs aberrantes représentés respectivement par des losanges, des lignes, et des cercles vides. Données d'expression issues de 2 expériences indépendantes comportant chacune 5 répétitions biologiques par modalité de prélèvement et de traitement ($n = 10$). Chaque répétition biologique est constituée d'un pool de 4 jeunes feuilles issues de 4 plantes traitées à l'eau et exposées à la modalité témoin. Les lettres désignent les différences statistiques établies par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test « post-hoc » de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni ($\alpha = 0,05$). Fonds verts, profils d'expression potentiellement corrélés à une perte d'efficacité de l'ASM à la chaleur ; fonds orange sinon.

GO, et ciblant particulièrement les catégories fonctionnelles mises en évidence précédemment, c'est-à-dire liées aux réponses de défense vis-à-vis des agents phytopathogènes d'une part et au cycle cellulaire/croissance/développement d'autre part.

3.3.5 Validation des marqueurs issus de l'analyse transcriptomique

L'expression des gènes marqueurs précédemment sélectionnés comme associés à la perte d'efficacité de l'ASM à cause de la chaleur, a été vérifiée par RT-qPCR dans des répétitions d'expériences identiques (et indépendantes) à celles utilisées pour l'analyse transcriptomique. Certains couples d'amorces qPCR mis au point ciblent parfois plusieurs gènes d'une même fonction moléculaire, leur séquence étant peu polymorphe. Ainsi par exemple, les amorces du marqueur nommé « *MdBIS2* » amplifient en réalité 6 gènes de biphényl synthèses du pommier (Tableau 3.3.4).

Les résultats montrent que l'expression des gènes a globalement le profil attendu mais l'analyse statistique ne révèle pas toujours des différences significatives là où elles étaient espérées (en fond rougeâtre sur la Figure 3.3.5). C'est le cas :

- de 3 marqueurs (*MdCDNAJ*, *MdCrypt* et *MdExCaNa*) appartenant aux clusters A, B et C, pour lesquels nous attendions le comportement suivant : (i) significativement induits par l'ASM à 21°C et (ii) non différentiels entre l'ASM et l'eau à 35°C ou significativement induits à l'ASM à 35°C mais à des niveaux inférieurs que l'ASM à 21°C.
- de 17 marqueurs (*MdANT*, *MdBRCA1*, *MdCDC6*, *MdDDM1*, *MdCMT3*, *MdCLV3*, *MdDEL1*, *MdUTPase1*, *MdH2A.W7*, *MdHop2*, *MdIQ6*, *MdKin*, *MdMYB66*, *MdNPK1*, *MdRING1*, *MdStMC2* et *MdSubt1.3*) appartenant aux clusters E et F, pour lesquels nous attendions le comportement suivant : (i) significativement réprimés par l'ASM à 21°C et (ii) non différentiels entre l'ASM et l'eau à 35°C ou significativement réprimés à l'ASM à 35°C mais à des niveaux supérieurs que l'ASM à 21°C.

Pour les autres gènes, on distingue finalement 6 profils d'expression qPCR, résumés dans le Tableau 3.3.5 :

- **Profil U** : induction significative par l'ASM par rapport à l'eau à 21°C et réduite par la chaleur pour atteindre un niveau intermédiaire, significativement différent à la fois de celui des plantes traitées à l'ASM à 21°C et de celui des plantes traitées à l'eau à 21°C (*MdBIS2*, *MdGST7*, *MdWRKY75*, *MdTPS4* et *MdG76E2*).
- **Profil V** : induction significative par l'ASM par rapport à l'eau à 21°C et réduite par la chaleur pour atteindre un niveau intermédiaire, significativement différent de celui des

Tableau 3.3.5 : Profils RT-qPCR attribués aux potentiels marqueurs de résistance et de sensibilité du pommier vis-à-vis d'*E. amylovora* et correspondance avec les clusters identifiés par l'analyse microarray. * : modulation d'expression du gène statistiquement significative pour la comparaison considérée ; ns : modulation d'expression du gène non significative pour la comparaison considérée. Les tests statistiques appliqués sont ceux décrits dans la figure 3.3.5.

Gènes	ASM 21°C	Significativité	ASM 35°C	Significativité	ASM 35°C	Significativité	Profil qPCR	Cluster
	Eau 21°C		ASM 21°C		Eau 21°C			
<i>MdBIS2</i>	induction	*	répression	*	induction	*	U	A
<i>MdGST7</i>	induction	*	répression	*	induction	*		A
<i>MdWRKY75</i>	induction	*	répression	*	induction	*		A
<i>MdTPS4</i>	induction	*	répression	*	induction	*		AB
<i>MdG76E2</i>	induction	*	répression	*	induction	*		B
<i>MdLKR/SDH</i>	induction	*	répression	*	induction	ns	V	A
<i>MdLAC7</i>	induction	*	répression	*	induction	ns		B
<i>MdTRX</i>	induction	*	répression	*	non modulation	ns		ABC
<i>MdAHL</i>	induction	*	répression	*	non modulation	ns		B
<i>MdGAL</i>	induction	*	répression	*	non modulation	ns		B
<i>MdBXL1</i>	induction	*	répression	ns	induction	ns	W	A
<i>MdPR-6</i>	induction	*	répression	ns	induction	ns		AB
<i>MdARA</i>	induction	*	répression	ns	induction	ns		B
<i>MdBGA12</i>	induction	*	répression	ns	induction	ns		B
<i>MdGibOx1</i>	induction	*	répression	ns	induction	ns		C
<i>MdAP2B3</i>	répression	*	induction	*	répression	*	X	E
<i>MdATXR6</i>	répression	*	induction	*	répression	*		E
<i>MdRPA70</i>	répression	*	induction	*	répression	*		E
<i>MdThyk</i>	répression	*	induction	*	répression	*		E
<i>MdPAT9</i>	répression	*	induction	*	répression	*		EF
<i>MdBRCA2</i>	répression	*	induction	*	non modulation	ns	Y	E
<i>MdENODL17</i>	répression	*	induction	*	non modulation	ns		E
<i>MdFLA12</i>	répression	*	induction	*	non modulation	ns		F
<i>MdWEE1</i>	répression	*	induction	ns	répression	ns	Z	E

induction répression non modulation

plantes traitées à l'ASM à 21°C mais non significativement différent de celui des plantes traitées à l'eau à 21°C (*MdLKR/SDH*, *MdLAC7*, *MdTRX*, *MdAHL* et *MdGAL*).

- Profil W : induction significative par l'ASM par rapport à l'eau à 21°C et réduite par la chaleur pour atteindre un niveau intermédiaire, non significativement différent à la fois de celui des plantes traitées à l'ASM à 21°C et de celui des plantes traitées à l'eau à 21°C (*MdBXL1*, *MdPR-6*, *MdARA*, *MdBGA12* et *MdGibOx1*).
- Profil X : répression significative par l'ASM par rapport à l'eau à 21°C et réduite par la chaleur pour atteindre un niveau intermédiaire, significativement différent à la fois de celui des plantes traitées à l'ASM à 21°C et de celui des plantes traitées à l'eau à 21°C (*MdAPB3*, *MdATXR6*, *MdRPA70*, *MdThyk* et *MdPAT9*).
- Profil Y : répression significative par l'ASM par rapport à l'eau à 21°C et réduite par la chaleur pour atteindre un niveau intermédiaire, significativement différent de celui des plantes traitées à l'ASM à 21°C mais non significativement différent de celui des plantes traitées à l'eau à 21°C (*MdBRCA2*, *MdENODL17* et *MdFLA12*).
- Profil Z : répression significative par l'ASM par rapport à l'eau à 21°C et réduite par la chaleur pour atteindre un niveau intermédiaire, non significativement différent à la fois de celui des plantes traitées à l'ASM à 21°C et de celui des plantes traitées à l'eau à 21°C (*MdWEE1*).

Si on compare ces profils aux modèles d'expression proposés pour les différents clusters précédemment mis en évidence et concernés par les gènes testés, on remarque qu'aucune modulation de l'expression de ces gènes par la chaleur n'est observée dans les plantes traitées à l'eau par qPCR alors que plusieurs clusters allaient dans ce sens (clusters A, B, F). Il n'y a donc pas de correspondance fine entre l'appartenance aux « clusters CAST » et l'appartenance aux « clusters qPCR ». Mais la distinction majeure qui différencie les clusters A, B, C d'une part et les clusters E et F d'autre part (induction vs répression par l'ASM à 21°C) est bien retrouvée entre les profils U, V, W d'une part et X, Y, Z d'autre part.

Les marqueurs identifiés se différencient également par l'amplitude de leur niveau d'expression, notamment pour les plantes traitées à l'ASM et placées à 21°C. Certains gènes présentent une forte amplitude d'expression atteignant parfois des $\log_2 \geq 5$ (*MdBIS2*, *MdBXL1*, *MdGST7*, *MdLAC7*, *MdPR-6*, *MdTPS4* et *MdWRKY75*) ou ≤ -5 (*MdATRX6* et *MdRPA70*).

En résumé, l'analyse microarray a permis d'identifier 15 marqueurs de résistance et 9 marqueurs de sensibilité au feu bactérien, dont l'expression est modulée par l'ASM et la chaleur et est validée ensuite par RT-qPCR. De tels gènes, en particulier ceux ayant montré de fortes modulations d'expression par l'ASM, devraient s'avérer des marqueurs particulièrement robustes pour des analyses ultérieures, que ce soit des criblages de nouveaux SDP ou des études sur la perte d'efficacité des SDP due à la chaleur.

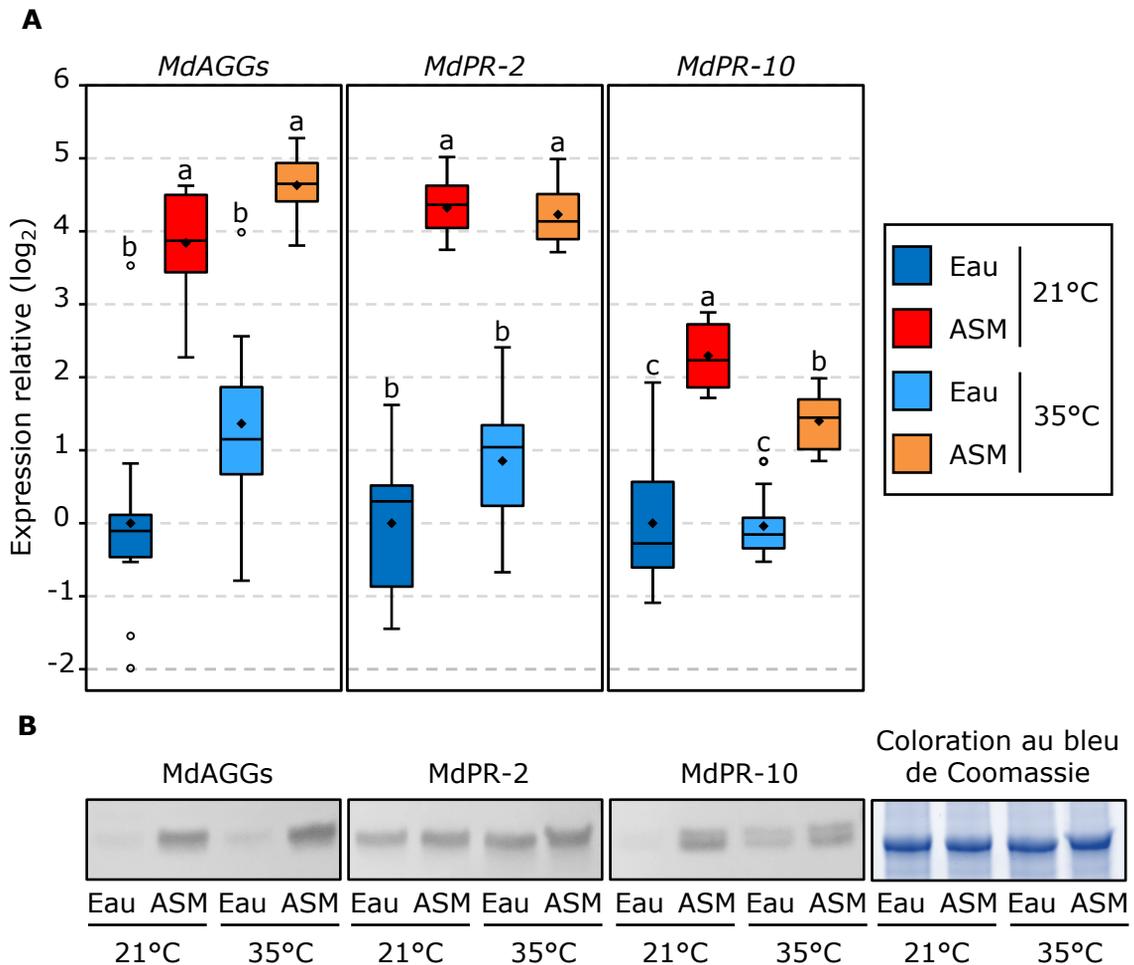


Figure 3.4.1 : Accumulation transcriptionnelle (A) et protéique (B) de MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10 dans GDDH13 pré-traité 3 jours avant à l'ASM ou à l'eau, et exposé à la modalité témoin ou à la modalité chaleur. (A) Box-plots avec moyennes, médianes, et valeurs aberrantes représentés respectivement par des losanges, des lignes, et des cercles vides. Données d'expression issues de 2 expériences indépendantes comportant chacune 5 répétitions biologiques par modalité de prélèvement et de traitement ($n=10$). Chaque répétition biologique est constituée d'un pool de 4 jeunes feuilles issues de plantes différentes. Les niveaux d'expression de chaque gène ont été rapportés à la moyenne de ceux issus de plantes traitées à l'eau et exposées à la modalité témoin. Pour chaque gène, les différences statistiques globales sont établies par un test de Krukall-Wallis (*MdAGGs* : $p = 1,493e-06$; *MdPR-2* : $p = 1,334e-06$; *MdPR-10* : $p = 2,788e-06$) et les lettres désignent les différences statistiques établies par un test « post-hoc » de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni ($\alpha = 0,05$) (B) Immunodétection des protéines. Chaque échantillon est constitué d'un pool d'extraits protéiques d'une expérience (comportant 5 répliquats biologiques) issus des mêmes tissus que ceux utilisés pour l'analyse transcriptionnelle. 10 μ g de protéines totales/puits. Résultats représentatifs de 2 répétitions biologiques indépendantes.

3.4 Analyse ciblée de quelques marqueurs chez le pommier en réponse à l'ASM et/ou la chaleur

3.4.1 Comportement transcriptionnel et protéique de MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10

La puce à ADN utilisée ne comporte pas de sondes permettant d'hybrider les transcrits des gènes *MdAGGs*, absents de l'annotation fonctionnelle initiale du pommier GDDH13 utilisé dans cette partie. Les agglutinines ayant été précédemment identifiées comme marqueurs de la résistance contre le feu bactérien (voir chapitre 2), la modulation de leur expression et de leur accumulation par l'ASM dans des plants greffés ayant subi ou non une modalité chaleur (identique à celle décrite pour l'analyse transcriptomique) a été étudiée et comparée à celle de MdPR-2 et MdPR-10 (Figure 3.4.1).

Au niveau transcriptionnel, les gènes *MdAGGs* sont significativement induits par l'ASM en comparaison au traitement eau, mais à des niveaux équivalents entre les deux modalités de température. Ce résultat est confirmé par l'accumulation de protéines observée par western blot. Le même comportement transcriptionnel est observé pour le gène *MdPR-2*, mais en revanche la détection des protéines ne permet pas de montrer l'effet traitement. Contrairement aux deux autres marqueurs, le gène *MdPR-10* est significativement induit par l'ASM par rapport à l'eau dans chacune des modalités de température mais à un niveau significativement plus faible pour la modalité chaleur. Ce résultat semble se confirmer par l'analyse protéique bien que la différence observée pour le traitement ASM entre les modalités témoin et chaleur ne soit que faiblement perceptible. Ainsi, bien que non repéré par l'analyse transcriptomique, MdPR-10 semble également correspondre à un marqueur de résistance induit par l'ASM mais réprimé par la chaleur.

3.4.2 Comportement des marqueurs pré-sélectionnés dans différentes situations d'application d'un stress chaleur

Le gène *MdPR-10* et ceux identifiés par l'analyse transcriptomique puis validés par qPCR, semblent pouvoir servir d'indicateurs de l'effet négatif de la chaleur sur la protection apportée

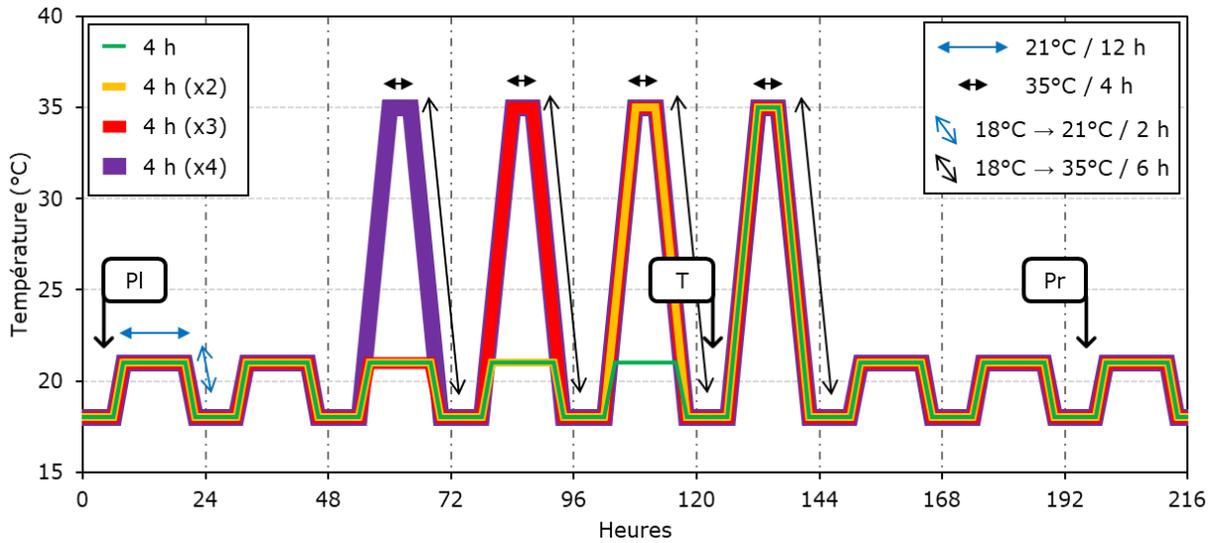


Figure 3.4.2.1 : Régimes thermiques appliqués à GDDH13 pendant 9 jours pour évaluer l'effet du cumul de chaleur sur l'efficacité de l'ASM. Les plantes, préalablement cultivées en serre, sont placées en armoires climatiques à T0. Le régime de base est de 21°C jour/18°C nuit, avec montée et descente progressive de température. Selon les armoires, les plantes sont exposées à 1 à 4 jours de chaleur « naturelle » consécutifs (montée de température progressive jusqu'à un plateau de 4h à 35°C puis baisse progressive). Traitements à l'ASM ou à l'eau le jour 6 (T) et prélèvements le jour 9 (Pr).

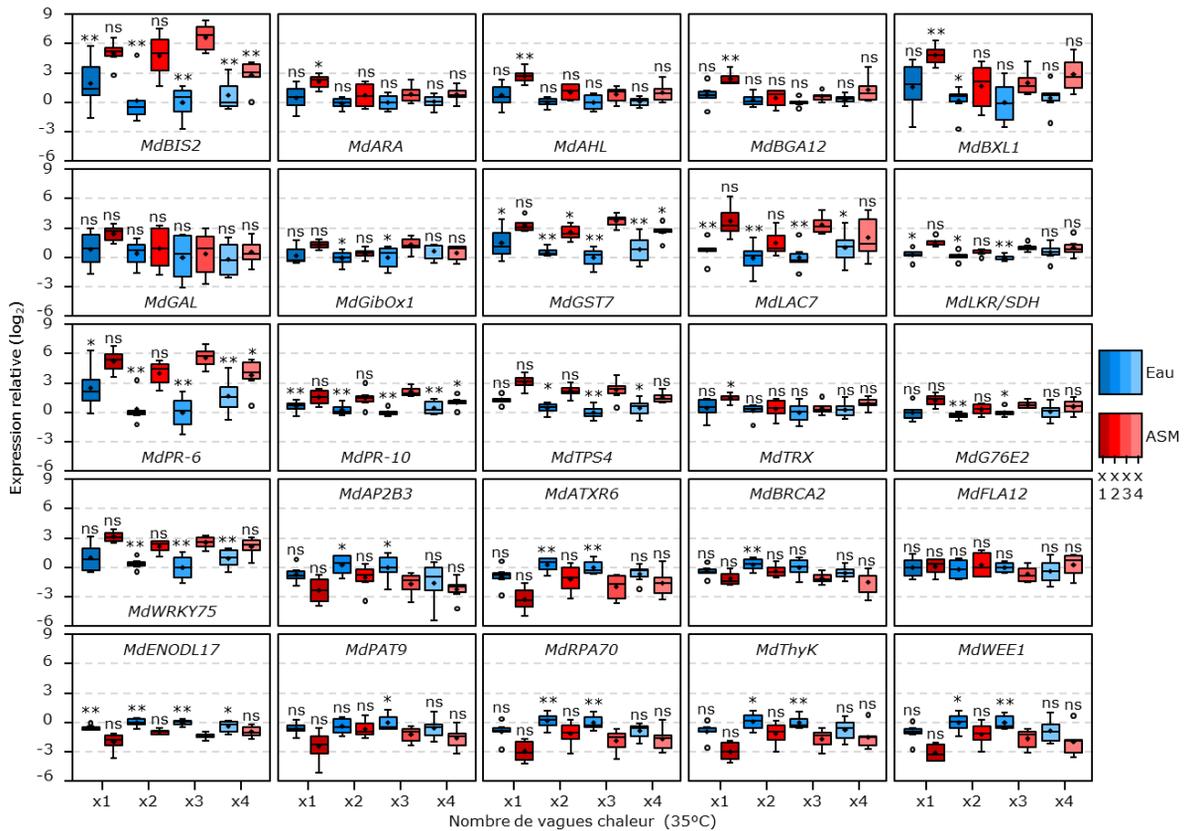


Figure 3.4.2.2 : Niveau d'expression des marqueurs dans GDDH13 pré-traité à l'ASM ou à l'eau et exposé à 1, 2, 3 ou 4 jours consécutifs de chaleur. Régimes thermiques et successions des interventions décrits dans la Figure 3.4.2.1. Boxplots avec moyennes, médianes et valeurs aberrantes indiqués respectivement par des losanges, des lignes et des cercles vides. Données issues de 2 expériences indépendantes avec chacune 3 répétitions biologiques par modalité de prélèvement et de traitement (n=6) et rapportées à la moyenne de celles des témoins eau exposés à l'enchaînement 4 h (x3). Répétition biologique = pool de 3 jeunes feuilles issues de plantes différentes. Pour chaque gène : différences statistiques entre la modalité traitée à l'ASM et exposées à l'enchaînement 4 h (x3) et chaque autre modalité obtenues par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; ns : non-significatif).

par l'ASM vis-à-vis d'*E. amylovora*. Pour affiner l'analyse, plusieurs modalités de stress chaleur ont été appliquées aux plants greffés GDDH13, traités à l'ASM ou à l'eau, puis l'expression de ces marqueurs a été comparée. La Figure 3.4.2.1 décrit les différents protocoles utilisés : 1 à 4 jours successifs de chaleur (chacun avec un pic de 4h à 35°C) ont été appliqués, les traitements eau ou ASM ayant été effectués le matin du dernier jour de chaleur et les plantes remises en condition témoin le lendemain pour un prélèvement des tissus 3 jours après traitement. Pour rappel, la modalité « 3 jours de chaleur » correspond à celle appliquée pour l'analyse microarray, et les modalités « 1 et 3 jours de chaleur » correspondent à certaines modalités appliquées pour les tests de protection, avec une efficacité moindre de l'ASM avec 3 jours consécutifs de chaleur (comparés à 1 jour) (Figure 3.2.3.4).

La Figure 3.4.2.2 montre les résultats d'expression des gènes rapportés à l'expression moyenne obtenue dans les plantes traitées à l'eau et ayant subi la modalité « 3 jours ». Pour chaque gène, chaque niveau d'expression est comparé statistiquement à celui obtenu dans les plantes traitées à l'ASM et exposées à la modalité « 3 jours ». Pour plus de la moitié des marqueurs testés, le nombre de jours de chaleur n'affecte pas leur niveau d'expression dans les plantes traitées à l'ASM (*MdGAL*, *MdGibOx1*, *MdLAC7*, *MdLKR/SDH*, *MdTPS4*, *MdG76E2*, *MdWRKY75*, *MdAP2B3*, *MdATXR6*, *MdBRCA2*, *MdFLA12*, *MdENODL17*, *MdPAT9*, *MdRPA70* et *MdThyK*). Ces gènes ne sont donc pas de bons représentants d'un effet de cumul de chaleur corrélé à une perte d'efficacité progressive de l'ASM (tout au moins quand les prélèvements sont effectués 3 jours après traitement). D'autres gènes (*MdBIS2*, *MdGST7*, *MdPR-6* et *MdPR-10*) voient leur expression diminuée dans la modalité « 4 jours », suggérant une perte d'efficacité de l'ASM potentiellement plus élevée que celle observée dans la modalité « 3 jours ». C'est malheureusement une modalité qui n'a pas été testée précédemment (cf Figure 3.2.3.4). Enfin, seuls 5 gènes marqueurs du stress chaleur semblent corrélés à la perte d'efficacité de l'ASM causée par le cumul de chaleur (*MdARA*, *MdAHL*, *MdBGA12*, *MdBXL1* et *MdTRX*) puisque leur niveau d'expression après traitement ASM est significativement plus élevé pour la modalité « 1 jour » que pour la modalité « 3 jours », les expressions obtenues dans les modalités « 2 et 4 jours » étant similaires à celles obtenues dans la modalité « 3 jours ».

3.5 Discussion

Indépendamment de la chaleur, l'analyse globale effectuée montre que le transcriptome du pommier est fortement reprogrammé par l'ASM, avec une induction de certaines fonctions défensives associées à une répression de certaines fonctions du cycle cellulaire et de la croissance. Ceci est cohérent avec le fait que les plantes doivent optimiser les ressources disponibles, souvent synonyme d'un compromis entre croissance et défense. En effet, l'induction des défenses, coûteuse en énergie, nécessite une relocalisation des ressources allouées à la croissance au profit des mécanismes permettant à la plante de faire face aux bioagresseurs

(Bolton, 2009 ; Huot et al., 2014). Nos résultats concordent aussi avec ceux de Warneys et al. (2018) issus d'une étude microarray réalisée sur des semis de pommiers prétraités à l'ASM. Des mécanismes communs, induits comme réprimés par l'ASM, sont retrouvés dans les deux analyses transcriptomiques comme par exemple des gènes impliqués dans la synthèse de métabolites défensifs, tels que des terpènes synthases et des biphényl synthases, ou codant certaines protéines PR pour les inductions, ou des gènes impliqués dans des fonctions de régulation du cycle et de la division cellulaire pour les répressions.

L'ASM est un analogue du SA qui déclenche les défenses dépendantes de cette phytohormone, et plus généralement la SAR (Oostendorp et al., 2001). Les réponses immunitaires activées par le SA incluent la production des métabolites et de protéines antimicrobiennes ainsi que des modifications de la paroi. En contrepartie, le SA, tout comme l'ASM, réprime de nombreux processus liés à la croissance et au développement (van Butselaar et Van den Ackerveken, 2020), notamment liés à la signalisation, la perception d'autres phytohormones impliquées dans ces processus tels que les auxines (Wang et al., 2007 ; Pasternak et al., 2019) et le GA (Xie et al., 2007 ; Križnik et al., 2017). Ce phénomène est flagrant pour la plupart des mutants accumulant de manière constitutive le SA et présentant un phénotype nain chez *Arabidopsis* (Brodersen et al., 2006 ; Miura et al., 2009 ; Šašek et al., 2014, Chandran et al., 2014). A l'inverse, les acteurs de la croissance peuvent être impliqués dans la répression de l'immunité dépendante du SA (van Butselaar et Van den Ackerveken, 2020), notamment les auxines. Par exemple, les mutants d'*A. thaliana* altérés au niveau du gène *WAT1* codant un transporteur vacuolaire d'auxine présentent des parois secondaires plus fines (Ranocha et al., 2013) mais accumulent davantage de SA, permettant une meilleure protection contre certains agents pathogènes bactériens et fongiques (Denancé et al., 2012 ; Tang et al., 2019). Sachant que Warneys et al. (2018) ont mis en évidence des facteurs de transcription liés à l'auxine et réprimés par l'ASM, il est possible que les auxines aient un rôle important dans la répression de l'immunité innée chez le pommier. Cependant, la relation entre la balance croissance/défense et les auxines s'avère plus complexe chez cette espèce, puisqu'on peut voir des effets contradictoires. En effet, le NAA, analogue d'auxine utilisé comme éclaircisseur en verger, et réprimant des fonctions liées à la croissance et au développement (abscission des fruits, diminution de la photosynthèse, altération du métabolisme des carbohydrates ; Zhu et al., 2011) confère une protection contre le feu bactérien comparable à l'ASM et active quelques gènes de défense de manière similaire à l'ASM (Dugé de Bernonville et al., 2014, ce travail - chapitre 2). Parmi les régulateurs clés de la balance croissance/défenses, *DEL1* fait figure d'exemple chez *A. thaliana*. Ce régulateur promeut la réplication cellulaire et inhibe l'accumulation de SA en ciblant directement un de ses transporteurs, *EDS5*, et des mutants altérés dans l'expression de *DEL1* sont plus résistants à l'oïdium (*Golovinomyces orontii*), contrairement à des mutants sur-exprimant ce gène (Chandran et al., 2014). Chez le pommier, *MdDEL1* pourrait avoir ce même rôle sur la balance croissance/défense puisqu'il est

significativement réprimé par l'ASM dans nos analyses transcriptomiques et transcriptionnelles, aux côtés d'autres gènes liés à la croissance.

Au niveau de la régulation épigénétique, les TE analysés concernent seulement ceux de classe I (rétrotransposon), de par leur nature à exprimer une séquence d'ARN intermédiaire avant d'insérer leur copie dans le génome. De nombreux TE sont à la fois induits et réprimés 3 jours après application d'ASM alors que la chaleur affecte peu leur transcription deux jours après le retour à des conditions normales. Néanmoins, la chaleur a tendance à réduire légèrement le nombre de TE modulés par l'ASM. Cela caractérise un effet transitoire de la chaleur, qui pourrait réduire au silence quelques TE induits par l'ASM et à l'inverse, en activer d'autres qui sont réprimés par ce SDP. Une étude a mesuré chez 10 écotypes d'*A. thaliana* la modulation des TE dès les premières heures d'un stress chaleur (38°C). Il s'est avéré que la chaleur induit davantage de TE qu'elle n'en réprime pour 7 écotypes (56 à 80 % des TE différenciellement exprimés) et l'inverse pour les 3 derniers écotypes testés (63-79 % des TE différenciellement exprimés), montrant que la modulation des TE s'effectue précocement durant le stress et différemment selon le fond génétique (Barah et al., 2013). L'induction transitoire des TE par la chaleur ne nécessite pas une déméthylation de l'ADN chez *A. thaliana*, mais est principalement modulée par des modifications mineures d'histones et une forte décondensation de l'hétérochromatine (Pecinka et al., 2010). Parmi les familles de rétrotransposons induites par la chaleur, les ONSEN (COPIA) font parties des familles majoritairement induites, de par la présence d'un cluster de quatre motifs nGAAn formant un élément thermosensible (Pietzenuk et al., 2016). Durant l'exposition à la chaleur, les TE ONSEN peuvent être induits par la fixation d'un HSF (HSFA2) sur leur élément thermosensible (Pecinka et al., 2010) et s'insèrent préférentiellement dans les zones enrichies en histone H3K27me3 et en variant d'histone H2A.Z (Roquis et al., 2021). Ainsi, il est probable que nos traitements de chaleur impactent la transcription d'ET telles que les ONSEN, mais pendant le stress, et ce par l'action d'HSF.

De nombreux TE sont induits ou réprimés par l'ASM. Mis à part certains TE (par exemple, ONSEN), la majorité est régulée par des méthylations de l'ADN, dirigées en partie par DDM1 chez *A. thaliana*. DDM1 est capable de modifier l'accessibilité à l'ADN de manière ATP-dépendante en remodelant la composition et le placement des nucléosomes. Les mutants altérés au niveau du gène *DDM1* présentent des hypométhylations ce qui engendre une forte transcription des ET (Zemach et al., 2013). *MdDDM1* est réprimé par l'ASM indépendamment de la température, ce qui peut expliquer l'induction de TE notable par l'éllicitation de ce SDP. DDM1 prévient aussi la mobilité des éléments transposables par l'ajout d'histone H2A.W (Osakabe et al., 2021). *MdH2A.W7* est un homologue de *Ath2A.W7* chez *A. thaliana*, présent au niveau de l'hétérochromatine et impliqué dans la tolérance aux stress génotoxiques (cassure double brin, etc. ; Lorković et Berger, 2017 ; Lorković et al., 2017). *MdH2A.W7* est réprimé par l'ASM, tout comme *MdDDM1* qui pourrait le recruter, ce qui suppose une répression des processus de réparation de l'ADN et l'activation de TE. De même, on observe aussi une répression de *MdCMT3*,

un homologue de *CMT3* chez *A. thaliana*, qui est impliqué dans la méthylation de l'ADN et par conséquent le contrôle de l'expression des gènes et stabilité du génome (Bartee et al., 2001 ; Cao et al., 2003). Sa répression indépendante de la chaleur pourrait aussi expliquer l'induction de TE ASM-dépendant.

La répression de mécanismes moléculaires liés à la croissance et au développement par l'ASM au profit de mécanismes liés aux défenses se traduit parfois chez le pommier au niveau phénotypique. Des retards de croissance ont en effet pu être observés par rapport à des semis traités à l'eau (données non présentées). Ce phénomène est connu chez d'autres espèces, tel que l'amarante (Nair et al., 2006), le haricot (*Phaseolus vulgaris* cv. *Prelude* ; Azami-Sardoei et al., 2013), le concombre (cv. *Jessica* ; Azami-Sardoei et al., 2013), le blé (*Triticum aestivum* ; Heil et al., 2000), ou encore l'oignon (*Allium cepa* ; Gent et al., 2005). Mais cet effet négatif sur la croissance et le développement, n'est pas toujours observé chez toutes les variétés d'une même espèce. Par exemple, l'ASM ne modifie pas ces paramètres chez la variété Moneymaker de la tomate, même pour une concentration 2,5 fois plus importante que celle préconisée pour une résistance conférée vis-à-vis de *B. cinerea* (Azami-Sardoei et al., 2013), alors qu'une diminution de la taille et du poids d'autres variétés de tomate (OH8245 et Easy Harvest) est décrite (Louws et al., 2001). De même chez le poivron, l'ASM provoque une réduction du rendement seulement pour une des 6 variétés testées tout en induisant une protection vis-à-vis de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* sur l'ensemble des variétés (Romero et al., 2001). Il semblerait donc que certains fonds génétiques soient plus sensibles à la répression de la croissance qui peut être provoquée par l'ASM.

Nos résultats montrent qu'un traitement ASM voit son efficacité vis-à-vis d'*E. amylovora* diminuer dès qu'une journée de chaleur dite naturelle (montée (6h) et diminution (6h) progressives de température encadrant un plateau de 4 h à 35°C) ou brutale (12 h à 35°) est appliquée dans les heures qui suivent le traitement. Cette perte d'efficacité a tendance à s'aggraver si les plantes sont exposées à des jours supplémentaires de chaleur antérieures au traitement. Au niveau transcriptionnel, cette perte d'efficacité est corrélée à une réduction de l'activation des défenses. Ceci est cohérent avec de nombreux résultats de la littérature. Par exemple, l'altération de la voie SA par la chaleur est illustrée chez *A. thaliana* soumis à des conditions de températures élevées, par la répression de deux acteurs de cette voie, *EDS1* et *SNC1*, chez des mutants surexprimant ces gènes dans des conditions normales de température (Yang et Hua, 2004). Huot et al. (2017) ont démontré que *A. thaliana* est plus sensible à *Pst* si les plantes sont placées à la chaleur 2 jours avant infection. Cette sensibilité accrue est associée, du côté de la plante, à une diminution des niveaux de SA, à une répression de sa biosynthèse (ICS1) ainsi que des défenses SA-dépendantes. Du côté de l'agent pathogène, les auteurs ont démontré que la translocation des effecteurs de type III était plus importante dans les plantes exposées à la chaleur. Concernant la signalisation ROS, Janda et al. (2019) ont également

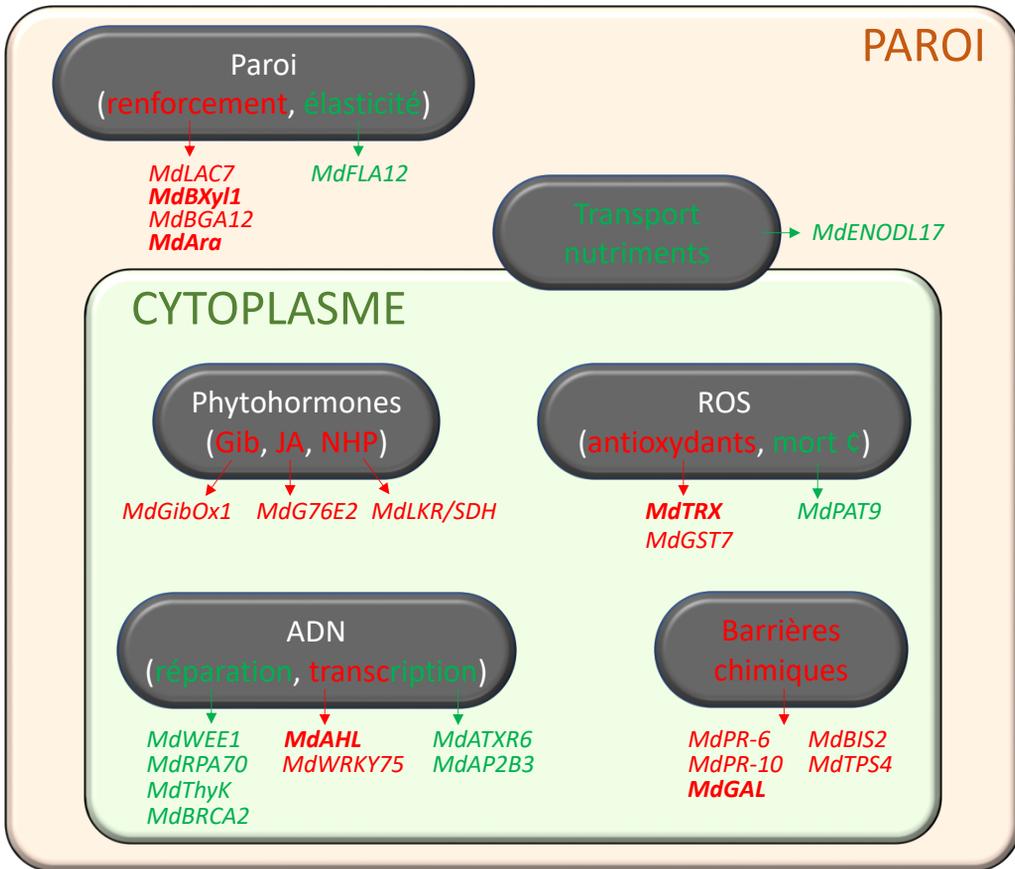


Figure 3.5 : Récapitulatif des gènes et fonctions cellulaires modulés par l'ASM à 21°C (rouge : induction, vert : répression) et moins modulés par ce même SDP si une journée à 35°C fait suite au traitement. Gib : gibbérelline, JA : jasmonic acid, NHP : N-hydroxy-pipecolique, ROS : reactive oxygen species, ϕ : cellulaire. Les gènes en gras semblent correspondre aux marqueurs les plus robustes (influence de la chaleur plus marquée si cumul de jours de chaleur, corrélée à une perte progressive de l'efficacité de l'ASM)

démontré que le burst oxydant induit par flg22 est réprimé par la chaleur qui provoque notamment la diminution de la transcription et de la traduction du récepteur spécifique FLS2.

L'analyse transcriptomique des pommiers traités à l'ASM et subissant une élévation de température montre que, parallèlement à la diminution de l'activation des acteurs de défense, une diminution de la répression d'acteurs de la croissance est observée. Ce phénomène est vérifiable phénotypiquement sur des mutants d'*A. thaliana* accumulant constitutivement du SA. À des températures normales, ces mutants présentent du nanisme, mais lorsqu'ils sont placés à la chaleur, ils retrouvent un phénotype semblable aux plantes non transformées (Yang et Hua, 2004 ; Ichimura et al., 2006 ; Hammoudi et al., 2018). Un des médiateurs de cette balance, le facteur de transcription PIF4 (Quint et al., 2016 ; Gangappa et al., 2017), est activé par la chaleur ce qui lève la répression exercée par le phytochrome phyB (Legris et al., 2016 ; Jung et al., 2016). PIF4 est impliqué dans la croissance en activant des gènes liés à la synthèse d'auxine, de GA et de brassinostéroïdes (Quint et al., 2016), mais également d'autres gènes liés à la croissance (*ATHB2*, *EXP8*, *XTR7*, etc. ; Gangappa et al., 2017). En effet, une des réponses transitoires d'*A. thaliana* pour échapper à la chaleur est de modifier son architecture aérienne (thermomorphogénèse), avec une élongation marquée du pétiole des feuilles de rosette et des cotylédons qui se déplacent vers le haut. Ce phénotype a un taux de transpiration plus élevé, ce qui permet d'atténuer les températures élevées en améliorant le refroidissement par évaporation. Il se produit aussi un amincissement des organes aériens, qui permet de les refroidir plus efficacement par transpiration et convection (Quint et al., 2016). Il est intéressant de noter que PIF4 joue également un rôle sur la voie SA, en réprimant l'expression de *EDS1* et *PBS3* ainsi que des gènes codant des protéines PR (*PR-1* et *PR-5*), conduisant à une sensibilité accrue à *Pst* (Gangappa et al., 2017) et *B. cinerea* (Xiang et al., 2020). Un homologue de *PIF4* n'a malheureusement pas été identifié dans nos analyses transcriptomiques. Quant à *DEL1*, réprimé par l'ASM en condition témoin, les analyses transcriptionnelles n'indiquent pas d'annulation de cette répression par la chaleur. Un médiateur de la balance croissance/défense modulé transitoirement par la chaleur reste donc à identifier chez le pommier.

Si on s'intéresse aux fonctions des marqueurs différentiellement régulés par l'ASM et la chaleur dans ce travail, ceux dont l'induction est moins élevée si une journée de chaleur suit le traitement ASM (au nombre de 15) appartiennent aux différents composants du système de défense de la plante, allant de la signalisation aux défenses impliquées dans la constitution des barrières physiques et chimiques. Quant aux marqueurs à l'inverse moins réprimés si une journée de chaleur suit le traitement ASM (au nombre de 9), ils concernent essentiellement l'ADN (condensation, réparation, transcription) mais également la paroi (élasticité, transport de nutriments) et les lipides. Tous ces marqueurs sont détaillés ci-dessous et représentés schématiquement dans la Figure 3.5. A noter qu'aucun marqueur spécifiquement lié à des réponses aux stress abiotiques (de type Heat Shock Protein par exemple) n'a été identifié dans cette étude. Ceci s'explique certainement par le fait que les analyses ont été effectuées après

retour des plantes dans des conditions standards de température et démontre bien le caractère transitoire de ces mécanismes de réponse.

Marqueurs moins induits par l'ASM en condition de chaleur

Deux homologues de facteurs de transcription sont concernés, *MdAHL* et *MdWRKY75*. *MdAHL* code un membre de la superfamille des facteurs de transcription AT-Hook, conservés dans une multitude d'organismes et pouvant activer ou réprimer la transcription de nombreux gènes (Aravind et Landsman, 1998). Les AHLs sont impliqués dans de nombreux processus de croissance et développement et de réponse aux stress (Xiao et al., 2009, Lim et al., 2007 ; Lu et al., 2010 ; Kim et al., 2007 ; Yadeta et al., 2011 ; Liu et al., 2021). Il est donc très difficile de proposer un rôle précis pour le gène *MdAHL* dans nos expériences : son comportement transcriptionnel après application de l'ASM peut suggérer qu'il a un rôle dans l'induction de défenses comme dans la répression de la croissance chez le pommier. *MdWRKY75* appartient quant à lui à une autre grande famille (WRKY) de facteurs de transcription impliqués dans de nombreuses réponses aux stress biotiques et abiotiques (Wani et al., 2021). Chez *Arabidopsis*, *AtWRKY75* est activé par une carence en phosphate, et a pour rôle de moduler son acquisition, en régulant le développement racinaire (Devaiah et al., 2007). D'autres rôles physiologiques lui sont attribués, en tant que régulateur positif de l'initiation de la floraison ou de la sénescence (Zhang et al., 2017a). Il est également induit par le SA, l' H_2O_2 et l'ontogénie de l'organe (Guo et al., 2017). Son homologue chez le peuplier (*Populus alba* x *P. glandulosa*) serait impliqué dans la tolérance aux stress salin et osmotique (Zhao et al., 2019). Outre ses nombreux rôles physiologiques, *AtWRKY75* activerait les défenses JA- dépendantes contre certains agents pathogènes, notamment vis-à-vis des deux champignons nécrotrophes *B. cinerea* et *Alternaria brassicicola* (Chen et al., 2020). Chez le pommier, son induction par l'ASM est cohérente avec les résultats de Guo et al. (2017) démontrant son inductibilité par le SA chez *A. thaliana*. Le comportement transcriptionnel de *MdWRKY75* s'avère être corrélé avec la modulation de l'efficacité de l'ASM par la chaleur et suggère son implication dans l'activation de gènes de défense participant à la résistance contre *E. amylovora*.

Trois marqueurs sont impliqués dans la signalisation hormonale : *MdGibOx1* (gibberellin 2-oxidase 1), *MdG76E2* (UDP-glucosyl transferase 76E2) et *MdLKR/SDH* (Lysine-cetoglutarate reductase/saccharopine déshydrogénase). *GibOx1* est une enzyme qui désactive les gibberellines (GA) par oxydation et qui impacte donc négativement la croissance et le développement (Sakamoto et al., 2001 ; Wang et al., 2020). La répression de nombreux processus de croissance et de développement observée dans nos expériences après traitement à l'ASM pourrait donc être en partie causée par l'oxydation des GA. Ce résultat est cohérent avec une étude chez le poivron (*Capsicum annuum* cv. *Bukang*) montrant l'induction d'une *GibOx* par l'application exogène de SA (Lee et al., 2012). La réduction d'activation de *MdGibOx1* par la

chaleur, pourrait alors révéler une reprise de l'élongation cellulaire, favorable à la bactérie. Concernant *MdG76E2* qui code potentiellement une UDP-glucosyl transférase 76E2, peu de choses sont décrites dans la littérature. Son homologue chez *A. thaliana*, semble être impliqué dans la biosynthèse de précurseurs glycosylés de la voie JA (acide 12-O-glucopyranosyl-jasmonique ; Haroth et al., 2019). L'activation synergique des voies de défense liées au SA et au JA pourrait donc contribuer à la résistance au feu bactérien, comme déjà suggérée par Dugé De Bernonville et al. (2012). Enfin, *MdLKR/SDH* code la première enzyme de la voie des saccharopines, connue pour être modulée par de nombreux stress abiotiques (Arruda et Barreto, 2020). Enzyme bifonctionnelle, sa fonction LKR (lysine-ketoglutarate reductase) transforme la lysine combinée à l' α -ketoglutarate en saccharopine, qui est ensuite convertie en glutamate et en α -aminoadipique semialdéhyde par la fonction SDH (saccharopine déshydrogénase ; Stepansky et Galili, 2003). Cette voie métabolique (au côté d'une autre voie, dite KAC ; Návarová et al., 2012) peut aboutir à la synthèse d'un signal de la SAR, l'acide N-hydroxy-pipecolique, qui active en synergie avec le SA les défenses immunitaires au niveau local et systémique (Hartmann et Zeier, 2018). L'application exogène de SA semble induire les deux voies chez *A. thaliana* (Arruda et Barreto, 2020), ce qui est en accord - tout au moins pour la voie des saccharopines - avec le comportement transcriptionnel de *MdLKR/SDH* induit par l'ASM dans nos travaux. De plus, nos résultats montrent que l'expression de ce gène en réponse à l'ASM est inhibée par la chaleur, ce qui pourrait en conséquence diminuer l'induction des défenses par l'acide N-hydroxy-pipecolique synthétisé par cette voie.

Quatre marqueurs sont impliqués dans la modification de la paroi, *MdARA* (arabinose kinase), *MdBGA12* (β -galactosidase 12), *MdBXL1* (β -xylosidase 1) et *MdLAC7* (laccase). La paroi est un élément structural qui peut être remodelé continuellement, notamment vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques (Houston et al., 2016). Les arabinoses kinases jouent un rôle dans la croissance de la paroi en participant à la création de polymères à partir d'arabinose que l'on retrouve dans la pectine (homogalacturonane, rhamnogalacturonane I et II), l'hémicellulose (xyloglucan), les protéines arabinogalactanes ou certaines extensines (Kotake et al., 2016). Les β -galactosidases 12 sont des enzymes localisées au niveau de la paroi et du réticulum endoplasmique (Moneo-Sánchez et al., 2016) qui peuvent aussi avoir une fonction importante dans le remodelage de la paroi durant l'expansion cellulaire (hydrolyse des β -(1,6)-galactooligosaccharides ; Gantulga et al., 2009). Les β -xylosidases 1 sont aussi associées à la croissance et au développement des tissus, en hydrolysant les glycanes composant majoritairement l'hémicellulose (xylane et xyloglucane) de la paroi secondaire (Goujon et al., 2003 ; Minic et al., 2004). *MdLAC7* code un homologue de la laccase 7 d'*A. thaliana*. Les laccases sont des oxydases impliquées dans la lignification de la paroi (O'Malley et al., 1993 ; Gavnholt et Larsen, 2002). L'induction de ces 4 gènes chez le pommier par l'ASM suggère donc un remodelage possible de la paroi, que l'on suppose plutôt dirigé vers un renforcement pariétal gênant la progression de la bactérie dans les espaces intercellulaires, et qui s'inverse si les plantes sont soumises à des conditions de chaleur.

Deux marqueurs sont impliqués dans la détoxification, *MdGST7* (Gluthatione-S-transférase 7) et *MdTRX* (Thioredoxine). Les glutathione-S-transférase (GST) sont des enzymes de protection contre le stress oxydant et de détoxification d'autres composés phytotoxiques (phénylpropanoïdes, etc.) en les conjuguant au glutathion. Elles sont induites par de nombreux stimuli comme les stress biotiques ou abiotiques (Marrs, 1996). Chez *A. thaliana*, les GST7 sont notamment accumulées après traitement par le SA (Sappl et al., 2004), en accord avec l'induction du gène *MdGST7* par le traitement ASM dans nos expériences. Les GST peuvent avoir divers rôles défensifs importants dans la relation plante-pathogène, puisqu'elles peuvent servir de récepteur au SA ou éliminer des composés toxiques engendrés par l'infection, tels que les ROS ou produits de peroxydation des lipides (Gullner et al., 2018). Les thiorédoxines sont des réductases qui participent aussi à la tolérance au stress oxydant, notamment dans la détoxification des hydroperoxydes lipidiques ou la réparation des protéines oxydées (Vieira Dos Santos et Rey, 2006). L'implication des thiorédoxines dans l'immunité est déjà démontrée dans divers pathosystèmes, que ce soit contre des phytopathogènes viraux (Sun et al., 2010) ou fongiques (Li et al., 2016 ; Rouhier et al., 2004). *E. amylovora* provoquant un burst oxydant par le biais de ces effecteurs DspA/E et HrpN, nécessaire à la pleine réalisation de sa pathogenèse (Venisse et al., 2001 ; Venisse et al., 2003), il peut être fait l'hypothèse que l'induction des 2 marqueurs, *MdGST7* et *MdTRX* par l'ASM déséquilibre la balance redox en défaveur de la bactérie (milieu trop réducteur), et que ce phénomène s'inverse à la chaleur.

Enfin 5 marqueurs sont liés à des mécanismes de défense de type « barrière chimique ». Il s'agit de *MdPR-6*, *MdPR-10*, *MdGAL*, *MdBIS2* et *MdTPS4*. Les PR-6 sont des inhibiteurs de protéinase (protéase à sérine) qui peuvent avoir des fonctions endogènes (dormance de la graine, mobilisation des protéines de réserve, etc.) et défensives avec des propriétés antimicrobiennes (Kim et al., 2009), notamment en réduisant la pathogénicité des bioagresseurs (Sels et al., 2008 ; Haq et al., 2004), via l'inhibition des cycles de réplication viral (Gutierrez-Campos et al., 1999), en inhibant les enzymes lytiques fongiques (Dunaevskii et al., 2005), ou les protéinases de tractus digestif des insectes et des nématodes, ce qui limite la quantité de nutriments assimilables (Vila et al., 2005 ; Urwin et al., 1997). Cette protéine peut aussi affecter la pathogénicité de certaines bactéries en inhibant leur activité protéolytique (Haq et al., 2004). Les cibles des PR-6 chez *E. amylovora* pourraient être une protéinase décrite comme nécessaire à la bactérie pour coloniser les tissus (Zhang et al., 1999a) mais également ses effecteurs Eop1, Eop3, Eop4 (AvrRpt2_{Ea}) et HopPtoC_{EA} qui possèdent des domaines assimilables à des protéases à sérine susceptibles d'être impliquées dans la répression de l'immunité basale du pommier (Yuan et al., 2020). Les PR-10, déjà évoquées dans le chapitre 2, sont des protéines capables de dégrader de l'ARN et/ou qui ont des activités antimicrobiennes contre les bactéries, les champignons et les virus. *MdGAL* est homologue de *GAL2* d'*A. thaliana*, un paralogue à *GAL1* appartenant à la famille des lectines GNA (Ghahremani et al., 2019) qui fixent les glycanes à haute teneur en mannose (Van Damme et al., 2008) et qui sont connues pour être impliquées

dans la résistance aux insectes ravageurs (Hilder et al., 1995 ; Down et al., 1996 ; Gatehouse et al., 1997 ; Rao et al., 1998 ; Stoger et al., 1999 ; Nagadhara et al., 2004 ; Dutta et al., 2005a ; Saha et al., 2006). Le rôle de GAL1 dans les stress biotiques n'est pas déterminé mais il apparaît qu'il est induit par la carence en phosphate et qu'il interagit avec une enzyme de captage et de recyclage du phosphate (AP26-S2) en augmentant son efficacité et sa stabilité thermique (Ghahremani et al., 2019). Chez le poivron (*C. annuum*), une lectine GNA avec un domaine GAL s'avère être impliquée dans l'activation des défenses et l'accumulation des ROS dans la résistance contre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv ; Kim et al., 2015). *MdBIS2* fait partie de la famille des biphényles synthases qui participent à la synthèse de phytoalexines polyphénoliques (biphényle et dibenzofurane) ayant des propriétés antimicrobiennes notamment vis-à-vis d'*E. amylovora* (Chizzali et al., 2012). *MdTPS4* code pour un homologue d'une terpène synthase (TPS) 4 chez *A. thaliana*. Les MdTPS participent à la synthèse de composés volatiles défensifs chez le pommier (Nieuwenhuizen et al., 2012), notamment des sesquiterpènes volatiles, tel le (*E,E*)- α -farnesène, répulsif pour le puceron cendré (Warneys et al., 2018). Certaines TPS sont impliquées dans la biosynthèse de métabolites antimicrobiens volatiles et participent aux défenses contre les bactéries phytopathogènes. C'est par exemple le cas de *OsTPS18* et *OsTPS21* synthétisant respectivement du (*E*)-nerolidol et du geraniol qui inhibent tous deux la croissance de *Xoo* dans le riz (Kiryu et al., 2018 ; Kiyama et al., 2021). Il est donc envisageable que *MdTPS4* puisse conduire à des composés antimicrobiens vis-à-vis d'*E. amylovora*. En dehors de *MdPR10* dont l'implication dans la résistance à l'agent du feu bactérien semble peu probable (cf chapitre 2), les 4 autres marqueurs pourraient être à l'inverse impliqués. Leur induction moindre après traitement à l'ASM combiné à la chaleur, corrélée avec une protection plus faible, en font d'excellents candidats pour une analyse fonctionnelle comme celle effectuée sur les MdAGG.

Marqueurs moins réprimés par l'ASM en condition de chaleur

MdATXR6 est homologue de *AtATXR6* d'*A. thaliana*, méthyltransférase diminuant l'accessibilité de la chromatine par méthylation d'histones H3K27 (Jacob et al., 2009). Cette méthylation permet en particulier le silençage d'ET (Jacob et al., 2010), essentiel pour la maintenance de l'intégrité du génome lors de sa réplication, notamment durant la phase S : c'est donc un acteur important dans la régulation de la croissance et du développement (Hale et al., 2016). La répression de l'expression du gène *MdATXR6* par l'ASM pourrait expliquer en partie l'induction observée de nombreux ET, de même que sa moins forte répression à la chaleur pourrait être à l'origine de la plus faible induction d'ET enregistrée. Au-delà des ET, la modulation de l'expression de ce régulateur épigénétique pourrait contribuer à définir les régions génomiques transcriptionnellement actives, soit comportant des gènes impliqués dans les défenses, soit comportant des gènes impliqués dans la croissance.

Quatre autres marqueurs sont impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Il s'agit de *MdWEE1*, *MdRPA70*, *MdThyK* et *MdBRCA2*. Les trois premiers codent respectivement pour une kinase (impliquée chez *A. thaliana* dans la régulation de l'arrêt cellulaire), la sous-unité B du complexe RPA (protéine de liaison à l'ADN) et une thymidine kinase (impliquée dans le recyclage des nucléotides). Ces trois gènes ont un rôle démontré dans la réparation de l'ADN face à des stress génotoxiques chez *A. thaliana*, notamment dans les tissus en croissance. (De Schutter et al., 2007 ; Pan et al., 2021 ; Takashi et al., 2009 ; Pedroza-García et al., 2014 ; Xu et al., 2015 ; Pedroza-García et al., 2018). *MdBRCA2* semble avoir le même rôle de réparation et de maintenance de l'intégrité du génome, d'après ce qui est connu de son homologue chez l'homme (Narod et Foulkes, 2004) ou chez *A. thaliana* (Lafarge, 2003 ; Siaud et al., 2004 ; Seeliger et al., 2011). Dans nos expériences, la répression de l'ensemble de ces 4 gènes par l'ASM est probablement une conséquence de la répression possible de la multiplication cellulaire par l'ASM, la réparation de l'ADN s'avérant alors peu sollicitée. Inversement, leur dérégulation par la chaleur pourrait être corrélée à une reprise de croissance. A noter que le gène *BRCA2* a aussi été décrit comme impliqué dans la reprogrammation du génome pour mobiliser la SAR chez *A. thaliana*, notamment en augmentant la recombinaison (Wang et al., 2010). Ces travaux vont à l'encontre de ce qui est observé chez le pommier, puisque le gène *MdBRCA2* est plutôt réprimé par l'ASM.

MdAP2B3 appartient à la superfamille des facteurs de transcription B3 impliqués dans la croissance et le développement (Peng et Weselake, 2013). Sa répression par l'ASM observée dans notre travail est cohérente avec un ralentissement de croissance, qui est donc levée par des conditions de chaleur. Ce facteur de transcription pourrait jouer un rôle clef dans la reprise de la croissance du pommier, favorable à *E. amylovora*.

Le marqueur *MdFLA12* concerne la paroi. Il code potentiellement une fascicline type arabinogalactane (FLA) 12, enzyme impliquée dans l'adhésion cellulaire (Johnson et al., 2003) et dans l'élasticité de la paroi (MacMillan et al., 2010). Ainsi sa répression par l'ASM pourrait provoquer la rigidification de la paroi, phénomène qui tendrait à s'inverser à la chaleur, en cohérence avec le développement plus important d'*E. amylovora* dans des plantes soumises à cette condition de stress abiotique. En effet, la bactérie ne synthétise pas d'enzymes hydrolysant la paroi, et la présence de parois souples, présentes en particulier dans des tissus en croissance active, favoriserait logiquement le processus d'infection.

Le marqueur *MdENODL17* code une protéine de type noduline précoce (ENODL). Les nodulines sont des transporteurs de nutriments (sucres, acides aminés, etc.) et de phytohormones (auxine, etc.). Elles permettent le contrôle des flux de nutriments durant les interactions symbiotiques et pathogéniques (Denancé et al., 2014). Majoritairement pariétales, elles sont impliquées dans l'initiation de l'infection et la formation des nodules de symbioses racinaires (Nap et Bisseling, 1990 ; Bladergroen et Spink, 1998). Pour les plantes n'établissant

pas de nodules, telles que *A. thaliana*, les ENODL s'apparentent à des phytocyanines dont les fonctions ne sont pas clairement élucidées (Denancé et al., 2014) mais un rôle dans le transport des carbohydrates a été suggéré (Khan et al., 2007). Si *MdENOD17* s'avérait être un transporteur de nutriments, sa répression par un traitement ASM pourrait conduire à la restriction des ressources disponibles pour la bactérie, phénomène s'inversant à la chaleur.

MdPAT9 contient un domaine type patatine (PLP) 9. Les PLP, sont des homologues de la patatine qui est une protéine de stockage dans les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) avec des activités d'acylhydrolase et d'acyltransférase lipidiques (Andrews et al., 1988). Les PLP sont aussi des enzymes impliquées dans l'hydrolyse des lipides et la mort cellulaire et peuvent être induites par des stress abiotiques telle que la sécheresse (Matos et al., 2001) ou corrélées à des états de résistance ou de sensibilité vis-à-vis des agents pathogènes selon les cas (La Camera et al., 2005 ; La Camera et al., 2009). Ces auteurs supposent que les mécanismes de la HR sont intensifiés par certaines PLP, en dégradant les membranes et alimentant la formation des oxylipines, phénomènes favorables aux organismes nécrotrophes et hémibiotrophes contrairement aux agents pathogènes obligatoires viraux. Concernant *E. amylovora*, la répression du gène *MdPAT9* par l'ASM pourrait contrer la mort cellulaire que la bactérie induit à son profit, et la dérpression de ce dernier par la chaleur pourrait refavoriser à l'inverse le processus d'infection.

Le comportement de ces marqueurs suite à un traitement ASM dans des conditions de chaleur de plus en plus marquées (1 à 4 jours de cumul) n'a pu être abordé qu'en fin de travail de thèse. Un seul prélèvement a été effectué, 3 jours après traitement, et il aurait été intéressant de suivre la cinétique de modulation de ces gènes (1, 2 et 3 jours après traitement par exemple) pour repérer d'éventuels retards d'induction ou de répression de plus en plus marqués avec le cumul de journées chaudes. Le résultat obtenu 3 jours après traitement permet cependant de repérer déjà quelques comportements intéressants parmi les 25 marqueurs. Cinq d'entre eux, associés à la signalisation défense/croissance (*MdAHL*), au renforcement pariétal (*MdARA*, *MdBGA12*, *MdBXL1*) et à la détoxification des ROS (*MdTHX*), montrent une diminution significative d'induction après traitement à l'ASM dès lors que les conditions de chaleur dépassent un jour, en corrélation avec une baisse progressive d'efficacité de protection du SDP entre 1 et 3 vagues de chaleur. Ils ont donc potentiellement un rôle très déterminant dans l'interaction entre le pommier et *E. amylovora*. Quatre autres marqueurs, impliqués dans la synthèse de phénylpropanoïdes (*MdBIS2*), la détoxification des ROS (*MdGST7*) et la production de protéines PR (*MdPR-6* et *MdPR-10*), voient leur expression clairement diminuée dès que 4 jours de chaleur sont appliqués. Un tel programme de température n'a pas été testé sur la perte d'efficacité de protection de l'ASM mais ces résultats transcriptionnels suggèrent qu'elle pourrait être encore plus importante.

L'ensemble de ce travail démontre que les conditions environnementales, notamment la température, peuvent impacter l'efficacité d'un SDP sur pommier. Il a des applications pratiques immédiates sur les préconisations de traitements au verger comme d'éviter d'appliquer un SDP en cours - ou en sortie - d'une vague de chaleur, conditions pouvant être favorables à divers agents pathogènes, surtout si elles s'accompagnent d'évènements pluvieux (*E. amylovora* mais également *V. inaequalis*, agent de la tavelure). De telles conditions existent déjà à la fin du printemps et durant l'été, comme révélées par l'analyse des données météorologiques (jusqu'à 3 jours d'affilée de fortes températures enregistrées), mais pourraient augmenter en fréquence et en durée en raison du réchauffement climatique, réduisant d'autant plus les possibilités de traitements SDP. Pour affiner les préconisations, il faudrait approfondir le timing d'application de l'ASM par rapport aux jours de températures élevées : une journée de chaleur post-traitement semble défavorable, et ce d'autant plus qu'elle est précédée de plusieurs jours dans les mêmes conditions environnementales. Qu'en est-il si les journées de chaleur ne font que précéder le traitement ? L'utilisation des marqueurs moléculaires identifiés dans ce travail, s'ils s'avéraient particulièrement robustes, avec une variation de modulation clairement corrélée à une perte d'efficacité de protection, pourrait faciliter l'approfondissement de la question. Ces marqueurs, s'ils concernent l'établissement de barrières chimiques ou physiques, pourraient également être d'excellents candidats pour de nouvelles études fondamentales visant à comprendre les effecteurs de résistance du pommier vis-à-vis d'*E. amylovora*, voire d'autres agents pathogènes du pommier comme *V. inaequalis*, afin de compléter celle réalisée avec les MdAGG.

4 Conclusion générale

L'étude des défenses des plantes regroupe de nombreuses publications qui s'intéressent surtout aux mécanismes de perception des bioagresseurs (ou des éliciteurs) et à la signalisation qui en découle. Ces travaux révèlent le plus souvent de grandes voies métaboliques/transcriptionnelles dont les acteurs finaux restent peu caractérisés. C'est le cas par exemple des protéines PR, fréquemment repérées, mais dont la fonction biologique dans l'interaction étudiée reste le plus souvent inconnue. Or, identifier les réels acteurs de la résistance, en aval de la signalisation, permet de mieux comprendre l'interaction entre l'agent pathogène et son hôte et d'avoir des indicateurs permettant de présager de son issue : maladie ou résistance. Intéressants d'un point de vue fondamental, ils peuvent utilement améliorer le criblage de SDP au niveau moléculaire, avec une prédiction de leur efficacité vis-à-vis de tel ou tel bioagresseur en fonction des marqueurs élicités. Ils peuvent également permettre un classement des variétés existantes, voire aider à la sélection de nouvelles, sur la base de leur capacité à déployer (naturellement ou après traitement SDP) telle ou telle défense nécessaire à la résistance vis-à-vis des différents bioagresseurs de la culture.

La première partie de nos travaux a donc l'originalité de s'intéresser à la caractérisation fonctionnelle d'un des produits finaux défensifs du pommier, les MdAGGs. Ces dernières se sont révélées d'excellents marqueurs de résistance au feu bactérien dans nos conditions de cultures, jugées optimales pour la croissance et le développement du pommier. Nos résultats *in vitro* démontrent en effet que les MdAGGs ont la capacité d'agglutiner *E. amylovora*, dans des conditions compatibles avec celles que la bactérie rencontre *in planta* et suggèrent que ces défenses particulières pourraient ralentir la progression des bactéries en carence nutritionnelle en tout début d'infection. Il est intéressant de constater qu'un tel facteur agglutinant avait déjà été observé chez le pommier, sans être isolé et identifié, il y a 40 ans de cela. Ainsi, ces lectines semblent faire partie intégrante des acteurs de la course à l'armement qui s'établit au cours de l'infection par l'agent du feu bactérien. Bloquant la bactérie, elles facilitent peut-être l'action d'autres acteurs de défense tels que des composés antimicrobiens par exemple. Une autre hypothèse serait que la cystéine terminale des MdAGGs, en plus d'être impliquée dans la formation des homodimères de MdAGGs (données non présentées), permet de recruter d'autres protéines défensives à action antimicrobienne pour les amener au contact de la bactérie. Des suites à ce travail sont d'ores et déjà engagées, avec une thèse démarrée à l'automne 2020 visant à démontrer le rôle des MdAGG *in planta* par des approches biotechnologiques et le dépôt d'un projet de thèse sur la capacité des MdAGG à recruter des protéines défensives.

Malgré les forts niveaux de protection conférés par certains SDP en conditions contrôlées, notamment l'ASM, ceux-ci montrent une grande variabilité d'efficacité au passage au champ. On peut s'étonner que l'impact des stress environnementaux sur l'efficacité des SDP, bien que très

souvent évoqué dans la littérature, ne soit que peu étudié. Ceci fait une autre originalité de nos travaux qui mettent en lumière l'impact de la chaleur sur l'efficacité de notre SDP modèle, l'ASM. Ce résultat est bien sûr à approfondir pour améliorer les préconisations d'utilisation des SDP en verger. En effet, de nombreux paramètres restent à préciser, tels que la cinétique et l'amplitude de ce stress, et le positionnement des SDP par rapport à des journées de chaleur, cumulées ou non. Cela démontre toute la complexité de ce type d'étude, sachant de plus que les stress environnementaux peuvent se combiner sur le terrain. Comme il n'est pas improbable que des événements climatiques stressants augmentent en fréquence et en intensité dans les années futures en raison du réchauffement climatique, il semble pressant de développer largement ce domaine de recherche si l'on souhaite utiliser les SDP en protection des cultures avec une efficacité suffisante et fiable.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence 25 marqueurs traduisant la perte d'efficacité de l'ASM, qui pourront faciliter des investigations supplémentaires sur le positionnement des traitements par rapport à des périodes de chaleur. Ils devraient de plus permettre d'affiner la stratégie utilisée jusqu'à présent dans l'équipe pour identifier les défenses efficaces vis-à-vis des bioagresseurs du pommier : en effet, ne vaudrait-il pas mieux cibler des marqueurs dont l'induction par l'ASM « décroche » en situation de stress en corrélation avec une perte d'efficacité de protection, pour augmenter les chances de trouver les acteurs les plus impliqués dans cette protection ? Ainsi, notre étude identifie 8 candidats potentiels pour une caractérisation fonctionnelle, si on exclut les marqueurs réprimés par l'ASM et parmi les marqueurs induits, ceux ciblant l'ADN, les phytohormones, le système antioxydant et la PR-10, dont le rôle dans la résistance vis-à-vis du feu bactérien semble peu probable d'après nos résultats (Figure 3.5). Quatre d'entre eux pourraient être impliqués dans des mécanismes à action directe vis-à-vis d'*E. amylovora* : il s'agit d'une nouvelle lectine (*MdGAL*), d'un inhibiteur de protéinase (*MdPR-6*), et de deux enzymes impliquées dans la production de phytoalexines potentielles (*MdBIS2*, voie des biphényles et *MdTPS4*, voie des terpènes). Les 4 autres sont liés au remodelage de la paroi, et concernent la cellulose ou l'hémicellulose (*MdARA*, *MdBGA12*, *MdBXL1*), ou encore la lignine (*MdLAC7*). Parmi les 25 marqueurs identifiés, 4 se révèlent particulièrement intéressants car ils sont d'autant moins induits par l'ASM que les journées de chaleur se cumulent, en corrélation avec les effets de protection diminués. Ils n'ont pas d'action directement antimicrobienne car plutôt impliqués dans le renforcement pariétal (on retrouve *MdBXL1* et *MdARA*), le système antioxydant (*MdTRX*) et un facteur de transcription (*MdAHL*). Ceci indique peut-être que les barrières chimiques induites par l'ASM ne sont pleinement efficaces vis-à-vis d'*E. amylovora* que quand le milieu physique et redox constitué par la plante est lui-même défavorable à la bactérie. En tout cas, cela confirme que les MdAGGs ne sont pas les seuls acteurs de la résistance induite par l'ASM, puisque leur production ne semble pas modifiée par la chaleur. Pour conforter ces conclusions et/ou éventuellement repérer d'autres candidats ayant potentiellement un fort impact sur la bactérie car « décrochant » progressivement avec un cumul croissant de chaleur, il faudrait toutefois étudier la cinétique

d'expression de la totalité des marqueurs identifiés après traitement à l'ASM dans les différentes modalités de chaleur. Il n'est pas en effet impossible que le stress n'ait provoqué qu'un retard d'induction, non observable dans l'analyse ponctuelle réalisée 3 jours après traitement mais suffisant pour expliquer la diminution d'efficacité du traitement.

L'induction de l'immunité par des SDP devrait pouvoir contribuer à la diminution des pesticides, sous réserve qu'on puisse fiabiliser leur utilisation. Son gros avantage est qu'elle peut conférer en théorie une résistance tout au moins partielle vis-à-vis d'un large panel de bioagresseurs. Mais certaines protéines défensives induites sont allergènes, telles que les protéines PR-10, ce qui pourrait contraindre l'utilisation de ces intrants à des périodes éloignées des récoltes. De plus, la mobilisation des défenses pourrait être désavantageuse pour le rendement, puisqu'elle représente un coût non alloué au métabolisme primaire. Non mis en évidence phénotypiquement en verger de pommier, peut-être en raison d'une utilisation non optimale des SDP, cette balance croissance/défense a été clairement suspectée dans nos travaux et devra probablement être prise en compte dès lors que l'on saura utiliser plus efficacement ces produits sur le terrain. Ainsi, l'immunité optimale d'une culture d'un point de vue global (protection et qualité/quantité de récolte) n'est pas forcément son immunité maximale. Pour toutes ces raisons (efficacité partielle, effet sur le développement de la plante), les SDP sont sûrement à envisager en association avec d'autres méthodes de lutte.

A



B



C



Figure 5.1.1 : Matériel végétal utilisé dans les expérimentations: semis (A), plants greffés (B) et arbres (C) de pommier (*M. domestica*).

5 Matériels et méthodes

5.1 Matériel végétal et conditions de culture

5.1.1 Matériel végétal

Les expérimentations sont réalisées sur différents types de matériel végétal du pommier (*M. Domestica*) : semis (Figure 5.1.1A), greffes (Figure 5.1.1B), rameaux ou arbres en verger (Figure 5.1.1C). L'ensemble du matériel végétal provient des vergers de l'unité expérimentale (UE HORTI) située sur le site INRAE d'Angers.

Pour l'étude de la modulation des *MdAGGs* par le T3SS d'*E. amylovora*, les expérimentations sont réalisées sur des greffes sensibles MM106 et résistantes ME010 ou Evereste, choisies pour leur résistance contrastée au feu bactérien (Durel et al., 2009). Pour l'analyse transcriptionnelle des *MdAGGs* dans des feuilles traitées à l'ASM ou à l'eau de 5 variétés, des greffes de Judeline, Granny Smith, Golden Delicious, Gala et Chantecler ont été choisies pour leur sensibilités variables sur les pousses et les fleurs (Thibault et Le Lezec, 1990). Enfin, l'étude de l'effet de la chaleur combiné à l'ASM a été réalisée sur des semis de Golden et des greffes de l'haploïde doublé de Golden Delicious (GDDH13), génotype choisi pour la qualité de sa séquence génomique (Daccord et al., 2017). Les greffes sont obtenus de la manière suivante : les greffons sont prélevés entre décembre et février et greffés par vague de mars à juin sur des porte-greffes MM106 plantés en terreau.

L'analyse transcriptionnelle des *MdAGGs* dans des fleurs et pédoncules floraux a été réalisée sur des rameaux prélevés en verger entre le stade bouton rose (E) et début de floraison (F) en avril 2019. Les 9 variétés étudiées par cette approche sont Belle de Boskoop, Judeline, Granny Smith, Akane, Golden Delicious, Gala, Chantecler, Idared et Reine des Reinettes. L'analyse transcriptionnelle des *MdAGGs* à différents stades phénologiques de Golden Delicious, a été réalisée à partir d'organes prélevés sur des arbres en verger en 2012.

Pour toutes les autres expérimentations, y compris les études sur la combinaison ASM x chaleur, des semis provenant de pépins issus d'une pollinisation libre de Golden Delicious sont utilisés pour leur sensibilité globale au feu bactérien. Les semis sont obtenus de la manière suivante : les pépins sont vernalisés pendant 3 mois à 4°C dans un mélange humide de sable et de vermiculite, puis semés en barquette de terreau, et les plantules sont repiquées en pots individuels.

A

Programme témoin						Programme stress de chaleur brutal						Programme mimant une vague de chaleur naturelle					
Segment	Nom	Durée	T°C	HR	Lumière	Segment	Nom	Durée	T°C	HR	Lumière	Segment	Nom	Durée	T°C	HR	Lumière
N°0	Initiation	0h	18°C	80%	0%	N°0	Initiation	0h	18°C	80%	0%	N°0	Initiation	0h	18°C	80%	0%
N°1	Matin	8h	18°C	80%	0%	N°1	Matin	8h	18°C	80%	0%	N°1	Matin	8h	18°C	80%	0%
N°2	Allumage	1min	18°C	80%	10%	N°2	Allumage	1min	18°C	80%	10%	N°2	Allumage	1min	18°C	80%	10%
N°3	Aube1	1h59	21°C	60%	50%	N°3	Aube1	1h59	35°C	40%	50%	N°3	Aube	3h59	29,3°C	53%	100%
N°4	Aube2	2h	21°C	60%	100%	N°4	Aube2	2h	35°C	40%	100%	N°4	Jour1	2h	35°C	40%	100%
N°5	Jour	4h	21°C	60%	100%	N°5	Jour	4h	35°C	40%	100%	N°5	Jour2	2h	35°C	40%	100%
N°6	Crépuscule	4h	21°C	60%	1%	N°6	Crépuscule	4h	35°C	40%	1%	N°6	Crépuscule1	2h	35°C	40%	50%
N°7	Nuit1	2h	21°C	60%	0%	N°7	Nuit1	2h	35°C	40%	0%	N°7	Crépuscule2	2h	29,3°C	53%	1%
N°8	Nuit2	2h	18°C	80%	0%	N°8	Nuit2	2h	18°C	80%	0%	N°8	Nuit	4h	18°C	80%	0%
Ventilation 50%						Ventilation 50%						Ventilation 50%					

B

Enchaînement	Durée pente	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9
Témoin	2h	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin
4h	6h	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Stress 35°C	Témoin	Témoin	Témoin
12h	2h	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Stress 35°C	Témoin	Témoin	Témoin
4h (X3)	6h	Témoin	Témoin	Témoin	Stress 35°C	Stress 35°C	Stress 35°C	Témoin	Témoin	Témoin
4h (x1)	6h	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Stress 35°C	Témoin	Témoin	Témoin
4h (x2)	6h	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Stress 35°C	Stress 35°C	Témoin	Témoin	Témoin
4h (x4)	6h	Témoin	Témoin	Stress 35°C	Stress 35°C	Stress 35°C	Stress 35°C	Témoin	Témoin	Témoin

-  Traitement
-  Prélèvements
-  Prélèvements ou inoculation



Figure 5.1.3 : Programmes appliqués aux plants greffés GDDH13 dans les armoires climatiques (A) et enchaînement des programmes (B). (A) Durée, température (T°C), humidité relative (HR) et intensité lumineuse propres à chacun des segments constituant les programmes appliqués sur 24 h. (B) Chronologie des programmes appliqués pour tester l'effet de la chaleur sur le traitement. Les périodes de traitements, prélèvements ou inoculation sont indiquées par des flèches. Les programmes témoins sont indiqués par des cases bleues, le programme correspondant à stress de chaleur brutale est indiqué par une case rouge et les programmes mimant un vague de chaleur naturelle sont indiqués par des cases orangées. Les expériences sur plants greffés sont réalisées en armoires climatiques pendant 9 jours et sur semis pendant 7 jours mis à part une expérience nécessitant un prélèvement le 9^e jour.

5.1.2 Conditions de culture semi-contrôlées

Les semis et les greffes sont cultivés en serre en conditions semi-contrôlées, avec une photopériode naturelle complémentée d'un éclairage d'appoint pour atteindre 16 h de photopériode, des températures diurnes et nocturnes comprises respectivement entre 21 et 25°C et entre 15 et 17°C. Les plantes sont arrosées à l'eau de ville tous les 2 à 4 jours. Les semis sont utilisés à partir du stade 3 à 6 feuilles et les greffes lorsque les pousses atteignent 20 à 40 cm. Les rameaux sont maintenus jusqu'au stade de pleine floraison (F2) avec la partie sectionnée plongée dans de l'eau de ville, avec une photopériode naturelle, et à température ambiante (comprise entre 18 et 22°C).

5.1.3 Conditions de culture contrôlées

Pour l'étude des stress températures, les plantes sont placées dans des conditions de luminosité, d'hygrométrie et de température précises dans des armoires climatiques FitoClima 600 (ARALAB, Rio de Mouro, Portugal). Les programmes régulant ces conditions sont réalisés à l'aide du logiciel FitoLog fourni par le constructeur. Les segments (sur 24 h) composant les différents programmes appliqués sont résumés en Figure 5.1.3A et détaillés en Annexe 1. Un programme de température témoin mime les conditions en serre avec un palier de 12 h à 21°C et un palier de 8 h à 18°C, avec des rampes en pente affine de 2 h entre ces deux paliers. Le programme mimant un stress brutal de chaleur est identique au programme témoin, à l'exception du palier de 12 h qui est à 35°C. Le programme mimant les conditions naturelles d'une vague de chaleur est composé d'un palier de 4 h à 35°C et d'un palier de 8 h à 18°C, avec des rampes en pente affine de 6 h entre ces deux paliers. Pour tous les programmes, l'humidité relative est inversement corrélée à la température atteignant 80, 60 et 40% pour un palier de 18, 21, et 35°C respectivement. Les conditions de luminosité sont identiques pour tous les programmes, avec 12 h d'obscurité et 4 h de lumière à 100% (300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) pendant les paliers de températures les plus élevées avec changement de luminosité en pente affine de 4h. Les éclairages sont constitués d'une combinaison de lampes à LED (spectre 45% Bleu / 45 % Rouge clair / 10 % Blanc).

Les plantes en armoires climatiques subissent 9 enchaînements possibles de programmes journaliers sur une période de 7 ou 9 jours, selon les expériences décrites (Figure 5.1.3B). Selon la chronologie des programmes, les plantes sont acclimatées avec le programme témoin pendant 2 à 5 jours avant le stress de chaleur, et replacées sous ce même programme en reprise post-stress pendant 1 à 4 jours. Le stress chaleur correspond à une journée du programme de chaleur

Tableau 5.2 : Substance active et concentration ([C]) des SDP candidats

Nom commercial	Marque	Fonction	Substance active	Abréviation	[C]
Armicarb®	De Sangosse	Biofongicide	Bicarbonate de potassium	KHCO	12,25 g.l ⁻¹
Bion® 50WG	Syngenta	SDP	Acibenzolar-S-Methyl	ASM	0,4 g.l ⁻¹
Exilis®	De Sangosse	Eclaircisseur	6-Benzylaminopurine	6BA	18,75 ml.l ⁻¹
Kendal®	Valagro	Biostimulant	Matière organique naturelle	NOM	7,5 ml.l ⁻¹
LBG-01F34®	De Sangosse	SDP	Phosphonate de potassium	KHP	10 ml.l ⁻¹
Pitpom® Plus	YaraVita	Fertilisant foliaire	Calcium	Ca	20 ml.l ⁻¹
Regalis® Plus	BASF	SDP, régulateur de croissance	Prohexadione-calcium	Pro-Ca	2,5 g.l ⁻¹
Rhodofix®	Nufarm	Eclaircisseur	Acide 1-naphtylacétique	NAA	1,5 g.l ⁻¹
Trafos® Mg-Ca-Si	Tradecorps	Fertilisant foliaire	P, K, Mg, Ca, Si	Mg-Ca-Si	10 ml.l ⁻¹

Tableau 5.3.1 : Caractéristiques des souches et mutants d'*E. amylovora* utilisés.

Souche	Abréviation	Caractéristiques	Référence
CFBP1430	<i>Ea</i> WT	Souche sauvage isolée de <i>Crataegus</i>	(Paulin et al., 1973)
PMV6023	<i>Ea t3ss</i>	<i>hrcV</i> ::MudIIPR13, Cm ^r , HR ⁻ , path ⁻	(Barny et al., 1995)
PMV6112	<i>Ea hrpN</i>	<i>hrpN</i> ::MudIIPR13, Cm ^r , HR ⁺ , path ⁺	(Tharaud et al., 1994)
M52	<i>Ea dspA/E</i>	<i>dspA/E</i> ::uidA-Km, Km ^r , HR ⁻ , path ⁻	(Gaudriault et al., 1997)
PMV6089	<i>Ea ams</i>	<i>ams</i> ::MudIIPR13, Cm ^r , HR ⁺ , path ⁻	(Tharaud et al., 1994)

Cm^r: résistant au chloramphénicol ; Km^r: résistant à la kanamycine ; HR: réponse d'hypersensibilité ; path : pathogénicité

brutale, ou à 1 à 3 jours du programme de chaleur mimant des conditions naturelles. Selon les expériences, les plantes sont traitées le 6^{ème} jour et inoculées le 7^{ème} ou le 9^{ème} suivant si ce sont des semis ou des greffes respectivement. Les prélèvements sont réalisés uniquement le 9^{ème} jour pour les greffes contrairement au semis qui peuvent être prélevés 8 h, 24 h et 72 h après le traitement (soit le 6^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jours).

5.2 SDP candidats et procédures d'application

Les produits, leur substance active et leur concentration d'application sont détaillés dans le tableau 5.2. Les mélanges sont préparés avec de l'eau osmosée selon les recommandations des fabricants. Les plantes traitées à l'eau osmosée sont systématiquement utilisées comme témoins pour évaluer l'effet des produits. Les différents traitements sont appliqués par pulvérisation avec un pistolet à peinture Aeryo-1.4 associé à une buse de 1,4 mm de diamètre (Deltalyo, Mably, France). La pulvérisation est effectuée jusqu'à limite de ruissellement sur l'ensemble des parties aériennes des plantes, hormis une seule expérience (effet systémique de l'ASM), dans laquelle une seule feuille (JF ou FM) reçoit le traitement, tout en étant séparée des autres organes par une feuille de plastique.

5.3 Souches bactériennes et procédures d'inoculation

5.3.1 Souches bactériennes et dosages des inocula

La souche CFBP1430 d'*E. amylovora* (*Ea* WT), virulente sur la majorité des génotypes de pommier cultivés (Paulin et Samson, 1973) a été utilisée de même que des mutants de *Ea* WT affectés dans la biosynthèse de différents facteurs du pouvoir pathogène (Tableau 5.3.1). Les inocula sont préparés à partir de bactéries en phase exponentielle de croissance cultivées pendant une nuit à 26°C sur milieu King B (King et al., 1954) supplémenté avec l'antibiotique approprié (20 µg.ml⁻¹) pour la culture des différents mutants. Les suspensions bactériennes préparées dans de l'eau stérile sont calibrées à la concentration souhaitée en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm avec le spectrophotomètre à microplaque µQuant® (Bio-Tek, Colmar, France). Les DO sont rapportées à la courbe étalon de *Ea* WT pour toutes les souches, à l'exception d'*Ea* *ams* qui dispose de sa propre courbe étalon (Figure 5.3.1).

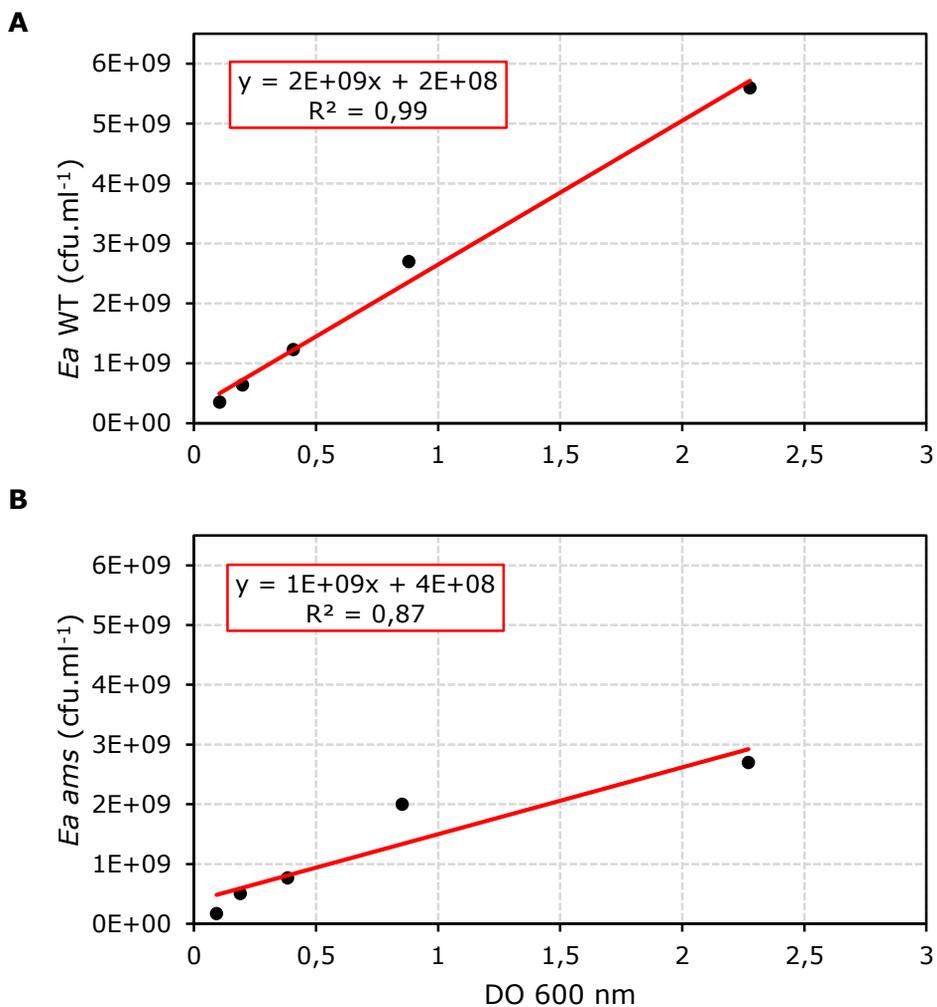


Figure 5.3.1 : Courbe étalon utilisée pour déterminer les concentrations de la souche sauvage d'*E. amylovora* (*Ea* WT) et des souches mutantes capsulées (A) et celle utilisée pour déterminer les concentrations de la souche mutante non-capsulée *Ea ams* (B).

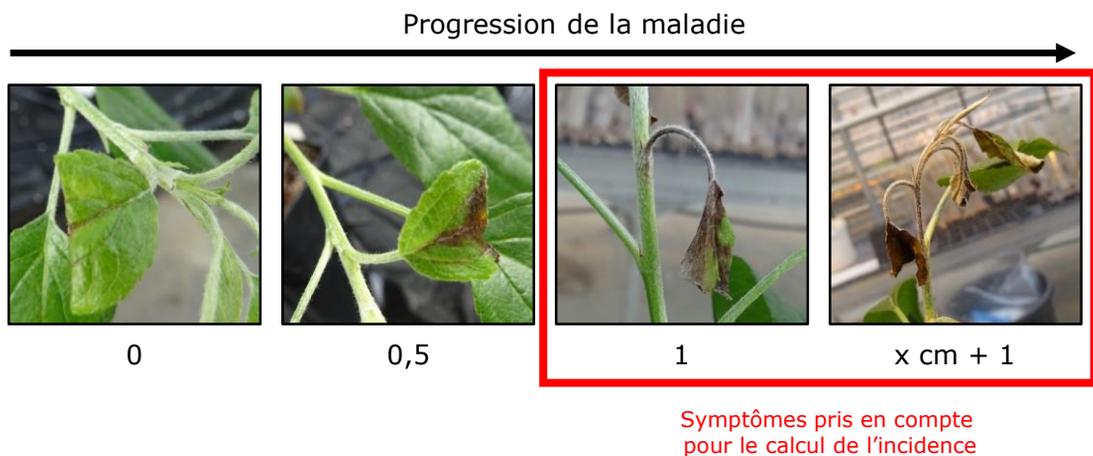


Figure 5.4 : Notation des symptômes de feu bactérien sur pommier. L'incidence correspond au pourcentage de plantes malades, à partir du stade où la nécrose atteint le pétiole de la feuille inoculée. La sévérité des symptômes est notée 0 si absence de nécrose ; 0,5 si la nécrose se restreint à la nervure de la feuille inoculée ; 1 si elle atteint le pétiole ; et x cm + 1 si elle atteint la tige avec x = longueur de nécrose sur tige.

5.3.2 Méthodes d'inoculation

Les inoculations d'*E. amylovora* sont réalisées par coupure (*Ea* WT) ou par infiltration sous vide (*Ea* WT et mutants) selon les expériences réalisées.

Pour les tests de pouvoir pathogène, l'inoculation est réalisée par coupure en sectionnant 2 tiers des 2 plus jeunes feuilles développées, perpendiculairement à la nervure centrale, avec des ciseaux trempés dans l'inoculum calibré à 10^8 cfu.ml⁻¹.

Pour l'analyse de l'expression des défenses, les inoculations sont réalisées par infiltrations d'inocula (*Ea* WT ou mutants) calibrés à 10^7 cfu.ml⁻¹ ou à 10^8 cfu.ml⁻¹ (selon l'expérience) et préparés dans de l'eau stérile supplémentée par 0,01 % d'agent mouillant Silwet L-77® (De Sangosse Ltd, Cambridge, UK).

Pour les mesures de pH apoplastique et de fuites d'électrolytes, l'inoculum (*Ea* WT) calibré à 10^9 cfu.ml⁻¹ est préparé dans un tampon MES (0,1 mM ; pH 5,9) supplémenté de 0,01% de Silwet L-77®. Les infiltrations sont effectuées sous vide pendant 3 min au-delà de -0,9 MPa sur les jeunes feuilles de semis ou de greffes et sur les disques foliaires immergés dans les suspensions bactériennes, ou dans la solution témoin sans bactérie (eau osmosée + 0,01% Silwet L-77® ou MES + 0,01% Silwet L-77® respectivement pour les feuilles et les disques foliaires).

5.4 Évaluation de l'incidence et de la sévérité du feu bactérien

Les symptômes ont été mesurés 3 à 4 semaines après inoculation. Deux méthodes d'évaluation différentes de la maladie ont été utilisées (Figure 5.4) :

- L'incidence qui correspond au pourcentage de plantes présentant une nécrose atteignant au moins le pétiole de la feuilles inoculée. Elle est calculée sur un bloc de 10 plantes 3 semaines après inoculation. Pour chaque expérience, l'incidence de chaque bloc (I_x) est normalisée en incidence relative (IR_x), en la rapportant à la moyenne des incidences des blocs constitués de plantes témoins traitées à l'eau (μI_{Eau}). L'efficacité de protection est l'écart entre IR_x et μI_{Eau} (égal à 1) pour chaque répétition expérimentale et pour chaque bloc, tel que : Efficacité de protection_x (%) = $[(\mu I_{Eau} - I_x) / \mu I_{Eau}] \times 100 = [1 - IR_x] \times 100$
- La sévérité en utilisant les notes suivantes :
 - une note de 0 quand aucun symptôme n'est visible,

- une note de 0,5 lorsque la nécrose atteint la nervure de l'une des feuilles inoculées,
- une note de 1 lorsque la nécrose atteint le pétiole de l'une des feuilles inoculées,
- une note correspondant à la longueur de nécrose sur tige (cm) + 1 lorsque la tige est atteinte.

La durée entre le traitement et l'inoculation, ainsi que le nombre de greffes ou de blocs de semis utilisés dans chaque expérience sont indiqués dans les légendes des figures correspondantes.

5.5 Mesure du pH apoplastique et des fuites d'électrolytes

Chaque mesure est effectuée sur 20 disques foliaires (\varnothing 1,4 cm) immergés dans un tampon MES (0,1 mM ; pH 6) à 25°C sous agitation et lumière artificielle. Le pH et la conductivité du milieu d'incubation sont mesurés toutes les 12 h pendant 48 h à l'aide d'un pH-mètre (Schott CG 840, Schott, Mainz, Germany) et d'un conductivimètre respectivement (WTW-Microprocessor Conductivity Meter LF 535, Los Angeles, USA).

5.6 Échantillonnage dédié à l'analyse des défenses

L'analyse des défenses est réalisée à partir de prélèvements de disques foliaires ou de différents organes. Pour les études comparatives incluant différents organes, les organes entiers sont prélevés : pédoncules floraux, fleurs, feuilles, tiges et parties apicales. Le nombre d'organes prélevés individuellement est indiqué pour chaque expérience dans les légendes des figures correspondantes. Pour les analyses sur feuilles uniquement, les prélèvements correspondent à des pools de 10 disques foliaires (\varnothing 0.9 cm) découpés à partir du parenchyme de la plus jeunes feuille de 5 semis (ou de 3-4 greffes). Les échantillons prélevés sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'au broyage.

5.7 Analyse transcriptionnelle

5.7.1 Extraction d'ARN

Les tissus coriaces, c'est-à-dire les feuilles entières, parties apicales, tiges, pédoncules floraux et fleurs, sont préalablement broyés au mortier et pilon dans de l'azote liquide. La poudre résultante ou les disques foliaires sont broyés en fine poudre à l'aide d'un broyeur à bille (Retsch, Haan, Germany). Les ARN totaux sont extraits avec le Kit Nucleospin® RNA Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany) selon les recommandations du fabricant. La pureté et la concentration des ARN sont mesurées par spectrophotométrie avec un NanoDrop® One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.7.2 Rétrotranscription (RT)

La RT est réalisée à partir de 2 µg d'ARN dans un volume final de 30 µl. Les amorces d'oligo-dT15 (0,7 µmol.l⁻¹ ; Eurogentec, Seraing, Belgique) sont fixées à l'ARN par un choc thermique (passage de 72°C à 4°C). La polymérisation des ADNc est catalysée à 42 °C pendant 1 h 15 par la transcriptase inverse M-MLV (200 U.µl⁻¹ ; Promega, Madison, WI, USA) en présence d'un mélange équimolaire de dNTP (2,5 mM final). La présence d'ADNc et l'absence d'ADNg contaminant sont vérifiées par PCR en utilisant les amorces EF-α flanquant un intron (directe : ATTGTGGTCATTGGYCA YGT ; reverse : CCTATCTTGTA VACATCCTG ; Y = C ou T ; V = G ou T ; Rosati et al., 1997). L'amplification est catalysée par l'ADN polymérase GoTaq® Flexi (Promega, Madison, WI, USA) selon les consignes du fabricant sur le thermocycleur Bio-Rad iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA ; 5 min à 95°C ; 35 cycles constitués de : 30 s à 90°C, 30 s à 53°C, 45 s à 72°C ; 10 min à 72°C). Les produits d'amplification sont séparés sur un gel TAE-agarose (2 %) et marqués au bromure d'éthidium (10 mg.l⁻¹) pour être visualisés sous UV avec le système d'imagerie Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

5.7.3 PCR quantitative (qPCR)

Le niveau d'expression de chaque gène est déterminé par RT-qPCR en triplicat sur des plaques 96 puits. Dans chaque puit, le mélange réactionnel est constitué de 0,15 µl d'ADNc, 3,75 µl de MesaBlue MasterMix (Eurogentec, Seraing, Liège, Belgique), 8,1 µl d'eau ultrapure et 3 µl de solution d'amorces à la concentration optimale d'amplification (Annexe 3). Les qPCR sont réalisées avec le thermocycleur CFX96™system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA ; 5 min à 95°C ; 40 cycles constitués de : 15 s à 95 °C, 1 min à 60 °C ; 30 s à 50 °C) et les cycles de quantification

(Cq) sont obtenus via le logiciel Bio-Rad CFX Maestro 2.0. Les expressions relatives sont calculées selon la formule du $2^{-\Delta\Delta Cq}$, soit $2^{(Cq \text{ du calibrateur} - Cq \text{ de l'échantillon})}$, et normalisées par la moyenne géométrique des expressions relatives des 3 gènes de références (TuA, Actine et GAPDH ; Vandesompele et al., 2002). Les expressions sont exprimées en \log_2 pour accorder autant d'importance entre les répressions et les inductions. L'expression de chaque gène de chaque échantillon est relative à celle du calibrateur approprié, indiqué pour chaque expérience dans les légendes des figures correspondantes.

5.8 Analyse transcriptomique par microarray

5.8.1 Extraction, amplification et marquage

Les ARN dédiés aux analyses par microarray sont extraits de la même manière que pour l'analyse transcriptionnelle de gènes ciblés. La qualité des ARN issus des greffes GDDH13 est vérifiée au bioanalyzer avec le Kit Agilent ARN 6000 Nano (Agilent, Waldbronn, Germany) selon les recommandations du fabricant. L'amplification et le marquage des ARN des greffes GDDH13 sont réalisés selon les instructions du kit Low Input Quick Amp Labeling, two color (Agilent, Waldbronn, Germany) à partir de fluorochromes préparés selon le kit RNA Spike-In kit, two-color (Agilent, Waldbronn, Germany) puis les ADNc marqués sont purifiés avec le kit Rneasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) selon les recommandations du fabricant.

La qualité des ARN issus des semis Golden Delicious ou des greffes MM106 et ME010 est vérifiée sur gel d'agarose 1,2 % et ces ARN sont amplifiés selon les instructions du kit AMBION MessageAmpII aRNA Amplification, MEGAclear et DNAclear (Life Technologies, Carlsbad, USA). Chaque ARN amplifié est rétrotranscrit en ADNc avec la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen) et les ADNc sont marqués aux fluorochromes Cy3/Cy5 (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG) selon le protocole décrit par Celton et al., 2014.

La qualité et l'homogénéité des marquages sont vérifiés par spectrophotométrie avec un NanoDrop® One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), puis les ADNc marqués sont conservés à -20°C jusqu'à hybridation.

5.8.2 Hybridations et scans des puces

Les ADNc marqués issus des greffes GDDH13 sont préparés avec les Kit Gene Expression Hybridation (Agilent, Waldbronn, Germany) et Hi-RPM gene Expression Hybridation (Agilent, Waldbronn, Germany) selon le protocole du fabricant. Les ADNc marqués issus des semis Golden

Delicious ou des greffes MM106 et ME010 sont hybridés à l'aide des solutions d'hybridation fournies par Roche Nimblegen (Madison, WI, USA) selon le protocole décrit par Celton et al., 2014. Toutes les expériences sont réalisées en dye-switch comme décrit par Depuydt et al., 2008. Les lames microarrays utilisées sont :

- pour les semis Golden Delicious ou les greffes MM106 et ME010 : sur des lames Aryanes v1.0 (Agilent, design n°551261) contenant 120 000 sondes dessinées sur les CDS sens et anti-sens des gènes prédits par l'annotation de Veslasco et al., 2010.
- pour les greffes GDDH13 : sur des lames Aryanes v1.1 (Agilent, design n°85275) contenant 86 300 sondes dessinées sur les transposons et les CDS sens et anti-sens des gènes prédits par l'annotation de Daccord et al., 2017.

Les lames Aryanes v1.0 et v1.1 sont incubées en chambre d'hybridation (65°C ; 17 h), puis après lavages, sont scannées respectivement avec le scanner NimbleGen MS200 (Roche Nimblegen, Madison, WI, USA) et Innoscan 710 (Innopsys, Carbonne, France) et les données sont extraites à l'aide des logiciels associés, NimbleScan v2.4 et Mapix respectivement.

5.9 Analyse protéique

5.9.1 Extraction protéique des tissus

Les tissus dédiés à l'extraction protéique sont broyés au mortier et pilon dans l'azote liquide. Pour toutes les extractions, 200 mg de poudre sont utilisés. L'ancien protocole d'extraction protéique des MdAGGs est décrit par Warneys et al. (2018 ; Annexe 2). Les 6 méthodes d'extraction mises en œuvre pour détecter les MdAGGs en western blot sont réalisées selon le protocole de Hurkman et Tanaka (2007). Ces méthodes concernent des extractions à l'urée, au SDS, au TCA-acétone, au phénol-chloroforme-isopropanol, à l'éthanol acide et au phénol. L'extraction protéique optimisée pour détecter les MdAGGs est une extraction réalisée en conditions dénaturantes. La poudre, à laquelle est ajoutée une pointe de spatule de polyvinylpyrrolidone (PVPP), est vortexée en présence d'un tampon SDS dense (30 % de saccharose ; 2 % de SDS ; 5 % de β -mercaptoéthanol ; 0,1 M de Tris ; pH 8). Du phénol à pH 8 stabilisé avec du Tris-HCl 10 mM et de l'EDTA 1 mM (1:1 v:v) est ajouté, puis le mélange est incubé 5 min et centrifugé (16000 g ; 10 min). La phase supérieure phénolique est récupérée et précipitée une nuit à -20°C dans un tampon acétate d'ammonium-méthanol (1:5 v:v ; 0,1 M d'acétate d'ammonium ; 50 mM de DTT ; 100 % de méthanol). Les protéines précipitées sont culotées par centrifugation (16000 g ; 10 min) et le surnageant est éliminé. Après séchage (2 min), les culots protéiques sont repris dans un tampon de Laemmli modifié (0,125 % de SDS ; 10 % de glycérol ; 62,5 mM de Tris ; 5 mM de DTT ; pH 7,5). Les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à l'analyse en western blot.

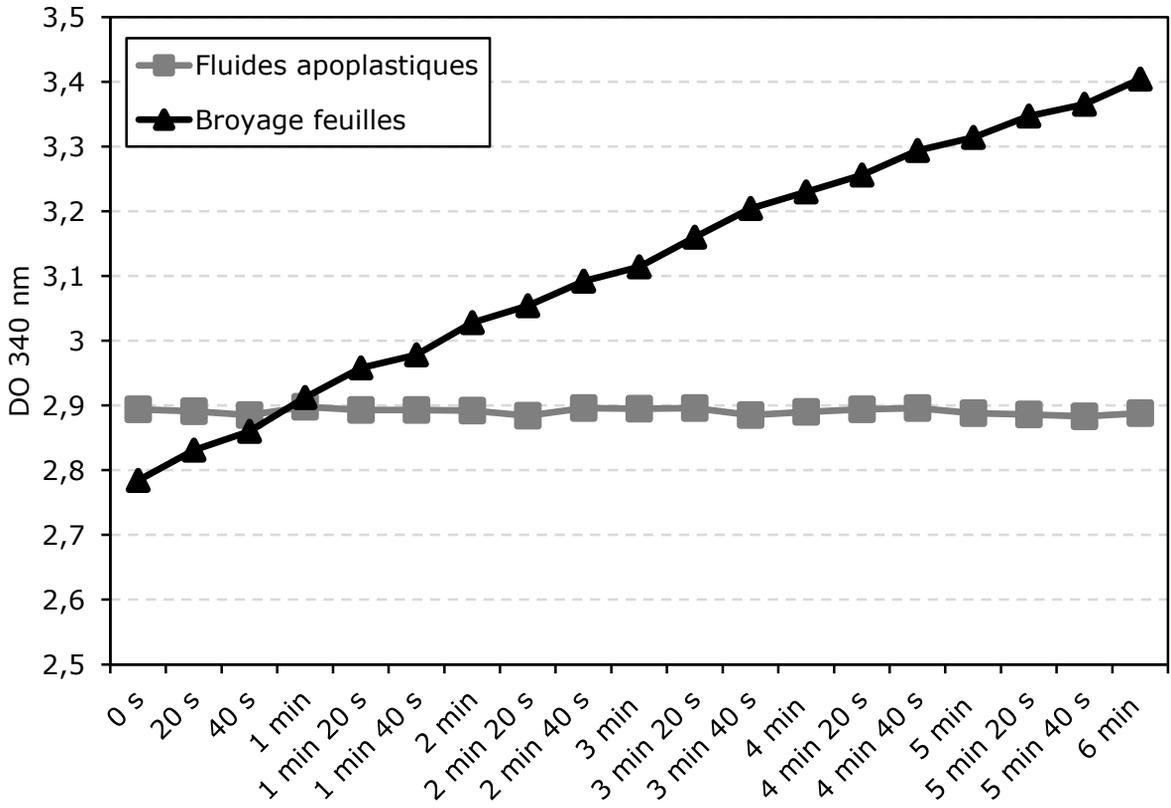


Figure 5.9.2 : Vérification de l'absence de contenu intracellulaire par mesure de l'activité G6PDH à 640 nm dans les fluides apoplastiques comparé à des broyats de feuilles fraîches réalisés au mortier.

5.9.2 Extraction des fluides apoplastiques

Les fluides extracellulaires sont obtenus à partir des 2 plus jeunes feuilles de semis Golden Delicious infiltrées sous vide avec un tampon dénaturant Tris-KCl (100 mM de Tris ; 100 mM de KCl ; 5 mM de DTT ; 1 mM de PMSF ; 0,01 % de Triton ; pH 7). Après séchage en surface, les feuilles sont coupées au niveau de la partie distale pour recueillir les fluides apoplastiques par centrifugation (10000 x g ; 20 min ; 4°C). L'absence de contenu intracellulaire est vérifiée par l'activité G6PDH en mesurant la réduction du NADP⁺ en NADPH à une DO de 340 nm (6 min de cinétique) avec un spectrophotomètre à microplaques μ Quant® (Bio-Tek, Colmar, France ; Figure 5.9.2). Les mesures de l'activité enzymatique sont réalisées dans une solution contenant les fluides apoplastiques dilués dans un tampon réactif de glucose-6-phosphate (G6P) et d'hydrate de β -NADP⁺ (100 mM de tricine ; 10 mM de MgCl₂ ; 2,4 mM d'hydrate de β -NADP⁺ ; 20 mM de G6P ; pH 8,2 ; 1:1:7 v:v:v).

5.9.3 Dosage et migration SDS-PAGE

Les extraits protéiques sont dosés au bleu de Coomassie à une DO 595 nm (Bradford, 1976) par rapport à leur tampon de dissolution respectif avec un spectrophotomètre à microplaques μ Quant® (Bio-Tek, Colmar, France). Les concentrations protéiques ($[C]_p$) sont calculées à partir d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA ; $[C]_p = 696,41 \times DO - 3,3087$).

Après dosages, les solutions sont ajustées à la concentration protéique désirée, et mélangées à un tampon de charge dénaturant plus (312 mM de Tris ; 10 % de SDS ; 50 % de glycérol ; 0,05 % de bleu de bromophénol ; 25 % de β -mercaptoéthanol) ou moins concentré (20 % de SDS ; 0,1 % de bleu de bromophénol ; 50 % de β -mercaptoéthanol) respectivement pour les fluides apoplastiques (1:4 v:v) et les protéines solubilisées dans le tampon de Laemmli modifié (1:9 v:v).

Les extraits protéiques dans leur tampon de charge dénaturant respectif sont séparés par migration SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Les échantillons migrent à travers un gel de concentration (3,75 % d'acrylamide/bis-acrylamide (19:1 v:v) ; 0,1 % de SDS ; 3 % de persulfate d'ammonium ; 0,2 % de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) ; 125 mM de Tris ; pH 6,8) à 60 V et ensuite dans un gel de séparation (14 % acrylamide/bis-acrylamide (19:1 v:v) ; 0,1 % de SDS ; 3 % de persulfate d'ammonium ; 0,12 % de TEMED ; 372 mM de Tris ; pH 8,8) à 120 V, incubés dans un tampon de migration (100 mM de glycine ; 0,05 % de SDS ; 25 mM de Tris ; pH 8-8,3). Les profils protéiques sont révélés après 2 h d'immersion des gels de séparation dans une solution de coloration (0,25 % de bleu de Coomassie ; 50 % de méthanol

; 10 % d'acide acétique) puis par une décoloration progressive grâce à des lavages répétés dans une solution éthanol:acide acétique. Le marqueur de taille protéique Color Prestained Protein Standard Broad Range P7712S (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) est utilisé pour visualiser la progression de la migration. Les gels sont photographiés avec un appareil photo compact Sony® DSC-HX60 (Sony® Corporation, Tokyo, Japon).

5.9.4 Transfert et immunodétection

Les protéines des gels de séparation sont transférées (1,5 mA cm² ; 1 h ; < 30 V) sur des membranes de polyvinylidène difluoride (PVDF ; immobilon-P, Milli- pore Corp., Bedford, MA, États-Unis) préparées selon les recommandations du fabricant, prises en sandwich entre des papiers filtres Western Pierce® de 3 mm d'épaisseur (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Le sandwich de transfert est composé, de l'anode à la cathode, d'une première couche de 2 papiers filtres, d'une deuxième couche de papier filtre suivie de la membrane PVDF et d'une troisième couche avec le gel de séparation suivi de 3 papiers filtres, chaque couche ayant préalablement et respectivement été incubée 15 min dans la solution anode 1 (10 % de méthanol ; 300 mM de Tris ; pH 10,4), la solution anode 2 (10 % de méthanol ; 25 mM de Tris ; pH 10,4) et la solution cathode (10 % de méthanol ; 0,1 % de SDS ; 40 mM de glycine ; 25 mM de Tris ; pH 9,4).

Après le transfert, la membrane PVDF est immergée dans une solution de blocage (0,05 % de Tween® 20 ; 10 % de lait demi-écrémé en poudre ; 150 mM de NaCl ; 20 mM de Tris ; pH 7,6) pendant une nuit à 4 °C. Le lendemain, la membrane PVDF est lavée (5 min ; sous agitation) 2 fois dans un tampon TBSt (0,05 % de Tween® 20 ; 150 mM de NaCl ; 20 mM de Tris ; pH 7,6) et incubée 2 h dans un tampon TBS (150 mM de NaCl ; 20 mM de Tris ; pH 7,6) contenant des anticorps purifiés ciblant soit les MdAGGs (2 anticorps ; 1:1000 v:v chacun) ou contenant des anticorps purifiés ciblant MdPR-10 (1:1000 v:v) et un sérum contenant des anticorps ciblant MdPR-2 (1:5000 v:v). Ces anticorps ont été obtenus au cours de programme d'immunisation de lapin avec des peptides synthétiques (MdAGGs : NKYLRYQLDAESDLN et TEKPNNEDYADKNYV ; AEILEGDGGVGTIKK pour MdPR-10 ; MAKPSSSVGRARGPS et TPELEKHWGLFSPNK for MdPR-2 ; Eurogentec, Seraing, Belgique). Les membranes PVDF ont été lavées 4 fois dans un tampon Tris-NaCl (150 mM de NaCl ; 50 mM de Tris ; pH 7,5) et incubées pendant 2 h dans un tampon Tris-NaCl avec des anticorps de chèvre anti-lapin conjugués à une phosphatase alcaline (1:200000 v:v). La membrane PVDF est de nouveau lavée 4 fois dans le tampon Tris-NaCl et incubée 5-30 min dans un tampon de révélation (7 mM de MgCl₂ ; 0,01 % de solution de chlorure nitrotétrazolium bleu (NBT ; 10 mM de NBT ; 70 % de N-N-diméthylformamide (DMF)) ; 0,0075% de solution de phosphate 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl (BCIP ; 135 mM de BCIP ; 100 % de DMF) ; 100 mM de NaCl ; 100 mM de Tris ; pH 9,6). La

révélation est stoppée avec de l'HCl (0,2 M). La membrane est photographiée avec un appareil photo compact Sony® DSC-HX60 (Sony® Corporation, Tokyo, Japon).

5.10 Production et caractérisation de la protéine

MdAGG10 recombinante

5.10.1 Production de la MdAGG10

Les codons de la séquence génique de MdAGG10 ont été optimisés pour l'expression dans *E. coli* et le gène a été exprimé dans la souche Rosetta-Gami 2 sous forme d'une protéine de fusion clivable par la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*), contenant en partie N-terminale une étiquette d'affinité His-MBP. Les cellules bactériennes sont mises en suspension dans un tampon d'éluion (20 mM de Tris-HCl ; 500 mM de NaCl ; 10 mM d'imidazole ; pH 8,5), homogénéisé 2 fois à une pression de 10 000 p.s.i. (EmulsiFlex-C3, Avestin, Ottawa, Canada). La fraction soluble est purifiée par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés à l'aide d'une colonne 5 ml HisTrap™ HP (GE healthcare, Uppsala, Sweden) et éluée par l'addition d'imidazole (20 mM de Tris-HCl ; 500 mM de NaCl ; 300 mM d'imidazole ; pH 8,5). Les fractions protéiques contenant la MdAGG10 sont combinées. L'étiquette d'affinité est clivée par la protéase TEV (ratio protéase/protéine de 1 pour 100) et le mélange réactionnel est placé dans un boudin de dialyse placé lui-même dans un tampon de dialyse (20 mM de Tris-HCl ; 200 mM de sulfate d'ammonium ; 1 mM de DTT ; 1 mM de d'EDTA ; pH 8,5) pendant 16 h à 4°C avant d'être transféré pour 2 h dans le même tampon de dialyse mais dépourvu de DTT et d'EDTA. Le clivage de l'étiquette entraîne la formation spontanée d'agrégats microcristallins de MdAGG10 permettant leur récupération par centrifugation (10000 rpm ; 5 min). Après 2 étapes supplémentaires de lavage-centrifugation en utilisant un tampon de reprise (20 mM de Tris-HCl ; 200 mM de sulfate d'ammonium ; pH 8,5), le culot est resuspendu dans ce même tampon et conservé à 4 °C.

5.10.2 Chromatographie d'exclusion stérique

Les microcristaux de MdAGG10 sont solubilisés par mélange avec du NaOH 0,5 M (1:1 v:v). L'échantillon solubilisé est immédiatement dilué (1:49 v:v) soit dans un tampon salin à pH 8,5 (50 mM de Tris-HCl ; 150 mM de NaCl) à pH 8,5, soit dans des tampons salins acides (50 mM d'acétate de sodium ; 150 mM de NaCl, pH de 5,4 ; 4,9 ; 4,4 ou 3,9). Les échantillons dilués sont centrifugés (15 000 g ; 5 min) avant d'être injectés dans une colonne Superdex 75 10/300

GL (Cytiva, Tokyo, Japan) montée sur un FPLC Akta Pure (Cytiva, Tokyo, Japan) préalablement équilibrée dans le tampon de dilution correspondant. Les profils d'élution sont suivis par fluorescence à l'aide d'un détecteur de fluorescence RF-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 280 et 340 nm respectivement. Tous les profils d'élution sont enregistrés en utilisant les mêmes réglages que pour le détecteur de fluorescence (sensibilité = 2(MED), gain = 1 (x1), ce qui correspond à augmentation de la sensibilité de détection d'un facteur x32).

5.10.3 Spectrophotométrie par fluorescence

Les échantillons sont préparés dans divers tampons, comme pour les expériences de chromatographie d'exclusion stérique. Les échantillons sont divisés en deux parties, l'une étant centrifugée (15000 x g ; 5 min) et l'autre non. Les mesures de fluorescence sont réalisées en passant les échantillons distribués sur une plaque 96 puits noire (Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA) dans un lecteur de microplaques FlexStation 3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La longueur d'onde d'excitation est de 280 nm (avec une coupure à 325 nm). Les spectres d'émission sont enregistrés entre 300 et 450 nm à intervalles de 10 nm. Les mesures sont effectuées en utilisant 6 flashes par lecture (gain des tubes photomultiplicateurs réglé sur Medium). Tous les spectres de fluorescence sont corrigés par des mesures effectuées sur les blancs (tampon respectif de chaque échantillon).

5.10.4 Modélisation de la structure tridimensionnelle *in*

silico

L'entrée de la séquence d'acides aminés de MdAGG10 dans le serveur HHPred (Zimmermann et al., 2018) a permis l'alignement de séquence avec l'agglutinine d'*Amaranthus caudatus* (Amaranthin, Transue et al., 1997, PDB : 1JLY). Cet alignement est utilisé par le logiciel Modeller (Webb & Sali, 2016) pour modéliser par homologie la structure prédite de MdAGG10. Les charges de surface sont calculées avec le logiciel PDB2PQR (Dolinsky et al., 2004), en utilisant PROPKA pour attribuer aux résidus de surface les états de protonation à un pH donné, et le champ de force PARSE. Le potentiel électrostatique de la surface moléculaire prédite de MdAGG10 est enfin visualisé à l'aide du logiciel PyMOL 2.4.1 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) à l'aide du plugin APBS Electrostatics.

5.11 Tests d'agglutination

Les protéines MdAGG10 (2 mg/ml), conservées sous forme cristalline dans un tampon de stockage (20 mM de Tris ; 200 mM de sulfate d'ammonium ; pH 8,5) sont solubilisées dans du NaOH 0,5 M (1:1 v:v). Les protéines dissoutes sont immédiatement solubilisées (1:24 v:v) dans un tampon acide d'acétate de sodium (100 mM d'acétate de sodium ; pH 4) ou un tampon neutre de Tris (20 mM de Tris-HCl ; pH 7,5). Les solutions de MdAGG10 diluées (40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sont mélangées avec des suspensions d'*Ea WT* ou d'*Ea ams* à 10^8 cfu. ml^{-1} préparées dans de l'eau osmosée (1:1 v:v) et incubées à température ambiante pendant au moins 30 min. Dans certaines expériences, *Ea WT* est lavée de son EPS libre (*Ea WT_{lavée}*) par vortexage puis centrifugation de la suspension bactérienne (5000 g ; 5 min) et resuspension du culot dans de l'eau osmosée. La BSA et la WGA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) sont directement diluées dans les mêmes tampons que MdAGG10 et sont testées de la même manière.

Pour les expériences d'inhibition, les composés (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, sauf indication contraire) sont ajoutés au tampon de dilution contenant les protéines avant mélange avec les bactéries. L'EPS d'*Ea WT* est extrait selon la méthode décrite par Bajpai et al., 2016. Les LPS d'*Ea ams* sont extraits à partir du kit LPS Isolation Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. Comme témoin, le tampon de stockage des cristaux des protéines (20 mM de Tris ; 200 mM de sulfate d'ammonium ; pH 8,5) subit la même procédure que celle effectuée pour la préparation de MdAGG10. Après une incubation de 30 min à température ambiante, les préparations de protéines sont mélangées avec *Ea ams* comme décrit précédemment.

Des photos à faible grossissement ont été prises avec une caméra numérique U-CMAD3 (Olympus, Tokyo, Japon) montée sur une loupe binoculaire SZX16 (Olympus, Tokyo, Japon). La microscopie a été réalisée avec un microscope optique Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) associé à une caméra Hamamatsu ORCA-Flash4.0 C11440-22CU (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japon).

5.12 Tests d'inhibition de croissance bactérienne

La MdAGG10 ou son tampon de stockage (témoin) subissent la même procédure de dilution dans un tampon acide d'acétate de sodium (100 mM d'acétate de sodium ; pH 4) ou un tampon neutre de Tris (20 mM de Tris-HCl ; pH 7,5). Les suspensions d'*Ea WT* et *Ea ams* à 10^8 cfu. ml^{-1} sont incubées pendant 1 h dans le tampon contenant MdAGG10 ou non (1:1 v:v). Après incubation, les solutions sont déposées en triplicat dans du milieu LB liquide (1:9 v:v) contenu dans les puits de plaques Honeycomb Bioscreen (Labsystems, Helsinki, Finland). La croissance

bactérienne est mesurée sous agitation pendant 70 h, avec une prise de DO à 600 nm effectuée toutes les 2 h, dans un lecteur optique Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finland). La présence de contaminants bactériens est vérifiée dans le milieu LB seul, les MdAGG10, le tampon neutre Tris, le tampon d'acétate d'ammonium ou l'eau stérile ayant servi à la préparation des bactéries.

5.13 Analyse de données et statistiques

L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel RStudio (R Core Team, 2019). Les représentations graphiques sont générées à l'aide du package « ggplot2 » (Wickham et al., 2020) en combinaison avec « ggpubr » (Kassambra, 2020).

Hormis les microarray, les différences entre les conditions sont évaluées par des tests non paramétriques. Les comparaisons par paires ont été effectuées avec un test Wilcoxon-Mann-Whitney (Bauer, 1972 ; Hollander et al., 2013). Les comparaisons multiples sont réalisées avec un test Kruskal-Wallis associé à un test post-hoc de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni (Hollander et al., 2013) et les différences statistiques sont établies avec un seuil de risque de 5 %. Les tests de corrélation sont effectués avec le test de corrélation de rang de Spearman.

Pour les microarrays, la normalisation des données et les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (R Core Team, 2019) en utilisant le package LIMMA 3.10.1 (Smyth, 2005) du projet Bioconductor, selon la méthode décrite par Celton et al. (2014). Brièvement, après extraction des valeurs de scans, les données sont normalisées avec la méthode lowess, et les analyses d'expression différentielle sont réalisées à l'aide de la fonction lmFit et du test t modéré de Bayes. Une sonde est signalée comme différentiellement exprimée si le ratio \log_2 est ≤ -1 ou ≥ 1 et si la valeur p corrigée est $\leq 0,05$. Le clustering CAST est réalisé par le logiciel MeV (Multi Experiment Viewer) avec un seuil d'affinité de 0,95 (Saeed et al., 2003).

6 Bibliographie

- Abouzeid S, Beutling U, Selmar D** (2019) Stress-induced modification of indole alkaloids: phytomodificines as a new category of specialized metabolites. *Phytochemistry* **159**: 102–107
- Acharya BR, Assmann SM** (2008) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology* **69**: 451–462
- Achuo EA, Prinsen E, Hofte M** (2006) Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology* **55**: 178–186
- Ácimović SG, Zeng Q, McGhee GC, Sundin GW, Wise JC** (2015) Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science* **6**: 16
- Ádám A, Nagy Z, Kátay G, Mergenthaler E, Viczián O** (2018) Signals of systemic immunity in plants: progress and open questions. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1146
- Adie B, Chico JM, Rubio-Somoza I, Solano R** (2007) Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 160–177
- Ahammed GJ, Li X, Zhou J, Zhou Y-H, Yu J-Q** (2016) Role of hormones in plant adaptation to heat stress. In GJ Ahammed, J-Q Yu, eds, *Plant hormones under challenging environmental factors*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 1–21
- Ahmed J, Hassan M** (2011) Evaluation of seedling proline content of wheat genotypes in relation to heat tolerance. *Bangladesh Journal of Botany* **40**: 17–22
- Aldon D, Mbengue M, Mazars C, Galaud JP** (2018) Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 665
- Alfonso M, Yruela I, Almarcegui S, Torrado E, Pérez MA, Picorel R** (2001) Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta* **212**: 573–582
- Ali AH, Abdelrahman M, El-Sayed MA** (2019) Alkaloid role in plant defense response to growth and stress. *Bioactive Molecules in Plant Defense*. Springer International Publishing, Cham, pp 145–158
- Almeselmani M, Deshmukh P, Sairam R** (2009) High temperature stress tolerance in wheat genotypes: Role of antioxidant defence enzymes. *Acta Agronomica Hungarica* **57**: 1–14
- Alves M, Dadalto S, Gonçalves A, de Souza G, Barros V, Fietto L** (2014) Transcription factor functional protein-protein interactions in plant defense responses. *Proteomes* **2**: 85–106
- Al-Whaibi MH** (2011) Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science* **23**: 139–150
- Amari K, Niehl A** (2020) Nucleic acid-mediated PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Virology* **42**: 32–39
- Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, Yadav RC** (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **19**: 307–321
- Amtmann A, Troufflard S, Armengaud P** (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* **133**: 682–691

- Andrews DL, Beames B, Summers MD, Park WD** (1988) Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochemical Journal* **252**: 199–206
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373–399
- Aravind L, Landsman D** (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research* **26**: 4413–4421
- Arnaud D, Hwang I** (2015) A sophisticated network of signaling pathways regulates stomatal defenses to bacterial pathogens. *Molecular Plant* **8**: 566–581
- Arora R, Kumar A, Singh IK, Singh A** (2020) Pathogenesis related proteins: a defensin for plants but an allergen for humans. *International Journal of Biological Macromolecules* **157**: 659–672
- Arruda P, Barreto P** (2020) Lysine catabolism through the saccharopine pathway: Enzymes and intermediates involved in plant responses to abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*. **11**: 587
- Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, et al** (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Current Biology* **18**: 1078–1083
- Asselin JE, Oh CS, Nissinen RM, Beer SV** (2006) The secretion of EopB from *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* **704**: 409–416
- Atkinson NJ, Urwin PE** (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3523–3543
- Attaran E, Zeier TE, Griebel T, Zeier J** (2009) Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 954–971
- Avin-Wittenberg T, Baluška F, Bozhkov PV, Elander PH, Fernie AR, Galili G, Hassan A, Hofius D, Isono E, Le Bars R, et al** (2018) Autophagy-related approaches for improving nutrient use efficiency and crop yield protection. *Journal of Experimental Botany* **69**: 1335–1353
- Ayouba A, Causse H, Van Damme EJM, Peumans WJ, Bourne Y, Cambillau C, Rougé P** (1994) Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochemical Systematics and Ecology* **22**: 153–159
- Ayouba A, Martin D, Rougé P** (1992) Recognition of muramic acid and N-acetylmuramic acid by Leguminosae lectins: possible role in plant-bacteria interactions. *FEMS Microbiology Letters* **92**: 41–46
- Azami-Sardoei 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
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A** (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 1118–1128
- Bajpai VK, Majumder R, Rather IA, Kim K** (2016) Extraction, isolation and purification of exopolysaccharide from lactic acid bacteria using ethanol precipitation method. *Bangladesh Journal of Pharmacology* **11**: 573
- Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J, Sakthivel N** (2012) Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters* **34**: 1983–1990

- Baldwin IT** (1988) Short-term damage-induced increases in tobacco alkaloids protect plants. *Oecologia* **75**: 367–370
- Balint-Kurti P** (2019) The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* **20**: 1163–1178
- Balzarini J, Neyts J, Schols D, Hosoya M, Van Damme E, Peumans W, De Clercq E** (1992) The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Research* **18**: 191–207
- Bandyopadhyay S, Roy A, Das S** (2001) Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Science* **161**: 1025–1033
- Barah P, Jayavelu ND, Mundy J, Bones AM** (2013) Genome scale transcriptional response diversity among ten ecotypes of *Arabidopsis thaliana* during heat stress. *Frontiers in Plant Science* **4**: 532
- Barny MA** (1995) *Erwinia amylovora* hrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 333–340
- Barragan AC, Weigel D** (2021) Plant NLR diversity: the known unknowns of pan-NLRomes. *The Plant Cell* **33**: 814–831
- Bartee L, Malagnac F, Bender J** (2001) *Arabidopsis* cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes & Development* **15**: 1753–1758
- Bastedo DP, Lo T, Laflamme B, Desveaux D, Guttman DS** (2019) Diversity and evolution of type III secreted effectors: a case study of three families. *Diversity and evolution of type III secreted effectors: a case study of three families*. Springer International Publishing, Cham, pp 201–230
- Bauer DF** (1972) Constructing confidence sets using rank statistics. *Journal of the American Statistical Association* **67**: 687–690
- Bauters L, Stojilković B, Gheysen G** (2021) Pathogens pulling the strings: effectors manipulating salicylic acid and phenylpropanoid biosynthesis in plants. *Molecular Plant Pathology* **22**: 1436–1448
- Baysal O, Turgut C, Mao G** (2005) Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia plantarum* **49**: 599–604
- Baysal Ö, Zeller W** (2004) Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to acibenzolar-S-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 305–315
- Beckers GJ, Conrath U** (2007) Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 425–431
- Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K** (1994) Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **16**: 290–296
- Bellemann P, Geider K** (1992) Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *Journal of General Microbiology* **138**: 931–940
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V** (2014) Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interaction. *Frontiers in Plant Science* **5**: 228

- Bénéjam J, Ravon E, Gaucher M, Brisset MN, Durel CE, Perchepied L** (2021) Acibenzolar-S-methyl and resistance quantitative trait loci complement each other to control apple scab and fire blight. *Plant Disease* **105**: 1702–1710
- Bengtsson M, Wulff E, Lyngs Jørgensen HJ, Pham A, Lübeck M, Hockenhull J** (2008) Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. *European Journal of Plant Pathology* **124**: 187–198
- Bereswill S, Jock S, Bellemann P, Geider K** (1998) Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lectin. *Plant Disease* **82**: 158–164
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov I, Bourne PE** (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Research* **28**: 235–242
- Bernadette L** (2016) Sur les sept premiers mois de la campagne 2015/2016, les exportations françaises de pommes vers l'Europe se redressent et tirent les cours à la hausse. *Agreste Conjoncture*
- Bernhard F, Coplin DL, Geider K** (1993) A gene cluster for amyovorin synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to cps genes in *Erwinia stewartii*. *Molecular and General Genetics* **239**: 158–168
- Berry MC, McGhee GC, Zhao Y, Sundin GW** (2009) Effect of awaaL mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Letters* **291**: 80–87
- Bhaduri D, Rakshit R, Chakraborty K** (2014) Primary and secondary nutrients-a boon to defense system against plant diseases. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* **5**: 461
- Bhandari DD, Lapin D, Kracher B, von Born P, Bautor J, Niefind K, Parker JE** (2019) An EDS1 heterodimer signalling surface enforces timely reprogramming of immunity genes in Arabidopsis. *Nature Communications*. **10**: 1–13
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J** (2009) Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 158–159
- Bi G, Su M, Li N, Liang Y, Dang S, Xu J, Hu M, Wang J, Zou M, Deng Y, et al** (2021) The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell* **184**: 3528-3541.e12
- Biari K el, Gaudioso Á, Fernández-Alonso MC, Jiménez-Barbero J, Cañada FJ** (2019) Peptidoglycan recognition by wheat germ agglutinin. A view by NMR. *Natural Product Communications* **14**: 1934578X1984924
- Bladergroen MR, Spaink HP** (1998) Genes and signal molecules involved in the rhizobia *Leguminosae* symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 353–359
- Blair A, Ritz B, Wesseling C, Beane Freeman L** (2014) Pesticides and human health. *Occupational and Environmental Medicine* **72**: 81–82
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 1–18
- Blommers LHM, Helsen HHM, Vaal FWNM** (2004) Life history data of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* (Pass.) (*Homopt.*, *Aphididae*) on plantain and as migrant to apple. *Journal of Pest Science* **77**: 155–163
- Bocsanczy AM, Nissinen RM, Oh C, Beer SV** (2008) HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Molecular Plant Pathology* **9**: 425–434

- Bocsanczy AM, Schneider DJ, DeClerck GA, Cartinhour S, Beer SV** (2012) HopX1 in *Erwinia amylovora* functions as an avirulence protein in apple and is regulated by HrpL. *Journal of Bacteriology* **194**: 553–560
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 519–546
- Bogdanove AJ, Bauer DW, Beer SV** (1998) *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. *Journal of Bacteriology* **180**: 2244–2247
- Bogs J, Bruchmüller I, Erbar C, Geider K** (1998) Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology* **88**: 416–421
- Bohlmann J, Keeling CI** (2008) Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal* **54**: 656–669
- Boisseau C, Moisan A, Père D, Rougé P** (1985) Immunocytochemical localization of the *Lathyrus ochrus* (L.) DC seed lectin in seeds and seedlings. *Plant Science* **42**: 25–34
- Bokszczanin K** (2013) Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in Plant Science* **4**: 315
- Bolognesi A, Bortolotti M, Maiello S, Battelli M, Polito L** (2016) Ribosome-inactivating proteins from plants: A historical overview. *Molecules* **21**: 1627
- Bolton MD** (2009) Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 487–497
- Boncan DAT, Tsang SSK, Li C, Lee IHT, Lam HM, Chan T-F, Hui JHL** (2020) Terpenes and terpenoids in plants: interactions with environment and insects. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 7382
- Bonfante P, Genre A** (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* **1**: 1–11
- Bonn WG, Zwet T van der** (2000) Distribution and economic importance of fire blight. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, pp 37–53
- Bouché N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H** (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 435–466
- Boulter D, Edwards GA, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Hilder VA** (1990) Additive protective effects of different plant-derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. *Crop Protection* **9**: 351–354
- Bureau T, ElMaarouf-Bouteau H, Garnier A, Brisset MN, Perino C, Pucheu I, Barny MA** (2006) DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 16–24
- Bureau T, Siamer S, Perino C, Gaubert S, Patrit O, Degrave A, Fagard M, Chevreau E, Barny MA** (2011) The HrpN effector of *Erwinia amylovora*, which is involved in type III translocation, contributes directly or indirectly to callose elicitation on apple leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 577–584
- Bourne Y, Ayouba A, Rougé P, Cambillau C** (1994) Interaction of a legume lectin with two components of the bacterial cell wall. A crystallographic study. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 9429–9435
- Bouwmeester K, de Sain M, Weide R, Gouget A, Klamer S, Canut H, Govers F** (2011) The lectin receptor kinase LecRK-I.9 is a novel *phytophthora* resistance component and a potential host target for a RXLR effector. *PLoS Pathogens*. **269**: e1001327
- Bowen J, Lay-Yee M, Plummer KIM, Ferguson IAN** (2002) The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells. *Journal of Plant Physiology* **159**: 599–606

- Boyko A, Blevins T, Yao Y, Golubov A, Bilichak A, Ilnytsky Y, Hollander J, Meins F, Kovalchuk I** (2010) Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS ONE* **5**: e9514
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254
- Bradshaw-Rouse JJ, Whatley MH, Coplin DL, Woods A, Sequeira L, Kelman A** (1981) Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a corn agglutinin: correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 344–350
- 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
- Breitenbach Barroso Coelho LC, Marcelino dos Santos Silva P, Felix de Oliveira W, de Moura MC, Viana Pontual E, Soares Gomes F, Guedes Paiva PM, Napoleão TH, dos Santos Correia MT** (2018) Lectins as antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology* **125**: 1238–1252
- Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP** (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 529–536
- Brodersen P, Petersen M, Bjørn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J** (2006) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* **47**: 532–546
- Broekaert WF, Marien W, Terras FRG, De Bolle MFC, Proost P, Van Damme J, Dillen L, Claeys M, Rees SB** (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* **31**: 4308–4314
- Broekaert WF, van Parijs J, Leyns F, Joos H, Peumans WJ** (1989) A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science* **245**: 1100–1102
- Broekaert WF, Terras Frg, Cammue Bpa, Osborn RW** (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology* **108**: 1353–1358
- Broggini GAL, Wöhner T, Fahrentrapp J, Kost TD, Flachowsky H, Peil A, Hanke M-V, Richter K, Patocchi A, Gessler C** (2014) Engineering fire blight resistance into the apple cultivar ‘Gala’ using the FB _ MR 5 CC-NBS-LRR resistance gene of *Malusx robusta* 5. *Plant Biotechnology Journal* **12**: 728–733
- Brown S** (2012) Apple. *Fruit Breeding*. Springer US, Boston, MA, pp 329–367
- Bugert P, Geider K** (1995) Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Molecular Microbiology* **15**: 917–933
- Burse A, Weingart H, Ullrich MS** (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 43–54
- Buszewicz D, Archacki R, Palusiński A, Kotliński M, Fogtman A, Iwanicka-Nowicka R, Sosnowska K, Kuciński J, Pupel P, Olędzki J, et al** (2016) HD2C histone deacetylase and a SWI/SNF chromatin remodelling complex interact and both are involved in mediating the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **39**: 2108–2122
- Butault JP, Dedryver CA, Gary C, Guichard L, Jacquet F, Meynard JM, Nicot P, Pitrat M, Reau R, Sauphanor B, et al** (2010) Synthèse du rapport d’étude Ecophyto R&D : quelles voies pour réduire l’usage des pesticides ? 1–90

- van Butselaar T, Van den Ackerveken G** (2020) Salicylic acid Steers the growth–immunity tradeoff. *Trends in Plant Science* **25**: 566–576
- Caarls L, Pieterse CMJ, Van Wees SCM** (2015) How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science* **6**: 170
- Cabrefiga J, Montesinos E** (2005) Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology* **95**: 1430–1437
- Calenge F, Drouet D, Denancé C, Van de Weg WE, Brisset MN, Paulin JP, Durel CE** (2005) Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics* **111**: 128–135
- Camejo D, Guzmán-Cedeño Á, Moreno A** (2016) Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* **103**: 10–23
- Canet JV, Dobón A, Roig A, Tornero P** (2010) Structure-function analysis of npr1 alleles in *Arabidopsis* reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1911–1922
- Canonne J, Froidure-Nicolas S, Rivas S** (2011) Phospholipases in action during plant defense signaling. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 13–18
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X** (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57–63
- Cao X, Aufsatz W, Zilberman D, Mette MF, Huang MS, Matzke M, Jacobsen SE** (2003) Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Current Biology* **13**: 2212–2217
- Cao Y, Song F, Goodman RM, Zheng Z** (2006) Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress. *Journal of Plant Physiology* **163**: 1167–1178
- Capinera JL** (2018) Direct and indirect effects of herbicides on insects. In NE Korres, NR Burgos, SO Duke, eds, *Weed Control*. CRC Press, Boca Raton, pp 76–91
- Carella P, Isaacs M, Cameron RK** (2014) Plasmodesmata-located protein overexpression negatively impacts the manifestation of systemic acquired resistance and the long-distance movement of Defective in Induced Resistance 1 in *Arabidopsis*. *Plant Biology* **17**: 395–401
- Casillo A, Ziaco M, Lindner B, Merino S, Mendoza-Barberá E, Tomás J, Corsaro M** (2017) Structural characterization of core region in *Erwinia amylovora* lipopolysaccharide. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 559
- Castro B, Citterico M, Kimura S, Stevens DM, Wrzaczek M, Coaker G** (2021) Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature Plants* **7**: 403–412
- Cavada BS, Osterne VJS, Lossio CF, Pinto-Junior VR, Oliveira MV, Silva MTL, Leal RB, Nascimento KS** (2019) One century of ConA and 40 years of ConBr research: a structural review. *International Journal of Biological Macromolecules* **134**: 901–911
- Cecchini NM, Steffes K, Schläppi MR, Gifford AN, Greenberg JT** (2015) *Arabidopsis* AZI1 family proteins mediate signal mobilization for systemic defence priming. *Nature Communications* **7658**: 1–12
- Celton J, Gaillard S, Bruneau M, Pelletier S, Aubourg S, Martin-Magniette M, Navarro L, Laurens F, Renou JP** (2014) Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control. *New Phytologist* **203**: 287–299

- Cesbron S, Paulin JP, Tharaud M, Barny MA, Brisset MN** (2006) The alternative σ factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under hrp-inducing conditions. *FEMS Microbiology Letters* **259**: 163–163
- Champigny MJ, Shearer H, Mohammad A, Haines K, Neumann M, Thilmoney R, He SY, Fobert P, Dengler N, Cameron RK** (2011) Localization of DIR1 at the tissue, cellular and subcellular levels during systemic acquired resistance in *Arabidopsis* using DIR1:GUS and DIR1:EGFP reporters. *BMC Plant Biology* **11**: 1–16
- Chanda B, Xia Y, Mandal MK, Yu K, Sekine K, Gao Q, Selote D, Hu Y, Stromberg A, Navarre D, et al** (2011) Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics* **43**: 421–427
- Chandran D, Rickert J, Huang Y, Steinwand MA, Marr SK, Wildermuth MC** (2014) Atypical E2F transcriptional repressor DEL1 acts at the intersection of plant growth and immunity by controlling the hormone salicylic acid. *Cell Host & Microbe* **15**: 506–513
- Chang T, Chen L, Chen S, Cai H, Liu X, Xiao G, Zhu Z** (1999) Transformation of tobacco with genes encoding *Helianthus tuberosus* agglutinin (HTA) confers resistance to peach-potato aphid (*Myzus persicae*). *Transgenic Research* **12**: 607–614
- Chapin FS III, Bloom AJ, Field CB, Waring RH** (1987) Plant Responses to multiple environmental factors. *BioScience* **37**: 49–57
- Chaturvedi R, Venables B, Petros RA, Nalam V, Li M, Wang X, Takemoto LJ, Shah J** (2012) An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *The Plant Journal* **71**: 161–172
- Checker VG, Kushwaha HR, Kumari P, Yadav S** (2018) Role of phytohormones in plant defense: signaling and cross talk. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Springer Singapore, Singapore, pp 159–184
- Chen J, Li M, Liu L, Chen G, Fu ZQ** (2021) ZAR1 resistosome and helper NLRs: Bringing in calcium and inducing cell death. *Molecular Plant* **14**: 1234–1236
- Chen L, Zhang L, Xiang S, Chen Y, Zhang H, Yu D** (2020) The transcription factor WRKY75 positively regulates jasmonate-mediated plant defense to necrotrophic fungal pathogens. *Journal of Experimental Botany* **72**: 1473–1489
- Chen L-J, Wuriyanghan H, Zhang Y-Q, Duan K-X, Chen H-W, Li Q-T, Lu X, He S-J, Ma B, Zhang W-K, et al** (2013) An S-domain receptor-like kinase, OsSIK2, confers abiotic stress tolerance and delays dark-induced leaf senescence in Rice. *Plant Physiology* **163**: 1752–1765
- Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN** (2007) *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 20131–20136
- Cheng C, Gao X, Feng B, Sheen J, Shan L, He P** (2013a) Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nature Communications*.
- Cheng X, Wu Y, Guo J, Du B, Chen R, Zhu L, He G** (2013b) A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. *The Plant Journal* **76**: 687–698
- Cheng Y, Li C, Hou J, Li Y, Jiang C, Ge Y** (2020) Mitogen-activated protein kinase cascade and reactive oxygen species metabolism are involved in acibenzolar-s-methyl-induced disease resistance in apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **68**: 10928–10936

- Chhajed S, Mostafa I, He Y, Abou-Hashem M, El-Domiaty M, Chen S** (2020) Glucosinolate biosynthesis and the glucosinolate–myrosinase system in plant defense. *Agronomy* **10**: 1786
- Chi WT, Fung RWM, Liu HC, Hsu CC, Charng YY** (2009) Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **32**: 917–927
- Chin D, Means AR** (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* **10**: 322–328
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500
- Chini A, Boter M, Solano R** (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS Journal* **276**: 4682–4692
- Chinnusamy V, Zhu JK** (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 133–139
- Chizzali C, Gaid MM, Belkheir AK, Hänsch R, Richter K, Flachowsky H, Peil A, Hanke MV, Liu B, Beerhues L** (2011) Differential expression of biphenyl synthase gene family members in fire-blight-infected apple “Holsteiner Cox.” *Plant Physiology* **158**: 864–875
- Chizzali C, Khalil MNA, Beuerle T, Schuehly W, Richter K, Flachowsky H, Peil A, Hanke MV, Liu B, Beerhues L** (2012) Formation of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins in the transition zones of fire blight-infected stems of *Malus domestica* cv. ‘Holsteiner Cox’ and *Pyrus communis* cv. ‘Conference’. *Phytochemistry* **77**: 179–185
- Christensen AB, Cho BH, Naesby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* **3**: 135–144
- Chye ML, Zhao KJ, He ZM, Ramalingam S, Fung KL** (2004) An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta* **220**: 717–730
- Ciopraga J, Gozia O, Tudor R, Brezuica L, Doyle RJ** (1999) *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1428**: 424–432
- Cisneros FH, Barnes MM** (1974) Contribution to the biological and ecological characterization of apple and walnut host races of codling moth, *Laspeyresia pomonella* (L.): moth longevity and oviposition capacity. *Environmental Entomology* **3**: 402–406
- Clarke SM, Mur LAJ, Wood JE, Scott IM** (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **38**: 432–447
- Cohen SP, Liu H, Argueso CT, Pereira A, Vera Cruz C, Verdier V, Leach JE** (2017) RNA-Seq analysis reveals insight into enhanced rice *Xa7*-mediated bacterial blight resistance at high temperature. *PLOS ONE* **12**: e0187625
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE** (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**: 215–219
- Coll NS, Eppele P, Dangl JL** (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation* **18**: 1247–1256
- Conrath U** (2006) Systemic Acquired Resistance. *Plant Signaling & Behavior* **1**: 179–184
- Cornille A, Giraud T, Smulders MJM, Roldán-Ruiz I, Gladioux P** (2014) The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends in Genetics* **30**: 57–65

- Correia B, Valledor L, Meijón M, Rodríguez JL, Dias MC, Santos C, Cañal MJ, Rodríguez R, Pinto G** (2013) Is the interplay between epigenetic markers related to the acclimation of cork oak plants to high temperatures? *PLoS ONE* **8**: e53543
- Cortijo S, Charoensawan V, Brestovitsky A, Buning R, Ravarani C, Rhodes D, van Noort J, Jaeger KE, Wigge PA** (2017) Transcriptional regulation of the ambient temperature response by H2A. Z nucleosomes and HSF1 transcription factors in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **10**: 1258–1273
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 850–861
- Couto D, Zipfel C** (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology* **16**: 537–552
- Crawford AJ, McLachlan DH, Hetherington AM, Franklin KA** (2012) High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Current Biology* **22**: R396–R397
- Custers JHHV, Harrison SJ, Sela-Buurlage MB, van Deventer E, Lageweg W, Howe PW, van der Meijs PJ, Ponstein AS, Simons BH, Melchers LS, et al** (2004) Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *The Plant Journal* **39**: 147–160
- Czapla TH, Lang BA** (1990) Effect of plant lectins on the larval development of european corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) and southern corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *Journal of Economic Entomology* **83**: 2480–2485
- Daccord N, Celton JM, Linsmith G, Becker C, Choisne N, Schijlen E, van de Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, et al** (2017) High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics* **49**: 1099–1106
- Damico DCS, Freire MGM, Gomes VM, Toyama MH, Marangoni S, Novello JC, Macedo MLR** (2003) Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds. *Journal of Protein Chemistry* **22**: 655–661
- Dang L, Rougé P, Van Damme EJM** (2017) Amaranthin-like proteins with aerolysin domains in plants. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1368
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833
- Daniel R, Guest D** (2005) Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**: 194–201
- Dann E, Diers B, Byrum J, Hammerschmidt R** (1998) Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 271–278
- David BV, Chandrasehar G, Selvam PN** (2018) *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops. *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. Elsevier, pp 221–243
- De Schutter K, Joubès J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babychuk E, Van Der Schueren E, Beeckman T, Kushnir S, Inzé D, et al** (2007) *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *The Plant Cell* **19**: 211–225
- DebRoy S, Thilmony R, Kwack YB, Nomura K, He SY** (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 9927–9932

- Degrave A, Moreau M, Launay A, Barny MA, Brisset MN, Patrit O, Taconnat L, Vedel R, Fagard M** (2013) The bacterial effector DspA/E is toxic in *Arabidopsis thaliana* and is required for multiplication and survival of fire blight pathogen. *Molecular Plant Pathology* **14**: 506–517
- Degrave A, Siamer S, Boureau T, Barny MA** (2015) The AvrE superfamily: ancestral type III effectors involved in suppression of pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Molecular Plant Pathology* **16**: 899–905
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, et al** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247–1250
- Delannoy E, Lyon BR, Marmey P, Jalloul A, Daniel JF, Montillet JL, Essenberg M, Nicole M** (2005) Resistance of Cotton Towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 63–82
- Dellagi A, Brisset MN, Paulin JP, Expert D** (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 734–742
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 13454–13459
- Denancé N, Ranocha P, Oria N, Barlet X, Rivière MP, Yadeta KA, Hoffmann L, Perreau F, Clément G, Maia-Grondard A, et al** (2012) *Arabidopsis* wat1 (walls are thin1)-mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross-regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *The Plant Journal* **73**: 225–239
- Denancé N, Szurek B, Noël LD** (2014) Emerging functions of nodulin-like proteins in non-nodulating plant species. *Plant and Cell Physiology* **55**: 469–474
- Depuydt S, Trenkamp S, Fernie AR, Elftieh S, Renou JP, Vuylsteke M, Holsters M, Vereecke D** (2008) An integrated genomics approach to define niche establishment by *Rhodococcus fascians*. *Plant Physiology* **149**: 1366–1386
- Desaint H, Aoun N, Deslandes L, Vaillau F, Roux F, Berthomé R** (2020) Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress. *New Phytologist* **229**: 712–734
- Desikan R, Horák J, Chaban C, Mira-Rodado V, Witthöft J, Elgass K, Grefen C, Cheung MK, Meixner AJ, Hooley R, et al** (2008) The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. *PLoS ONE* **3**: e2491
- Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG** (2007) WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 1789–1801
- Dias R, Machado L, Migliolo L, Franco O** (2015) Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules* **20**: 519–541
- Dietrich R, Ploss K, Heil M** (2004) Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* **27**: 896–906
- DiLeo MV, Pye MF, Roubtsova TV, Duniway JM, MacDonald JD, Rizzo DM, Bostock RM** (2010) Abscisic acid in salt stress predisposition to *Phytophthora* root and crown rot in tomato and *Chrysanthemum*. *Phytopathology* **100**: 871–879

- Ding P, Rekhter D, Ding Y, Feussner K, Busta L, Haroth S, Xu S, Li X, Jetter R, Feussner I, et al** (2016) Characterization of a pipecolic acid biosynthesis pathway required for systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **28**: 2603–2615
- Ding Y, Sun T, Ao K, Peng Y, Zhang Y, Li X, Zhang Y** (2018) Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell* **173**: 1454-1467.e15
- Distéfano AM, López GA, Setzes N, Marchetti F, Cainzos M, Cascallares M, Zabaleta E, Pagnussat GC** (2020) Ferroptosis in plants: triggers, proposed mechanisms, and the role of iron in modulating cell death. *Journal of Experimental Botany* **72**: 2125–2135
- Dixon RA, Barros J** (2019) Lignin biosynthesis: old roads revisited and new roads explored. *Open Biology* **9**: 190215
- Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG** (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist* **183**: 993–1000
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548
- Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA** (2004) PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research* **32**: W665–W667
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV** (1999) Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *The Plant Journal* **20**: 207–215
- Dongus JA, Parker JE** (2021) EDS1 signalling: At the nexus of intracellular and surface receptor immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102039
- Dorey S, Baillieux F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S** (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 646–655
- D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D** (2004) Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant–pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1696**: 237–244
- Dow K, Downing TE** (2016) *The atlas of climate change*. University of California Press
- Down RE, Gatehouse AMR, Hamilton WDO, Gatehouse JA** (1996) Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. *Journal of Insect Physiology* **42**: 1035–1045
- Dröge-Laser W, Snoek BL, Snel B, Weiste C** (2018) The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family — an update. *Current Opinion in Plant Biology* **45**: 36–49
- Dugé De Bernonville T, Gaucher M, Flors V, Gaillard S, Paulin JP, Dat JF, Brisset MN** (2012) T3SS-dependent differential modulations of the jasmonic acid pathway in susceptible and resistant genotypes of *Malus spp.* challenged with *Erwinia amylovora*. *Plant Science* **188–189**: 1–9
- Dugé de Bernonville TD de, Gaucher M, Guyot S, Durel CE, Dat JF, Brisset MN** (2011) The constitutive phenolic composition of two *Malus domestica* genotypes is not responsible for their contrasted susceptibilities to fire blight. *Environmental and Experimental Botany* **74**: 65–73

- Dugé de Bernonville T, Marolleau B, Staub J, Gaucher M, Brisset MN** (2014) Using molecular tools to decipher the complex world of plant resistance inducers: an apple case study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 11403–11411
- Dunaevskii YaE, Tsybina TA, Belyakova GA, Domash VI, Sharpio TP, Zabreiko SA, Belozerskii MA** (2005) Proteinase inhibitors as antistress proteins in higher plants. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**: 344–348
- Dunwell JM, Gibbings JG, Mahmood T, Saqlan Naqvi SM** (2008) Germin and germin-like proteins: evolution, structure, and function. *Critical Reviews in Plant Sciences* **27**: 342–375
- Durel CE, Denancé C, Brisset MN** (2009) Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821. *Genome* **52**: 139–147
- Dutta I, Majumder P, Saha P, Ray K, Das S** (2005a) Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). *Plant Science* **169**: 996–1007
- Dutta I, Saha P, Majumder P, Sarkar A, Chakraborti D, Banerjee S, Das S** (2005b) The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 601–611
- Dutta K, Sen S, Veeranki VD** (2009) Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry* **44**: 127–134
- Duvick JP, Sequeira L** (1984) Interaction of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide with agglutinin from potato tubers. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 192–198
- Edelman GM, Cunningham BA, Reeke GN, Becker JW, Waxdal MJ, Wang JL** (1972) The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **69**: 2580–2584
- Einhoff W, Fleischman G, Freier T, Kummer H, Rüdiger H** (1986) Interaction of leguminous seed lectins with seed proteins-lectins as packing aids of storage proteins. In TC Bøg-Hansen, E van Driessche, eds, *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*. De Gruyter, Berlin, pp 45–52
- Einhoff W, Rüdiger H** (1986) Interaction of the α -mannosidase from *Canavalia ensiformis* with the lectin from the same plant, concanavalin A. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **367**: 943–949
- Eisemann CH, Donaldson RA, Pearson RD, Cadogan LC, Vuocolo T, Tellam RL** (1994) Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **72**: 1–10
- El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F** (2010) Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs* **8**: 968–987
- Elad Y, Pertot I** (2014) Climate change impacts on plant pathogens and plant diseases. *Journal of Crop Improvement* **28**: 99–139
- Elfstrand M** (1898) Über blutkörperchenagglutinierende Eiweiße. *Görberdorfer Veröffentlichungen a. Band I*. pp 1–159
- Engelhardt S, Lee J, Gäbler Y, Kemmerling B, Haapalainen M-L, Li C-M, Wei Z, Keller H, Joosten M, Taira S, et al** (2009) Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity. *The Plant Journal* **57**: 706–717

- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I** (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 2480–2484
- Erb M, Kliebenstein DJ** (2020) Plant secondary metabolites as defenses, regulators and primary metabolites - The blurred functional trichotomy. *Plant Physiology* **184**: 39–52
- Eschen-Lippold L, Jiang X, Elmore JM, Mackey D, Shan L, Coaker G, Scheel D, Lee J** (2016) Bacterial AvrRpt2-Like cysteine proteases block activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases, MPK4 and MPK11. *Plant Physiology* **171**: 2223–2238
- Evenson RE, Gollin D** (2003) Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science* **300**: 758–762
- Fahrentrapp J, Broggin GAL, Gessler C, Kellerhals M, Peil A, Malnoy M, Richter K** (2013) Fine mapping of the fire blight resistance locus in *Malus x Robusta* 5 on linkage group 3. *Acta Horticulturae* 499–500
- Faize M, Faize L, Ishii H** (2009) Gene expression during acibenzolar-S-methyl-induced priming for potentiated responses to *Venturia nashicola* in Japanese pear. *Journal of Phytopathology* **157**: 137–144
- Falcone DL, Ogas JP, Somerville CR** (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology* **4**: 1–15
- Farmer EE, Johnson RR, Ryan CA** (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* **98**: 995–1002
- Fatima U, Senthil-Kumar M** (2015) Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science* **6**: 750
- Ferguson IB, Snelgar W, Lay-Yee M, Watkins CB, Bowen JH** (1998) Expression of heat shock protein genes in apple fruit in the field. *Functional Plant Biology* **25**: 155
- Fernández V, Guzmán-Delgado P, Graça J, Santos S, Gil L** (2016) Cuticle structure in relation to chemical composition: re-assessing the prevailing model. *Frontiers in Plant Science* **7**: 427
- Ferrer J-L, Austin MB, Stewart C Jr, Noel JP** (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 356–370
- Fich EA, Segerson NA, Rose JKC** (2016) The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological roles. *Annual Review of Plant Biology* **67**: 207–233
- Finka A, Cuendet AFH, Maathuis FJM, Saidi Y, Goloubinoff P** (2012) Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *The Plant Cell* **24**: 3333–3348
- Flaishman MA, Peles Y, Dahan Y, Milo-Cochavi S, Frieman A, Naor A** (2015) Differential response of cell-cycle and cell-expansion regulators to heat stress in apple (*Malus domestica*) fruitlets. *Plant Science* **233**: 82–94
- Flor HH** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275–296
- Foreman J, Johansson H, Hornitschek P, Josse E-M, Fankhauser C, Halliday KJ** (2010) Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. *The Plant Journal* **65**: 441–452
- Francis F, Chen J, Yong L, Bosquee E** (2020) Aphid feeding on plant lectins falling virus transmission rates: a multicase study. *Journal of Economic Entomology* **113**: 1635–1639
- Frasch CE** (1980) Role of lipopolysaccharide in wheat germ agglutinin-mediated agglutination of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology* **12**: 498–501

- Frederickson Matika DE, Loake GJ** (2014) Redox regulation in plant immune function. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**: 1373–1388
- Freier T, Rüdiger H** (1987) In vivo binding partners of the *Lens culinaris* lectin. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **368**: 1215–1224
- Frenzel A, Manthey K, Perlick AM, Meyer F, Pühler A, Küster H, Krajinski F** (2005) Combined transcriptome profiling reveals a novel family of arbuscular mycorrhizal-specific *Medicago truncatula* lectin genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 771–782
- Frenzel A, Tiller N, Hause B, Krajinski F** (2006) The conserved arbuscular mycorrhiza-specific transcription of the secretory lectin MtLec 5 is mediated by a short upstream sequence containing specific protein binding sites. *Planta* **224**: 792–800
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, et al** (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228–232
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754–756
- Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, De Lorenzo G, Ferrari S** (2008) The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **148**: 1695–1706
- Gangappa SN, Berriri S, Kumar SV** (2017) PIF4 coordinates thermosensory growth and immunity in *Arabidopsis*. *Current Biology* **27**: 243–249
- Gantulga D, Ahn YO, Zhou C, Battogtokh D, Bevan DR, Winkel BSJ, Esen A** (2009) Comparative characterization of the *Arabidopsis* subfamily a1 β -galactosidases. *Phytochemistry* **70**: 1999–2009
- Gao G, Li J, Li H, Li F, Xu K, Yan G, Chen B, Qiao J, Wu X** (2014) Comparison of the heat stress induced variations in DNA methylation between heat-tolerant and heat-sensitive rapeseed seedlings. *Breeding Science* **64**: 125–133
- Gao H, Guo M, Song J, Ma Y, Xu Z** (2021) Signals in systemic acquired resistance of plants against microbial pathogens. *Molecular Biology Reports* **48**: 3747–3759
- Gao QM, Venugopal S, Navarre D, Kachroo A** (2010) Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. *Plant Physiology* **155**: 464–476
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A** (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 711–724
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M** (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* **3**: 72–74
- Gatehouse AMR, Davison GM, N. Stewart J, Gatehouse LN, Kumar A, Geoghegan IE, Birch ANE, Gatehouse JA** (1999) Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. *Molecular Breeding* **5**: 153–165
- Gatehouse AMR, Davison GM, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Burgess EPJ, Gilbert RJC, Gatehouse JA** (1997) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Molecular Breeding* **3**: 49–63

- Gaucher M** (2012) Identification par approches comparatives de facteurs moléculaires associés à la résistance ou à la sensibilité du Pommier (*Malus x domestica*) à *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien. Thèse de doctorat. Université d'Angers. 1–313
- Gaucher M, Dugé de Bernonville T, Guyot S, Dat JF, Brisset MN** (2013a) Same ammo, different weapons: Enzymatic extracts from two apple genotypes with contrasted susceptibilities to fire blight (*Erwinia amylovora*) differentially convert phloridzin and phloretin in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry* **72**: 178–189
- Gaucher M, Dugé de Bernonville T, Lohou D, Guyot S, Guillemette T, Brisset MN, Dat JF** (2013b) Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry* **90**: 78–89
- Gaudriault S, Malandrin L, Paulin J -p., Barny MA.** (1997) DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Molecular Microbiology* **26**: 1057–1069
- Gaudriault S, Paulin JP, Barny MA** (2002) The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor. *Molecular Plant Pathology* **3**: 313–320
- Gavnholt B, Larsen K** (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiologia Plantarum* **116**: 273–280
- Geider K** (2000) Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, pp 117–140
- Geier G, Geider K** (1993) Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**: 387–404
- Gent DH, Schwartz HF** (2005) Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. *Plant Disease* **89**: 631–639
- Ghahremani M, Tran H, Biglou SG, O'Gallagher B, She Y, Plaxton WC** (2019) A glycoform of the secreted purple acid phosphatase AtPAP26 co-purifies with a mannose-binding lectin (AtGAL1) upregulated by phosphate-starved *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **42**: 1139–1157
- Gifford DJ, Greenwood JS, Bewley JD** (1983) Vacuolation and storage protein breakdown in the castor bean endosperm following imbibition. *Journal of Experimental Botany* **34**: 1433–1443
- Gilardoni PA, Hettenhausen C, Baldwin IT, Bonaventure G** (2011) *Nicotiana attenuata* LECTIN RECEPTOR KINASE1 suppresses the insect-mediated inhibition of induced defense responses during *Manduca sexta* herbivory. *The Plant Cell* **23**: 3512–3532
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernández-Barbero G, Chini A, Rathjen JP, Solano R** (2014) The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* **12**: e1001792
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Ortigosa A, García-Casado G, Chini A, Lewsey MG, Ecker JR, Ntoukakis V, Solano R** (2016) JAZ 2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist* **213**: 1378–1392
- Giorno F, Guerriero G, Baric S, Mariani C** (2012) Heat shock transcriptional factors in *Malus domestica*: identification, classification and expression analysis. *BMC Genomics* **13**: 639

- Göhre V, Robatzek S** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 189–215
- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**: 277–284
- Goodwin SM, Jenks MA** (2005) Plant Cuticle Function as a Barrier to Water Loss. In MA Jenks, PM Hasegawa, eds, *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 14–36
- Gornall J, Betts R, Burke E, Clark R, Camp J, Willett K, Wiltshire A** (2010) Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**: 2973–2989
- Gouhier-Darimont C, Stahl E, Glauser G, Reymond P** (2019) The *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-I.8 is involved in insect egg perception. *Frontiers in Plant Science* **10**: 623
- Goujon T, Minic Z, El Amrani A, Lerouxel O, Aletti E, Lapierre C, Joseleau JP, Jouanin L** (2003) AtBXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. *The Plant Journal* **33**: 677–690
- Gould F, Brown ZS, Kuzma J** (2018) Wicked evolution: Can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance? *Science* **360**: 728–732
- Gozzo F, Faoro F** (2013) Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 12473–12491
- Grant MR, Jones JDG** (2009) Hormone (dis) harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**: 750–752
- Graves JD, Krebs EG** (1999) Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics* **82**: 111–121
- Greer DH** (2015) Temperature-dependent responses of the photosynthetic and chlorophyll fluorescence attributes of apple (*Malus domestica*) leaves during a sustained high temperature event. *Plant Physiology and Biochemistry* **97**: 139–146
- Gross M, Geier G, Rudolph K, Geider K** (1992) Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **40**: 371–381
- Guan Y, Ramalingam S, Nagegowda D, Taylor PWJ, Chye ML** (2008) *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and agglutinates Gram-negative bacteria. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3475–3484
- Guichard L, Dedieu F, Jeuffroy MH, Meynard J-M, Reau R, Savini I** (2017) Le plan Ecophyto de réduction d'usage des pesticides en France : décryptage d'un échec et raisons d'espérer. *Cahiers Agricultures* **26**: 14002
- Gullner G, Komives T, Király L, Schröder P** (2018) Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1836
- Guo HN, Jia YT, Zhou YG, Zhang Z-S, Ouyang Q, Jiang Y, Tian YC** (2004) Effects of transgenic tobacco plants expressing ACA gene from *Amaranthus caudatus* on the population development of *Myzus persicae*. *Acta Botanica Sinica - English Edition* **46**: 1100–1104
- Guo M, Liu JH, Ma X, Luo DX, Gong ZH, Lu MH** (2016) The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **7**: 114

- Guo P, Li Z, Huang P, Li B, Fang S, Chu J, Guo H** (2017) A tripartite amplification loop involving the transcription factor WRKY75, salicylic acid, and reactive oxygen species accelerates leaf senescence. *The Plant Cell* **29**: 2854–2870
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Götz F, Glawischmig E, Lee J, Felix G, et al** (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 32338–32348
- Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ, Gomez-Lim MA** (1999) The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology* **17**: 1223–1226
- Hale CJ, Potok ME, Lopez J, Do T, Liu A, Gallego-Bartolome J, Michaels SD, Jacobsen SE** (2016) Identification of multiple proteins coupling transcriptional gene silencing to genome stability in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* **12**: e1006092
- Halkier BA, Gershenzon J** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 303–333
- Hammoudi V, Fokkens L, Beerens B, Vlachakis G, Chatterjee S, Arroyo-Mateos M, Wackers PFK, Jonker MJ, van den Burg HA** (2018) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 mediates the temperature dependent trade-off between plant immunity and growth. *PLOS Genetics* **14**: e1007157
- Haq SK, Atif SM, Khan RH** (2004) Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **431**: 145–159
- Hardman KD, Ainsworth CF** (1972) Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **11**: 4910–4915
- Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H** (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology* **153**: 384–395
- Haroth S, Feussner K, Kelly AA, Zienkiewicz K, Shaikhqasem A, Herrfurth C, Feussner I** (2019) The glycosyltransferase UGT76E1 significantly contributes to 12-O-glucopyranosyl-jasmonic acid formation in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Biological Chemistry* **294**: 9858–9872
- Hartmann M, Kim D, Bernsdorff F, Ajami-Rashidi Z, Scholten N, Schreiber S, Zeier T, Schuck S, Reichel-Deland V, Zeier J** (2017) Biochemical principles and functional aspects of pipecolic acid biosynthesis in plant immunity. *Plant Physiology* **174**: 124–153
- Hartmann M, Zeier J** (2018) L-lysine metabolism to N-hydroxypipecolic acid: an integral immune-activating pathway in plants. *The Plant Journal* **96**: 5–21
- Hartmann M, Zeier J** (2019) N-hydroxypipecolic acid and salicylic acid: a metabolic duo for systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 44–57
- Hartmann M, Zeier T, Bernsdorff F, Reichel-Deland V, Kim D, Hohmann M, Scholten N, Schuck S, Bräutigam A, Hölzel T, et al** (2018) Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipecolic acid is a critical element of plant systemic immunity. *Cell* **173**: 456-469.e16
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam Md, Roychowdhury R, Fujita M** (2013) Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 9643–9684
- Hauck P, Thilmoney R, He SY** (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 8577–8582

- Hawkins NJ, Bass C, Dixon A, Neve P** (2018) The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews* **94**: 135–155
- Heidel AJ, Clarke JD, Antonovics J, Dong X** (2004) Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **168**: 2197–2206
- Heil M, Hilpert A, Kaiser W, Linsenmair KE** (2000) Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *Journal of Ecology* **88**: 645–654
- Hématy K, Cherk C, Somerville S** (2009) Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 406–413
- Heredia A** (2003) Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1620**: 1–7
- Herlihy JH, Long TA, McDowell JM** (2020) Iron homeostasis and plant immune responses: Recent insights and translational implications. *Journal of Biological Chemistry* **295**: 13444–13457
- Higashi Y, Saito K** (2019) Lipidomic studies of membrane glycerolipids in plant leaves under heat stress. *Progress in Lipid Research* **75**: 100990
- Hijwegen T, Verhaar MA** (1995) Effects of cucumber genotype on the induction of resistance to powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, by 2, 6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Pathology* **44**: 756–762
- Hilder VA, Powell KS, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Gatehouse LN, Shi Y, Hamilton WDO, Merryweather A, Newell CA, Timans JC, et al** (1995) Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research* **4**: 18–25
- Hirsch CD, Springer NM** (2017) Transposable element influences on gene expression in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1860**: 157–165
- Hoffland E, Jeger MJ, van Beusichem ML** (2000) Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant and Soil* **218**: 239–247
- Hofmann NR** (2009) The plasma membrane as first responder to heat stress. *The Plant Cell* **21**: 2544–2544
- Hogenhout SA, Bos JI** (2011) Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 422–428
- Hollander M, Wolfe DA, Chicken E** (2013) *Nonparametric statistical methods*. John Wiley & Sons
- van der Hoorn RA, Jones JD** (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 400–407
- van der Hoorn RAL, Kamoun S** (2008) From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* **20**: 2009–2017
- Horváth V, Merenciano M, González J** (2017) Revisiting the relationship between transposable elements and the eukaryotic stress response. *Trends in Genetics* **33**: 832–841
- Hoson T, Wakabayashi K** (2015) Role of the plant cell wall in gravity resistance. *Phytochemistry* **112**: 84–90
- Hou H, Zhao L, Zheng X, Gautam M, Yue M, Hou J, Chen Z, Wang P, Li L** (2019) Dynamic changes in histone modification are associated with upregulation of Hsf and rRNA genes during heat stress in maize seedlings. *Protoplasma* **256**: 1245–1256
- Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N, Little A** (2016) The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **7**: 984

- Hu Z, Song N, Zheng M, Liu X, Liu Z, Xing J, Ma J, Guo W, Yao Y, Peng H, et al** (2015) Histone acetyltransferase GCN 5 is essential for heat stress-responsive gene activation and thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **84**: 1178–1191
- Huang J, Sun Y, Orduna AR, Jetter R, Li X** (2019) The Mediator kinase module serves as a positive regulator of salicylic acid accumulation and systemic acquired resistance. *The Plant Journal* **98**: 842–852
- Huang PY, Huang J-S, Goodman RN** (1975) Resistance mechanisms of apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora*. *Physiological Plant Pathology* **6**: 283–287
- Huang PY, Yeh Y-H, Liu AC, Cheng C-P, Zimmerli L** (2014) The *Arabidopsis* LecRK-VI.2 associates with the pattern-recognition receptor FLS2 and primes *Nicotiana benthamiana* pattern-triggered immunity. *The Plant Journal* **79**: 243–255
- Huang X, Zhu G, Liu Q, Chen L, Li Y, Hou B** (2018) Modulation of plant salicylic acid-associated immune responses via glycosylation of dihydroxybenzoic acids. *Plant Physiology* **176**: 3103–3119
- Huber DM, Jones JB** (2012) The role of magnesium in plant disease. *Plant and Soil* **368**: 73–85
- Huesing JE, Murdock LL, Shade RE** (1991) Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. *Phytochemistry* **30**: 785–788
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA** (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 10098–10103
- Huo L, Sun X, Guo Z, Jia X, Che R, Sun Y, Zhu Y, Wang P, Gong X, Ma F** (2020) MdATG18a overexpression improves basal thermotolerance in transgenic apple by decreasing damage to chloroplasts. *Horticulture Research* **7**: 1–15
- Huot B, Castroverde CDM, Velásquez AC, Hubbard E, Pulman JA, Yao J, Childs KL, Tsuda K, Montgomery BL, He SY** (2017) Dual impact of elevated temperature on plant defence and bacterial virulence in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **8**: 1–12
- Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY** (2014) Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**: 1267–1287
- Hurkman WJ, Tanaka CK** (2007) Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. *Journal of Chromatography B* **849**: 344–350
- Hurley B, Lee D, Mott A, Wilton M, Liu J, Liu YC, Angers S, Coaker G, Guttman DS, Desveaux D** (2014) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* stomatal immunity. *PLoS ONE* **9**: e114921
- Iakimova ET, Sobiczewski P, Michalczyk L, Węgrzynowicz-Lesiak E, Mikiciński A, Woltering EJ** (2013) Morphological and biochemical characterization of *Erwinia amylovora*-induced hypersensitive cell death in apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **63**: 292–305
- Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K** (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 36969–36976
- Isaacs M, Carella P, Faubert J, Champigny MJ, Rose JKC, Cameron RK** (2016) Orthology analysis and in vivo complementation studies to elucidate the role of DIR1 during systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* and *Cucumis sativus*. *Frontiers in Plant Science* **7**: 566
- Ito H, Gaubert H, Bucher E, Mirouze M, Vaillant I, Paszkowski J** (2011) An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* **472**: 115–119

- Iwata Y, Koizumi N** (2012) Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends in Plant Science* **17**: 720–727
- Jacob P, Hirt H, Bendahmane A** (2017) The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 405–414
- Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE, Michaels SD** (2009) ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**: 763–768
- Jacob Y, Stroud H, LeBlanc C, Feng S, Zhuo L, Caro E, Hassel C, Gutierrez C, Michaels SD, Jacobsen SE** (2010) Regulation of heterochromatic DNA replication by histone H3 lysine 27 methyltransferases. *Nature* **466**: 987–991
- Jain D, Khurana JP** (2018) Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular aspects of plant-pathogen interaction. Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Springer Singapore, Singapore, pp 265–281
- Jain S, Kumar D, Jain M, Chaudhary P, Deswal R, Sarin NB** (2011) Ectopic overexpression of a salt stress-induced pathogenesis-related class 10 protein (PR10) gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) affords broad spectrum abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **109**: 19–31
- Janda M, Lamparová L, Zubíková A, Burketová L, Martinec J, Krčková Z** (2019) Temporary heat stress suppresses PAMP-triggered immunity and resistance to bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **20**: 1005–1012
- Jang H, Matthews KR** (2018) Influence of surface polysaccharides of *Escherichia coli* O157:H7 on plant defense response and survival of the human enteric pathogen on *Arabidopsis thaliana* and lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Microbiology* **70**: 254–261
- Jaskiewicz M, Conrath U, Peterhänsel C** (2010) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO reports* **12**: 50–55
- Jehandet P, Delaunois B, Conreux A, Donnez D, Nuzzo V, Cordelier S, Clément C, Courrot E** (2010) Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors* **36**: 331–341
- Ji C, Kuć J** (1996) Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**: 257–265
- Ji H, Dong H** (2015) Key steps in type III secretion system (T3SS) towards translocon assembly with potential sensor at plant plasma membrane. *Molecular Plant Pathology* **16**: 762–773
- Jiang S, Yao J, Ma KW, Zhou H, Song J, He SY, Ma W** (2013) Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathogens* **9**: e1003715
- Jijakli MH, Lepoivre P** (2004) State of the Art and Challenges of Post-harvest Disease Management in Apples. *Fruit and Vegetable Diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 59–94
- Johnson KB, Stockwell VO** (2000) Biological control of fire blight. *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, pp 319–337
- Johnson KL, Jones BJ, Bacic A, Schultz CJ** (2003) The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology* **133**: 1911–1925
- Jones AL, Schnabel EL** (2000) The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, pp 235–251

- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- de Jong CF, Takken FLW, Cai X, de Wit PJGM, Joosten MHAJ** (2002) Attenuation of Cf-mediated defense responses at elevated temperatures correlates with a decrease in elicitor-binding sites. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 1040–1049
- Ju C, Yoon GM, Shemansky JM, Lin DY, Ying ZI, Chang J, Garrett WM, Kessenbrock M, Groth G, Tucker ML, et al** (2012) CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 19486–19491
- Jubic LM, Saile S, Furzer OJ, El Kasmi F, Dangl JL** (2019) Help wanted: helper NLRs and plant immune responses. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 82–94
- Juge N** (2006) Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* **11**: 359–367
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT** (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**: 89–91
- Jung JH, Domijan M, Klose C, Biswas S, Ezer D, Gao M, Khattak AK, Box MS, Charoensawan V, Cortijo S, et al** (2016) Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science* **354**: 886–889
- Kadota Y, Liebrand TWH, Goto Y, Sklenar J, Derbyshire P, Menke FLH, Torres M, Molina A, Zipfel C, Coaker G, et al** (2018) Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector- and PAMP-triggered immunity in plants. *New Phytologist* **221**: 2160–2175
- Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C** (2015) Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant and Cell Physiology* **56**: 1472–1480
- Kalyar T, Rauf S, Teixeira da Silva JA, Iqbal Z** (2013) Variation in leaf orientation and its related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) breeding populations under high temperature. *Field Crops Research* **150**: 91–98
- Kamberger W** (1979) An Ouchterlony double diffusion study on the interaction between legume lectins and rhizobial cell surface antigens. *Archives of Microbiology* **121**: 83–90
- Kang L, Li J, Zhao T, Xiao F, Tang X, Thilmony R, He S, Zhou JM** (2003) Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene NHO1 with bacterial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 3519–3524
- Kanrar S, Venkateswari J, Kirti P, Chopra V** (2002) Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). *Plant Cell Reports* **20**: 976–981
- Kanzaki H, Saitoh H, Takahashi Y, Berberich T, Ito A, Kamoun S, Terauchi R** (2008) NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta* **228**: 977–987
- Karabourniotis G, Liakopoulos G** (2005) Phenolic compounds in plant cuticles : physiological and ecological aspects. In A Hemantaranjan, ed, *Advances in Plant Physiology* (Vol. 8). Scientific Publishers, Jodhpur, India, pp 33–47
- Karasov TL, Shirsekar G, Schwab R, Weigel D** (2020) What natural variation can teach us about resistance durability. *Current Opinion in Plant Biology* **56**: 89–98
- Kariola T, Palomäki TA, Brader G, Palva ET** (2003) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia*-derived elicitors HrpN and PehA trigger distinct but interacting defense responses and cell death in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 179–187

- Karr DB, Liang RT, Reuhs BL, Emerich DW** (2000) Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta* **211**: 218–226
- Karthika KS, Rashmi I, Parvathi MS** (2018) Biological functions, uptake and transport of essential nutrients in relation to plant growth. *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*. Springer Singapore, Singapore, pp 1–49
- Kassambra A** (2020) ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots. R package, version 0.4.0. R package
- Kato G, Maruyama Y, Nakamura M** (1979) Role of lectins and lipopolysaccharides in the recognition process of specific legume-rhizobium symbiosis. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**: 1085–1092
- Kazan K, Manners JM** (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 22–31
- Kazan K, Manners JM** (2013) MYC2: the master in action. *Molecular Plant* **6**: 686–703
- Keegstra K** (2010) Plant cell walls. *Plant Physiology* **154**: 483–486
- Keen NT** (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* **24**: 447–463
- Kesten C, Gámez-Arjona FM, Menna A, Scholl S, Dora S, Huerta AI, Huang H, Tintor N, Kinoshita T, Rep M, et al** (2019) Pathogen-induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. *The EMBO Journal* **38**: e101822
- Khan JA, Wang Q, Sjölund RD, Schulz A, Thompson GA** (2007) An early nodulin-like protein accumulates in the sieve element plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 1576–1589
- Khan MA, Duffy B, Gessler C, Patocchi A** (2006) QTL mapping of fire blight resistance in apple. *Molecular Breeding* **17**: 299–306
- Khan MB, Harborne JB** (1990) Induced alkaloid defence in *Atropa acuminata* in response to mechanical and herbivore leaf damage. *Chemoecology* **1**: 77–80
- Khan MIR, Iqbal N, Masood A, Per TS, Khan NA** (2013) Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e26374
- Kharadi RR, Schachterle JK, Yuan X, Castiblanco LF, Peng J, Slack SM, Zeng Q, Sundin GW** (2021) Genetic dissection of the *Erwinia amylovora* disease cycle. *Annual Review of Phytopathology* **59**: 191–212
- Khare S, Singh NB, Singh A, Hussain I, Niharika K, Yadav V, Bano C, Yadav RK, Amist N** (2020) Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology* **63**: 203–216
- Khush GS** (2001) Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics* **2**: 815–822
- Kim HS, Desveaux D, Singer AU, Patel P, Sondak J, Dangl JL** (2005a) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 6496–6501
- Kim JF, Beer SV** (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *Journal of Bacteriology* **180**: 5203–5210
- Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah J-W, Hahm KS, Park Y** (2009) Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 2860–2872

- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D** (2005b) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**: 749–759
- Kim NH, Lee DH, Choi DS, Hwang BK** (2015) The pepper GNA-related lectin and PAN domain protein gene, CaGLP1, is required for plant cell death and defense signaling during bacterial infection. *Plant Science* **241**: 307–315
- Kim SY, Kim YC, Seong ES, Lee YH, Park JM, Choi D** (2007) The chili pepper CaATL1: an AT-hook motif-containing transcription factor implicated in defence responses against pathogens. *Molecular Plant Pathology* **8**: 761–771
- Kim Y, Gilmour SJ, Chao L, Park S, Thomashow MF** (2020) *Arabidopsis* CAMTA transcription factors regulate pipelicolic acid biosynthesis and priming of immunity genes. *Molecular Plant* **13**: 157–168
- King EO, Ward MK, Raney DE** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44**: 301–307
- Kiryu M, Hamanaka M, Yoshitomi K, Mochizuki S, Akimitsu K, Gomi K** (2018) Rice terpene synthase 18 (OsTPS18) encodes a sesquiterpene synthase that produces an antibacterial (E)-nerolidol against a bacterial pathogen of rice. *Journal of General Plant Pathology* **84**: 221–229
- Kiyama H, Matsunaga A, Suzuki G, Gomi K** (2021) Monoterpene geraniol produced by rice terpene synthase 21 suppresses the expression of cell-division related genes in the rice bacterial pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **115**: 101673
- Kiyosawa S** (1982) Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **20**: 93–117
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B** (2000) Linear β -1, 3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* **124**: 1027–1038
- Klemptner RL, Sherwood JS, Tugizimana F, Dubery IA, Piater LA** (2014) Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP). *Molecular Plant Pathology* **15**: 747–761
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, et al** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 8849–8855
- Klimecka M, Muszyńska G** (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochimica Polonica* **54**: 219–233
- Knox J** (2008) Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 308–313
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM** (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays* **16**: 123–132
- Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM** (1997) Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* **2**: 379–384
- Kong Q, Sun T, Qu N, Ma J, Li M, Cheng Y, Zhang Q, Wu D, Zhang Z, Zhang Y** (2016) Two redundant receptor-like cytoplasmic kinases function downstream of pattern recognition receptors to regulate activation of SA biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **171**: 1344–1354
- Konrad W, Katul G, Roth-Nebelsick A** (2020) Leaf temperature and its dependence on atmospheric CO₂ and leaf size. *Geological Journal* **56**: 866–885

- Koo JC, Lee SY, Chun HJ, Cheong YH, Choi JS, Kawabata S, Miyagi M, Tsunasawa S, Ha KS, Bae DW, et al** (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1382**: 80–90
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ** (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology* **147**: 1358–1368
- Kostick SA, Norelli JL, Evans KM** (2019) Novel metrics to classify fire blight resistance of 94 apple cultivars. *Plant Pathology* **68**: 985–996
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf K-D** (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 310–316
- Kotake T, Yamanashi Y, Imaizumi C, Tsumuraya Y** (2016) Metabolism of l-arabinose in plants. *Journal of Plant Research* **129**: 781–792
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 2940–2945
- Krauss P, Markstadter C, Riederer M** (1997) Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant, Cell and Environment* **20**: 1079–1085
- Križnik M, Petek M, Dobnik D, Ramšak Ž, Baebler Š, Pollmann S, Kreuze JF, Žel J, Gruden K** (2017) Salicylic acid perturbs sRNA-gibberellin regulatory network in immune response of potato to potato virus Y infection. *Frontiers in Plant Science*. **8**: 2192
- Kumar S, Gupta D, Nayyar H** (2011) Comparative response of maize and rice genotypes to heat stress: status of oxidative stress and antioxidants. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**: 75–86
- Kumar SV, Wigge PA** (2010) H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* **140**: 136–147
- Kumral NA, Kovanci B** (2007) Susceptibility of female populations of *Panonychus ulmi* (Koch) (*Acar*: *Tetranychidae*) to some acaricides in apple orchards. *Journal of Pest Science* **80**: 131–137
- Kunst L, Browse J, Somerville C** (1989) Enhanced thermal tolerance in a mutant of *Arabidopsis* deficient in palmitic acid unsaturation. *Plant Physiology* **91**: 401–408
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G** (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* **16**: 3496–3507
- Kutschera A, Ranf S** (2019) The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. *Biochimie* **159**: 93–98
- La Camera S, Balagué C, Göbel C, Geoffroy P, Legrand M, Feussner I, Roby D, Heitz T** (2009) The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 469–481
- La Camera S, Geoffroy P, Samaha H, Ndiaye A, Rahim G, Legrand M, Heitz T** (2005) A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **44**: 810–825
- Labbé J, Muchero W, Czarnecki O, Wang J, Wang X, Bryan AC, Zheng K, Yang Y, Xie M, Zhang J, et al** (2019) Mediation of plant–mycorrhizal interaction by a lectin receptor-like kinase. *Nature Plants* **5**: 676–680

- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lafarge S** (2003) Characterization of *Arabidopsis thaliana* ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: AtBRCA1, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Research* **31**: 1148–1155
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E** (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* **138**: 882–897
- Larkindale J, Huang B** (2004) Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany* **51**: 57–67
- Latgé J** (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* **66**: 279–290
- Laus MC, Logman TJ, Lamers GE, Van Brussel AAN, Carlson RW, Kijne JW** (2006) A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular Microbiology* **59**: 1704–1713
- Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T, Ryals J** (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal* **10**: 71–82
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist* **171**: 249–269
- Lee C-W, Efetova M, Engelmann JC, Kramell R, Wasternack C, Ludwig-Müller J, Hedrich R, Deeken R** (2009) *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **21**: 2948–2962
- Lee D, Bourdais G, Yu G, Robatzek S, Coaker G** (2015a) Phosphorylation of the plant immune regulator RPM1-INTERACTING PROTEIN4 enhances plant plasma membrane H⁺-ATPase activity and inhibits flagellin-triggered immune responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **27**: 2042–2056
- Lee D, Lal NK, Lin ZJD, Ma S, Liu J, Castro B, Toruño T, Dinesh-Kumar SP, Coaker G** (2020) Regulation of reactive oxygen species during plant immunity through phosphorylation and ubiquitination of RBOHD. *Nature Communications* **11**: 1–16
- Lee J, Manning AJ, Wolfgeher D, Jelenska J, Cavanaugh KA, Xu H, Fernandez SM, Michelmore RW, Kron SJ, Greenberg JT** (2015b) Acetylation of an NB-LRR plant immune-effector complex suppresses immunity. *Cell Reports* **13**: 1670–1682
- Lee Y, Kim YC, Kim SY, Lee IJ, Choi D, Paek KH, Cho HS, Kweon SY, Park JM** (2012) A novel gibberellin 2-oxidase gene CaGA2ox1 in pepper is specifically induced by incompatible plant pathogens. *Plant Biotechnology Reports* **6**: 381–390
- Leeman M, van Pelt JA, den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B** (1995) Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 655–664
- Lefevre H, Bauters L, Gheysen G** (2020) Salicylic acid biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science* **11**: 338
- Legris M, Klose C, Burgie ES, Rojas CCR, Neme M, Hiltbrunner A, Wigge PA, Schäfer E, Vierstra RD, Casal JJ** (2016) Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science* **354**: 897–900

- Legrís M, Nieto C, Sellaro R, Prat S, Casal JJ** (2017) Perception and signalling of light and temperature cues in plants. *The Plant Journal* **90**: 683–697
- Leisner SM, Schoelz JE** (2018) Joining the crowd: integrating plant virus proteins into the larger world of pathogen effectors. *Annual Review of Phytopathology* **56**: 89–110
- Lekberg Y, Arnillas CA, Borer ET, Bullington LS, Fierer N, Kennedy PG, Leff JW, Luis AD, Seabloom EW, Henning JA** (2021) Nitrogen and phosphorus fertilization consistently favor pathogenic over mutualistic fungi in grassland soils. *Nature Communications* **12**: 1–8
- León J, Shulaev V, Yalpani N, Lawton MA, Raskin I** (1995) Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 10413–10417
- Lerdau M, Coley PD** (2002) Benefits of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Oikos* **98**: 534–536
- Lewis JD, Lee A, Ma W, Zhou H, Guttman DS, Desveaux D** (2011) The YopJ superfamily in plant-associated bacteria. *Molecular Plant Pathology* **12**: 928–937
- Lewit-Bentley A, Réty S** (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **10**: 637–643
- Li C, Liu G, Xu C, Lee GI, Bauer P, Ling H-Q, Ganai MW, Howe GA** (2003) The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses2 gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *The Plant Cell* **15**: 1646–1661
- Li CH, Wang G, Zhao JL, Zhang LQ, Ai LF, Han Y-F, Sun DY, Zhang SW, Sun Y** (2014) The receptor-like kinase SIT1 mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice. *The Plant Cell* **26**: 2538–2553
- Li J, Brader G, Palva ET** (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell* **16**: 319–331
- Li N, Han X, Feng D, Yuan D, Huang LJ** (2019) Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 671
- Li S, Fu Q, Chen L, Huang W, Yu D** (2011) *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta* **233**: 1237–1252
- Li YB, Han LB, Wang HY, Zhang J, Sun ST, Feng DQ, Yang CL, Sun YD, Zhong NQ, Xia GX** (2016) The thioredoxin GbNRX1 plays a crucial role in homeostasis of apoplastic reactive oxygen species in response to *Verticillium dahliae* infection in cotton. *Plant Physiology* **170**: 2392–2406
- Li Z, Tang J, Srivastava R, Bassham DC, Howell SH** (2020) The Transcription factor bZIP60 links the unfolded protein response to the heat stress response in maize. *The Plant Cell* **32**: 3559–3575
- Lim PO, Kim Y, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V, et al** (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant Journal* **52**: 1140–1153
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemsse J, Bisseling T, Geurts R** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630–633
- Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D** (2007) Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **143**: 1871–1880

- Liu B, Ouyang Z, Zhang Y, Li X, Hong Y, Huang L, Liu S, Zhang H, Li D, Song F** (2014) Tomato NAC transcription factor SISRN1 positively regulates defense response against biotic stress but negatively regulates abiotic stress response. *PLoS ONE* **9**: e102067
- Liu H, Charng Y** (2013) Common and distinct functions of *Arabidopsis* class A1 and A2 heat shock factors in diverse abiotic stress responses and development. *Plant Physiology* **163**: 276–290
- Liu H, Dong S, Li M, Gu F, Yang G, Guo T, Chen Z, Wang J** (2021) The Class III peroxidase gene OsPrx30, transcriptionally modulated by the AT-hook protein OsATH1, mediates rice bacterial blight-induced ROS accumulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **63**: 393–408
- Liu JJ, Ekramoddoullah AKM** (2006) The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 3–11
- Liu PP, von Dahl CC, Park SW, Klessig DF** (2011) Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiology* **155**: 1762–1768
- Liu S, Jonge J, Trejo-Arellano MS, Santos-González J, Köhler C, Hennig L** (2020) Role of H1 and DNA methylation in selective regulation of transposable elements during heat stress. *New Phytologist* **229**: 2238–2250
- Loix C, Huybrechts M, Vangronsveld J, Gielen M, Keunen E, Cuypers A** (2017) Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1867
- van Loon LC, Pierpoint WS, Boller TH, Conejero V** (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**: 245–264
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162
- López Sánchez A, Stassen JHM, Furci L, Smith LM, Ton J** (2016) The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **88**: 361–374
- Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L** (1998) Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1383**: 9–36
- Lorković ZJ, Berger F** (2017) Heterochromatin and DNA damage repair: Use different histone variants and relax. *Nucleus* **8**: 583–588
- Lorković ZJ, Park C, Goiser M, Jiang D, Kurzbauer M-T, Schlögelhofer P, Berger F** (2017) Compartmentalization of DNA damage response between heterochromatin and euchromatin is mediated by distinct H2A histone variants. *Current Biology* **27**: 1192–1199
- Louws FJ, Wilson M, Campbell HL, Cuppels DA, Jones JB, Shoemaker PB, Sahin F, Miller SA** (2001) Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease* **85**: 481–488
- Lowe-Power TM, Jacobs JM, Ailloud F, Fochs B, Prior P, Allen C** (2016) Degradation of the plant defense signal salicylic acid protects *Ralstonia solanacearum* from toxicity and enhances virulence on tobacco. *MBio* **85**: e00656-16.
- Lozano-Durán R, Bourdais G, He SY, Robatzek S** (2013) The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity. *New Phytologist* **202**: 259–269

- Lu H, Salimian S, Gamelin E, Wang G, Fedorowski J, LaCourse W, Greenberg JT** (2009) Genetic analysis of *fad6-1* reveals complex defense networks and leads to identification of novel defense genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **58**: 401–412
- Lu H, Zou Y, Feng N** (2010) Overexpression of AHL20 negatively regulates defenses in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 801–808
- Luan S** (2009) The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science* **14**: 37–42
- Lucius K** (2020) Dietary Lectins: Gastrointestinal and immune effects. *Alternative and Complementary Therapies* **26**: 168–174
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J** (2011a) Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology* **158**: 844–853
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J** (2011b) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 183–193
- Luo X, Xu N, Huang J, Gao F, Zou H, Boudsocq M, Coaker G, Liu J** (2017) A lectin receptor-like kinase mediates pattern-triggered salicylic acid signaling. *Plant Physiology* **174**: 2501–2514
- Ma QH, Tian B, Li YL** (2010) Overexpression of a wheat jasmonate-regulated lectin increases pathogen resistance. *Biochimie* **92**: 187–193
- Ma QH, Zhen W-B, Liu YC** (2013) Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance. *Biochimie* **95**: 359–365
- MAAF, MEDDE** (2015) Plan Ecophyto II.
- Macedo MLR, Damico DCS, Freire M das GM, Toyama MH, Marangoni S, Novello JC** (2003) Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 2980–2986
- Macedo MLR, Freire M das GM, da Silva MBR, Coelho LCBB** (2007) Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **146**: 486–498
- Machinandiarena MF, Lobato MC, Feldman ML, Daleo GR, Andreu AB** (2012) Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1417–1424
- MacMillan CP, Mansfield SD, Stachurski ZH, Evans R, Southerton SG** (2010) Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal* **62**: 689–703
- Magarey RC** (1999) Reduced productivity in long term monoculture: where are we placed? *Australasian Plant Pathology* **28**: 11
- Mahan JR, Upchurch DR** (1988) Maintenance of constant leaf temperature by plants—I. Hypothesis-limited homeothermy. *Environmental and Experimental Botany* **28**: 351–357
- Majumder P, Banerjee S, Das S** (2003) Identification of receptors responsible for binding of the mannose specific lectin to the gut epithelial membrane of the target insects. *Glycoconjugate Journal* **20**: 525–530
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I** (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002–1004
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK** (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**: 399–403

- Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WGT** (2014) The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*. **5**: 178
- Manosalva P, Manohar M, von Reuss SH, Chen S, Koch A, Kaplan F, Choe A, Micikas RJ, Wang X, Kogel KH, et al** (2015) Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications* **6**: 1–8
- Manosalva PM, Park S-W, Forouhar F, Tong L, Fry WE, Klessig DF** (2010) Methyl esterase 1 (StMES1) is required for systemic acquired resistance in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1151–1163
- Marcus JP, Goulter KC, Green JL, Harrison SJ, Manners JM** (1997) Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *European Journal of Biochemistry* **244**: 743–749
- Maria das Graças MF, Gomes VM, Corsini RE, Machado OLT, De Simone SG, Novello JC, Marangoni S, Macedo MLR** (2002) Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 61–68
- Marino G, Funk C** (2011) Matrix metalloproteinases in plants: a brief overview. *Physiologia Plantarum* **145**: 196–202
- Marolleau B, Gaucher M, Heintz C, Degrave A, Warneys R, Orain G, Lemarquand A, Brisset MN** (2017) When a plant resistance inducer leaves the lab for the field: integrating ASM into routine apple protection practices. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1938
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127–158
- Matos AR, d’Arcy-Lameta A, França M, Pêtres S, Edelman L, Kader JC, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT** (2001) A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Letters* **491**: 188–192
- Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ** (1997) Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* **277**: 504–509
- Matsuo Y, Novianti F, Takehara M, Fukuhara T, Arie T, Komatsu K** (2019) Acibenzolar-S-methyl restricts infection of *Nicotiana benthamiana* by *Plantago asiatica* mosaic virus at two distinct stages. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**: 1475–1486
- Matzke MA, Mosher RA** (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* **15**: 394–408
- Maxson-Stein K, He SY, Hammerschmidt R, Jones AL** (2002) Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Disease* **86**: 785–790
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL** (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 443–465
- McNally RR, Toth IK, Cock PJA, Pritchard L, Hedley PE, Morris JA, Zhao Y, Sundin GW** (2011) Genetic characterization of the HrpL regulon of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* reveals novel virulence factors. *Molecular Plant Pathology* **13**: 160–173
- Melander M, Åhman I, Kamnert I, Strömdahl AC** (2001) Pea lectin expressed transgenically in oilseed rape reduces growth rate of pollen beetle larvae. *Transgenic Research* **12**: 555–587
- Melotto M, Underwood W, He SY** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 101–122

- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–980
- Melotto M, Zhang L, Oblessuc PR, He SY** (2017) Stomatal defense a decade later. *Plant Physiology* **174**: 561–571
- Meng X, Zhang S** (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 245–266
- Mengiste T, Chen X, Salmeron J, Dietrich R** (2003) The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 2551–2565
- van der Merwe JA, Dubery IA** (2006) Benzothiadiazole inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase in tobacco. *Journal of Plant Physiology* **163**: 877–882
- Meshi T, Iwabuchi M** (1995) Plant transcription factors. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1405–1420
- Métraux JP, Jackson RW, Schnettler E, Goldbach RW** (2009) Chapter 2 : Plant pathogens as suppressors of host defense. *Advances in Botanical Research*. Elsevier, pp 39–89
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004–1006
- Michaletz ST, Weiser MD, McDowell NG, Zhou J, Kaspari M, Helliker BR, Enquist BJ** (2016) The energetic and carbon economic origins of leaf thermoregulation. *Nature Plants* **2**: 1–9
- Migicovsky Z, Gardner KM, Richards C, Thomas Chao C, Schwaninger HR, Fazio G, Zhong GY, Myles S** (2021) Genomic consequences of apple improvement. *Horticulture Research* **8**: 1–13
- Min L, Li Y, Hu Q, Zhu L, Gao W, Wu Y, Ding Y, Liu S, Yang X, Zhang X** (2014) Sugar and auxin signaling pathways respond to high-temperature stress during anther development as revealed by transcript profiling analysis in cotton. *Plant Physiology* **164**: 1293–1308
- Minic Z, Rihouey C, Do CT, Lerouge P, Jouanin L** (2004) Purification and characterization of enzymes exhibiting β -D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**: 867–878
- Mitchum MG, Hussey RS, Baum TJ, Wang X, Elling AA, Wubben M, Davis EL** (2013) Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist* **199**: 879–894
- Mittler R, Blumwald E** (2010) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 443–462
- Mittler R, Finka A, Goloubinoff P** (2012) How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* **37**: 118–125
- Miura K, Lee J, Miura T, Hasegawa PM** (2009) SIZ1 controls cell growth and plant development in *Arabidopsis* through salicylic acid. *Plant and Cell Physiology* **51**: 103–113
- Miyakawa T, Hatano K, Miyauchi Y, Suwa Y, Sawano Y, Tanokura M** (2014) A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity. *Plant Physiology* **166**: 766–778
- Miyake K, Tanaka T, McNeil PL** (2007) Lectin-based food poisoning: A new mechanism of protein toxicity. *PLoS ONE* **2**: e687
- Miyazaki JH, Yang SF** (1987) The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **69**: 366–370

- Mohan Babu R, Sajeena A, Vijaya Samundeeswari A, Sreedhar A, Vidhyasekeran P, Reddy MS** (2003) Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar-S-methyl. *Annals of Applied Biology* **143**: 333–340
- Moneo-Sánchez M, Izquierdo L, Martín I, Labrador E, Dopico B** (2016) Subcellular location of *Arabidopsis thaliana* subfamily a1 β -galactosidases and developmental regulation of transcript levels of their coding genes. *Plant Physiology and Biochemistry* **109**: 137–145
- Monteiro F, Nishimura MT** (2018) Structural, functional, and genomic diversity of plant NLR proteins: an evolved resource for rational engineering of plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* **56**: 243–267
- Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen C, Paquette SM, Sánchez-Pérez R, Møller BL, Bak S** (2008) β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **69**: 1795–1813
- Moreira RA, Gavada BS** (1984) Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum* **26**: 113–120
- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935–944
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C** (2005) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* **140**: 249–262
- Mur LAJ, Simpson C, Kumari A, Gupta AK, Gupta KJ** (2016) Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of Botany* **59**: 703–709
- Murakami Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, Kodama H, Iba K** (2000) Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* **287**: 476–479
- Murdock LL, Huesing JE, Nielsen SS, Pratt RC, Shade RE** (1990) Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* **29**: 85–89
- Mysore KS, Ryu CM** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**: 97–104
- Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, Rao YK, Sarma NP, Reddy VD, Rao KV** (2004) Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (*gna*) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1399–1405
- Nair CB, Anith KN, Sreekumar J** (2006) Mitigation of growth retardation effect of plant defense activator, acibenzolar-S-methyl, in amaranthus plants by plant growth-promoting rhizobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**: 1183–1187
- Nandi A, Welti R, Shah J** (2004) The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **16**: 465–477
- Nap JP, Bisseling T** (1990) Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* **250**: 948–954
- Narayanan S, Tamura PJ, Roth MR, Prasad PVV, Welti R** (2016) Wheat leaf lipids during heat stress: I. High day and night temperatures result in major lipid alterations. *Plant, Cell & Environment* **39**: 787–803
- Narod SA, Foulkes WD** (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer* **4**: 665–676
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring A-C, Zeier J** (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell* **24**: 5123–5141

- Navarro-Gochicoa M-T, Camut S, Timmers ACJ, Niebel A, Hervé C, Boutet E, Bono J-J, Imberty A, Cullimore JV** (2003) Characterization of four lectin-like receptor kinases expressed in roots of *Medicago truncatula*. Structure, location, regulation of expression, and potential role in the symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiology* **133**: 1893–1910
- Nawrath C** (2006) Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 281–287
- Nawrocka J, Małolepsza U** (2013) Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control* **67**: 149–156
- Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C** (2007) SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The Plant Journal* **50**: 128–139
- Negrel J, Klinguer A, Adrian M** (2021) In vitro inhibition of shikimate hydroxycinnamoyltransferase by acibenzolar acid, the first metabolite of the plant defence inducer acibenzolar-S-methyl. *Plant Physiology and Biochemistry* **163**: 119–127
- Ng CKY, McAinsh MR** (2003) Encoding specificity in plant calcium signalling: hot-spotting the ups and downs and waves. *Annals of Botany* **92**: 477–485
- Nicaise V, Roux M, Zipfel C** (2009) Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology* **150**: 1638–1647
- Niculaes C, Abramov A, Hannemann L, Frey M** (2018) Plant protection by benzoxazinoids—recent insights into biosynthesis and function. *Agronomy* **8**: 143
- Nieto-Sotelo J, Martínez LM, Ponce G, Cassab GI, Alagón A, Meeley RB, Ribaut JM, Yang R** (2002) Maize HSP101 plays important roles in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. *The Plant Cell* **14**: 1621–1633
- Niks RE, Marcel TC** (2009) Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytologist* **182**: 817–828
- Nimtze M, Mort A, Domke T, Wray V, Zhang Y, Qiu F, Coplin D, Geider K** (1996) Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydrate Research* **287**: 59–76
- Noghabi SS, Van Damme E, Smaghe G** (2006) Bioassays for insecticidal activity of iris ribosome-inactivating proteins expressed in tobacco plants. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **71**: 285
- Norelli JL, Aldwinckle HS, Beer SV** (1986) Differential susceptibility of *Malus* spp. cultivars Robusta 5, Novole, and Ottawa 523 to *Erwinia amylovora*. *Plant Disease* **70**: 1017
- Nürnberg T, Kemmerling B** (2009) Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and PAMP-triggered immunity. In J Parker, ed, *Molecular aspects of plant disease resistance*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 16–47
- Ogawa D, Nakajima N, Seo S, Mitsuhashi I, Kamada H, Ohashi Y** (2006) The phenylalanine pathway is the main route of salicylic acid biosynthesis in Tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Plant Biotechnology* **23**: 395–398
- Oh CS, Carpenter SCD, Hayes ML, Beer SV** (2010) Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* **156**: 1211–1220

- Okeola OG, Machuka J** (2001) Biological effects of african yam bean lectins on *Clavigralla tomentosicollis* (Hemiptera: Coreidae). *Journal of Economic Entomology* **94**: 724–729
- Oldroyd GED, Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with *Rhizobial* infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 519–546
- Oliveira MDM, Varanda CMR, Félix MRF** (2016) Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters* **15**: 152–158
- O'Malley DM, Whetten R, Bao W, Chen CL, Sederoff RR** (1993) The role of laccase in lignification. *The Plant Journal* **4**: 751–757
- Onaga G, Wydra K, Koopmann B, Chebotarov D, Séré Y, Von Tiedemann A** (2017a) High temperature effects on Pi54 conferred resistance to *Magnaporthe oryzae* in two genetic backgrounds of *Oryza sativa*. *Journal of Plant Physiology* **212**: 80–93
- Onaga G, Wydra KD, Koopmann B, Séré Y, von Tiedemann A** (2017b) Elevated temperature increases in planta expression levels of virulence related genes in *Magnaporthe oryzae* and compromises resistance in *Oryza sativa* cv. Nipponbare. *Functional Plant Biology* **44**: 358
- Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, Staub T** (2001) Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 19–28
- Ordax M, Marco-Noales E, López MM, Biosca EG** (2010) Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. *Research in Microbiology* **161**: 549–555
- Osakabe A, Jamge B, Axelsson E, Montgomery SA, Akimcheva S, Kuehn AL, Pisupati R, Lorković ZJ, Yelagandula R, Kakutani T, et al** (2021) The chromatin remodeler DDM1 prevents transposon mobility through deposition of histone variant H2A.W. *Nature Cell Biology* **23**: 391–400
- Osbourn A** (1996) Saponins and plant defence — a soap story. *Trends in Plant Science* **1**: 4–9
- Ouimette DG, Coffey MD** (1989) Comparative antifungal activity of four phosphonate compounds against isolates of nine *Phytophthora* species. *Phytopathology* **79**: 761
- Oukarroum A, El Madidi S, Strasser RJ** (2012) Exogenous glycine betaine and proline play a protective role in heat-stressed barley leaves (*Hordeum vulgare* L.): A chlorophylla fluorescence study. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **146**: 1037–1043
- Pallas JA, Paiva NL, Lamb C, Dixon RA** (1996) Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* **10**: 281–293
- Palloix A, Ayme V, Moury B** (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**: 190–199
- Pan T, Qin Q, Nong C, Gao S, Wang L, Cai B, Zhang M, Wu C, Chen H, Li T, et al** (2021) A novel WEE1 pathway for replication stress responses. *Nature Plants* **7**: 209–218
- Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M** (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **6**: 723
- Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE** (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 12923–12928
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH** (2003) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal* **37**: 186–198

- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113–116
- Park SW, Liu PP, Forouhar F, Vlot AC, Tong L, Tietjen K, Klessig DF** (2009) Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 7307–7317
- Parlement européen, Conseil de l'Union Européenne** (2009) Directive 2009/128/CE du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 instaurant un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable.
- Parravicini G, Gessler C, Denancé C, Lasserre-Zuber P, Vergne E, Brisset MN, Patocchi A, Durel CE, Broggini GAL** (2011) Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste'. *Molecular Plant Pathology* **12**: 493–505
- Passardi F, Penel C, Dunand C** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**: 534–540
- Passricha N, Saifi SK, Kharb P, Tuteja N** (2019a) Marker-free transgenic rice plant overexpressing pea LecRLK imparts salinity tolerance by inhibiting sodium accumulation. *Plant Molecular Biology* **99**: 265–281
- Passricha N, Saifi SK, Kharb P, Tuteja N** (2019b) Rice lectin receptor-like kinase provides salinity tolerance by ion homeostasis. *Biotechnology and Bioengineering* **117**: 498–510
- Pasternak T, Groot EP, Kazantsev FV, Teale W, Omelyanchuk N, Kovrizhnykh V, Palme K, Mironova VV** (2019) Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. *Plant Physiology* **180**: 1725–1739
- Pattyn J, Vaughan-Hirsch J, Van de Poel B** (2020) The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry. *New Phytologist* **229**: 770–782
- Paulin JP, Samson R** (1973) Feu bactérien en France. II. Caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., 1920, isolées du foyer franco-belge. *Annales de phytopathologie* **5**: 389–397
- Pecinka A, Dinh HQ, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Scheid OM** (2010) Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 3118–3129
- Pedras MSC, Yaya EE** (2015) Plant chemical defenses: are all constitutive antimicrobial metabolites phytoanticipins? *Natural Product Communications* **10**: 1934578X1501000
- Pedroza-García JA, Nájera-Martínez M, Mazubert C, Aguilera-Alvarado P, Drouin-Wahbi J, Sánchez-Nieto S, Gualberto JM, Raynaud C, Plasencia J** (2018) Role of pyrimidine salvage pathway in the maintenance of organellar and nuclear genome integrity. *The Plant Journal* **97**: 430–446
- Pedroza-García JA, Nájera-Martínez M, de la Paz Sanchez M, Plasencia J** (2014) *Arabidopsis thaliana* thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Molecular Biology* **87**: 303–315
- Peil A, Emeriewen OF, Khan A, Kostick S, Malnoy M** (2020) Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *Journal of Plant Pathology* **103**: 3–12
- Peng FY, Weselake RJ** (2013) Genome-wide identification and analysis of the B3 superfamily of transcription factors in *Brassicaceae* and major crop plants. *Theoretical and Applied Genetics* **126**: 1305–1319

- Peng X, Wang M, Li Y, Yan W, Chang Z, Chen Z, Xu C, Yang C, Deng XW, Wu J, et al** (2020) Lectin receptor kinase OsLecRK-S.7 is required for pollen development and male fertility. *Journal of Integrative Plant Biology* **62**: 1227–1245
- Peng Y, van Wersch R, Zhang Y** (2018) Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 403–409
- Peng Y, Yang J, Li X, Zhang Y** (2021) Salicylic acid : biosynthesis and signaling. *Annual Review of Plant Biology* **72**: 761–791
- Perez S, Rivet A, Imberty A** (2015) 3D-lectin database. *In* N Taniguchi, T Endo, GW Hart, PH Seeberger, C-H Wong, eds, *Glycoscience: biology and medicine*. Springer, Japan, pp 283–289
- Peumans WJ, Van Damme EJM** (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* **109**: 347–352
- Pietzenuk B, Markus C, Gaubert H, Bagwan N, Merotto A, Bucher E, Pecinka A** (2016) Recurrent evolution of heat-responsiveness in *Brassicaceae* COPIA elements. *Genome Biology* **17**: 1–15
- Pimentel D** (1996) Green revolution agriculture and chemical hazards. *Science of The Total Environment* **188**: S86–S98
- Pistole TG** (1981) Interaction of bacteria and fungi with Lectins and lectin-like substances. *Annual Review of Microbiology* **35**: 85–112
- Podobnik M, Kisovec M, Anderluh G** (2017) Molecular mechanism of pore formation by aerolysin-like proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**: 20160209
- Pokotylo I, Kravets V, Ruelland E** (2019) Salicylic acid binding proteins (SABPs): the hidden forefront of salicylic acid signalling. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 4377
- Polito L, Bortolotti M, Battelli MG, Calafato G, Bolognesi A** (2019) Ricin: an ancient story for a timeless plant toxin. *Toxins* **11**: 324
- Pontais I, Treutter D, Paulin JP, Brisset MN** (2008) *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiologia Plantarum* **132**: 262–271
- Popova OV, Dinh HQ, Aufsatz W, Jonak C** (2013) The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **6**: 396–410
- Powell KS, Gatehouse AMR, Hilder VA, Damme EJM, Peumans WJ, Boonjawat J, Horsham K, Gatehouse JA** (1995a) Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **75**: 61–65
- Powell KS, Gatehouse AMR, Hilder VA, Gatehouse JA** (1993) Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **66**: 119–126
- Powell KS, Gatehouse AMR, Hilder VA, Gatehouse JA** (1995b) Antifeedant effects of plant lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **75**: 51–59
- Powell KS, Spence J, Bharathi M, Gatehouse JA, Gatehouse AMR** (1998) Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Journal of Insect Physiology* **44**: 529–539
- Puhar A, Sansonetti PJ** (2014) Type III secretion system. *Current Biology* **24**: R784–R791
- Qasim M, Islam W, Ashraf HJ, Ali I, Wang L** (2020) Saponins in insect pest control. *Co-Evolution of Secondary Metabolites* 897–924

- Qi D, Innes RW** (2013) Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling. *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2013.00348
- Qi G, Chen J, Chang M, Chen H, Hall K, Korin J, Liu F, Wang D, Fu ZQ** (2018) Pandemonium breaks out: disruption of salicylic acid-mediated defense by plant pathogens. *Molecular Plant* **11**: 1427–1439
- Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou JM** (2017) Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 92–100
- Quint M, Delker C, Franklin KA, Wigge PA, Halliday KJ, van Zanten M** (2016) Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants* **2**: 1–9
- R Core Team** (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, et al** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585–592
- Rahbé Y, Sauvion N, Febvay G, Peumans WJ, Gatehouse AMR** (1995) Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **76**: 143–155
- Raikhel NV, Lee HI, Broekaert WF** (1993) Structure and function of chitin-binding proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 591–615
- Rainwater DT, Gossetp DR, Millhollon EP, Hanna HY, Banks SW, Lucas MC** (1996) The relationship between yield and the antioxidant defense system in tomatoes grown under heat stress. *Free Radical Research* **25**: 421–435
- Raiola A, Lionetti V, Elmaghraby I, Immerzeel P, Mellerowicz EJ, Salvi G, Cervone F, Bellincampi D** (2011) Pectin methylesterase is induced in *Arabidopsis* upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 432–440
- Rajametov S, Yang EY, Cho MC, Chae SY, Jeong HB, Chae WB** (2021) Heat-tolerant hot pepper exhibits constant photosynthesis via increased 4 transpiration rate, high proline content and fast recovery in heat stress 5 Condition. *Scientific Reports* **11**: 1–9
- Rakwal R, Yang G, Komatsu S** (2004) Chitinase induced by jasmonic acid, methyl jasmonate, ethylene and protein phosphatase inhibitors in rice. *Molecular Biology Reports* **31**: 113–119
- Ramegowda V, Senthil-Kumar M, Ishiga Y, Kaundal A, Udayakumar M, Mysore K** (2013) Drought stress acclimation imparts tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 9497–9513
- Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N, Singh S, Grewal AS, Srivastav AL, Kaushal J** (2021) An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production* **283**: 124657
- Ranocha P, Dima O, Nagy R, Felten J, Corratgé-Faillie C, Novák O, Morreel K, Lacombe B, Martinez Y, Pfrunder S, et al** (2013) *Arabidopsis* WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nature Communications* **4**: 1–9
- Ranty B, Aldon D, Galaud JP** (2006) Plant calmodulins and calmodulin-related proteins. *Plant Signaling & Behavior* **1**: 96–104

- Rao KV, Rathore KS, Hodges TK, Fu X, Stoger E, Sudhakar D, Williams S, Christou P, Bharathi M, Bown DP, et al** (1998) Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal* **15**: 469–477
- Rasheed R, Wahid A, Farooq M, Hussain I, Basra SMA** (2011) Role of proline and glycinebetaine pretreatments in improving heat tolerance of sprouting sugarcane (*Saccharum sp.*) buds. *Plant Growth Regulation* **65**: 35–45
- Rashid War A, Kumar Taggar G, Hussain B, Sachdeva Taggar M, Nair RM, Sharma HC** (2018) Plant defence against herbivory and insect adaptations. *AoB PLANTS* **10**: ply037
- Ratanapo S, Ngamjunyaporn W, Chulavatnatol M** (2001) Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. *Plant Science* **160**: 739–744
- Rate DN, Greenberg JT** (2001) The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **27**: 203–211
- Ray TC, Smith ARW, Carter KJ, Hignett RC** (1986) Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* **132**: 3159–3167
- Rayapuram C, Wu J, Haas C, Baldwin IT** (2008) PR-13/Thionin but not PR-1 mediates bacterial resistance in *Nicotiana attenuata* in nature, and neither influences herbivore resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 988–1000
- Rekhter D, Lüdke D, Ding Y, Feussner K, Zienkiewicz K, Lipka V, Wiermer M, Zhang Y, Feussner I** (2019) Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science* **365**: 498–502
- Renault A-S, Deloire A, Bierre J** (1996) Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *VITIS - Journal of Grapevine Research* **35**: 49–49
- Reynolds GJ, Gordon TR, McRoberts N** (2019) Using game theory to understand systemic acquired resistance as a bet-hedging option for increasing fitness when disease is uncertain. *Plants* **8**: 219
- van Rhijn P, Goldberg RB, Hirsch AM** (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a Soybean lectin gene. *The Plant Cell* **10**: 1233–1249
- Ribeiro AC, Monteiro SV, Carrapiço BM, Ferreira RB** (2014) Are vicilins another major class of legume lectins? *Molecules* **19**: 20350–20373
- Ridé M** (1981) Le feu bactérien : problèmes posés par son extension dans l'Europe méridionale. *EPPO Bulletin* **11**: 213–224
- Riedlmeier M, Ghirardo A, Wenig M, Knappe C, Koch K, Georgii E, Dey S, Parker JE, Schnitzler JP, Vlot AC** (2017) Monoterpenes Support systemic acquired resistance within and between Plants. *The Plant Cell* **29**: 1440–1459
- Rocafort M, Fudal I, Mesarich CH** (2020) Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Current Opinion in Plant Biology* **56**: 9–19
- Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, Després C** (2006) The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *The Plant Cell* **18**: 3670–3685
- Rodriguez-Loureiro I, Latza VM, Fragneto G, Schneck E** (2018) Conformation of single and interacting lipopolysaccharide surfaces bearing O-side chains. *Biophysical Journal* **114**: 1624–1635
- Rodríguez-Romero A, Ravichandran KG, Soriano-García M** (1991) Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Letters* **291**: 307–309

- Rogers K, Chen X** (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell* **25**: 2383–2399
- Romeiro R dS., Karr AL, Goodman RN** (1981a) *Erwinia amylovora* cell wall receptor for apple agglutinin. *Physiological Plant Pathology* **19**: 383–390
- Romeiro R, Karr A, Goodman R** (1981b) Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology* **68**: 772–777
- Romero AM, Kousik CS, Ritchie DF** (2001) Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease* **85**: 189–194
- Romero AM, Ritchie DF** (2004) Systemic acquired resistance delays race shifts to major resistance genes in bell pepper. *Phytopathology* **94**: 1376–1382
- Roquis D, Robertson M, Yu L, Thieme M, Julkowska M, Bucher E** (2021) Genomic impact of stress-induced transposable element mobility in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **49**: 10431–10447
- Rosati C, Cadic A, Duron M, Renou JP, Simoneau P** (1997) Molecular cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of *Forsythia x intermedia*. *Plant Molecular Biology* **35**: 303–311
- Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, et al** (2004) Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiology* **134**: 1027–1038
- Ruan J, Zhou Y, Zhou M, Yan J, Khurshid M, Weng W, Cheng J, Zhang K** (2019) Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 2479
- Rüdiger H** (1998) Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Cells Tissues Organs* **161**: 130–152
- Rüdiger H, Gabius HJ** (2001) Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal* **18**: 589–613
- Ruelland E, Zachowski A** (2010) How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* **69**: 225–232
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ** (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 247–258
- Rutenber E, Katzin BJ, Ernst S, Collins EJ, Mlsna D, Ready MP, Robertus JD** (1991) Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **10**: 240–250
- Ryan CA, Pearce G** (2003) Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in *Solanaceae* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 14577–14580
- Ryder LS, Talbot NJ** (2015) Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 8–13
- Sadok W, Lopez JR, Smith KP** (2020) Transpiration increases under high-temperature stress: potential mechanisms, trade-offs and prospects for crop resilience in a warming world. *Plant, Cell & Environment* **44**: 2102–2116
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, et al** (2003) TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* **34**: 374–378
- Saha P, Majumder P, Dutta I, Ray T, Roy SC, Das S** (2006) Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta* **223**: 1329–1343

- Sakamoto T, Kobayashi M, Itoh H, Tagiri A, Kayano T, Tanaka H, Iwahori S, Matsuoka M** (2001) Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiology* **125**: 1508–1516
- Saleh A, Withers J, Mohan R, Marqués J, Gu Y, Yan S, Zavaliev R, Nomoto M, Tada Y, Dong X** (2015) Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host & Microbe* **18**: 169–182
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the Crossroads of Signaling. *The Plant Cell* **14**: S401–S417
- Sanderson MJ** (2007) Intercellular calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Ciba Foundation Symposium 188 - Calcium Waves, Gradients and Oscillations*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, pp 175–194
- Sandroni M** (2020) Plant resistance inducers (PRIs): perspectives for future disease management in the field. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **15**: 1–10
- Suppl PG, Oñate-Sánchez L, Singh KB, Millar AH** (2004) Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Molecular Biology* **54**: 205–219
- Šašek V, Janda M, Delage E, Puyaubert J, Guivarc'h A, López Maseda E, Dobrev PI, Caius J, Bóka K, Valentová O, et al** (2014) Constitutive salicylic acid accumulation in *pi4kIIIβ1β2 Arabidopsis* plants stunts rosette but not root growth. *New Phytologist* **203**: 805–816
- Sasidharan R, Voeselek LA, Pierik R** (2011) Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**: 548–562
- Sauvion N, Rahbé Y, Peumans WJ, Damme EJM, Gatehouse JA, Gatehouse AMR** (1996) Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **79**: 285–293
- Schaller A, Stintzi A, Rivas S, Serrano I, Chichkova NV, Vartapetian AB, Martínez D, Guiamét JJ, Sueldo DJ, van der Hoorn RAL, et al** (2017) From structure to function - a family portrait of plant subtilases. *New Phytologist* **218**: 901–915
- Scheer JM, Ryan CA** (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 9585–9590
- Schellenberg B, Ramel C, Dudler R** (2010) *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1287–1293
- Scheller HV, Ulvskov P** (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 263–289
- Scholthof KBG** (2007) The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 152–156
- Schröpfer S, Böttcher C, Wöhner T, Richter K, Norelli J, Rikkerink EHA, Hanke MV, Flachowsky H** (2018) A single effector protein, AvrRpt2EA, from *Erwinia amylovora* can cause fire blight disease symptoms and induces a salicylic acid-dependent defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 1179–1191
- Seeliger K, Dukowic-Schulze S, Wurz-Wildersinn R, Pacher M, Puchta H** (2011) BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **193**: 364–375

- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC** (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 941–950
- Sequeira L, Graham TL** (1977) Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiological Plant Pathology* **11**: 43–54
- Serrano M, Coluccia F, Torres M, L'Haridon F, Métraux J-P** (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**: 274
- Serrano M, Wang B, Aryal B, Garcion C, Abou-Mansour E, Heck S, Geisler M, Mauch F, Nawrath C, Métraux JP** (2013) Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDS5. *Plant Physiology* **162**: 1815–1821
- Sétamou, Bernal, Mirkov, Legaspi** (2003) Effects of snowdrop lectin on mexican rice borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) life history parameters. *Journal of Economic Entomology* **96**: 950–956
- Seybold H, Trempel F, Ranf S, Scheel D, Romeis T, Lee J** (2014) Ca²⁺ signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca²⁺ decoding mechanisms. *New Phytologist* **204**: 782–790
- Shakeel SN, Gao Z, Amir M, Chen Y-F, Rai MI, Haq NU, Schaller GE** (2015) Ethylene regulates levels of ethylene receptor/CTR1 signaling complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 12415–12424
- Sharathchandra RG, Raj SN, Shetty NP, Amruthesh KN, Shetty HS** (2004) A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection* **23**: 881–888
- Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Gupta VK** (2010) Role of chitinase in plant defense. *Asian Journal of Biochemistry* **6**: 29–37
- Shimono M, Sugano S, Nakayama A, Jiang C-J, Ono K, Toki S, Takatsuji H** (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *The Plant Cell* **19**: 2064–2076
- Shine MB, Xiao X, Kachroo P, Kachroo A** (2019) Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science* **279**: 81–86
- Shine MB, Yang J, El-Habbak M, Nagyabhyru P, Fu D, 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
- Shukla S, Arora R, Sharma HC** (2005) Biological activity of soybean trypsin inhibitor and plant lectins against cotton bollworm/legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. *Plant Biotechnology* **22**: 1–6
- Siaud N, Dray E, Gy I, Gérard E, Takvorian N, Doutriaux MP** (2004) Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1. *The EMBO Journal* **23**: 1392–1401
- Siddique A, Kandpal G, Kumar P** (2018) Proline accumulation and its defensive role under diverse stress condition in plants: an overview. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **12**: 1655–1659
- Singh A, Bhatnagar N, Pandey A, Pandey GK** (2015) Plant phospholipase C family: regulation and functional role in lipid signaling. *Cell Calcium* **58**: 139–146
- Singh K** (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 430–436
- Singh P, Chien CC, Mishra S, Tsai CH, Zimmerli L** (2013) The *Arabidopsis* LECTIN RECEPTOR KINASE-VI.2 is a functional protein kinase and is dispensable for basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior* **176**: e22611

- Sinha R, Irulappan V, Mohan-Raju B, Suganthi A, Senthil-Kumar M** (2019) Impact of drought stress on simultaneously occurring pathogen infection in field-grown chickpea. *Scientific Reports* **9**: 1–15
- Smirnova A, Li H, Weingart H, Aufhammer S, Burse A, Finis K, Schenk A, Ullrich M** (2001) Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Archives of Microbiology* **176**: 393–399
- Smyth GK** (2005) *limma: Linear models for microarray data*. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Springer-Verlag, New York, pp 397–420
- Snoeijs SS, Pérez-García A, Joosten MHAJ, De Wit PJGM** (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 493–506
- Somerville C** (2006) Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**: 53–78
- Sooriyaarachchi S, Jaber E, Covarrubias AS, Ubhayasekera W, Asiegbu FO, Mowbray SL** (2011) Expression and β -glucan binding properties of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) antimicrobial protein (Sp-AMP). *Plant Molecular Biology* **77**: 33–45
- Spadoni A, Guidarelli M, Phillips J, Mari M, Wisniewski M** (2015) Transcriptional profiling of apple fruit in response to heat treatment: Involvement of a defense response during *Penicillium expansum* infection. *Postharvest Biology and Technology* **101**: 37–48
- Spilatro SR, Cochran GR, Walker RE, Cablish KL, Bittner CC** (1996) Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. *Plant Physiology* **110**: 825–834
- Spitaler M, Cantrell DA** (2004) Protein kinase C and beyond. *Nature Immunology* **5**: 785–790
- Spoel SH, Dong X** (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* **12**: 89–100
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Brown R, Kazan K, et al** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* **15**: 760–770
- Spoel SH, Loake GJ** (2011) Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 358–364
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X** (2009) Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**: 860–872
- Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangl JL, Galan JE** (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292**: 2285–2289
- Stein H, Honig A, Miller G, Erster O, Eilenberg H, Csonka LN, Szabados L, Koncz C, Zilberstein A** (2011) Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. *Plant Science* **181**: 140–150
- Steinberger EM, Beer SV** (1988) Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **1**: 135
- Stepansky A, Galili G** (2003) Synthesis of the *Arabidopsis* bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase enzyme of lysine catabolism is concertedly regulated by metabolic and stress-associated signals. *Plant Physiology* **133**: 1407–1415
- Stewart A, Hill R** (2014) *Applications of Trichoderma in Plant Growth Promotion*. Biotechnology and Biology of Trichoderma. Elsevier, pp 415–428

- Stief A, Altmann S, Hoffmann K, Pant BD, Scheible W-R, Bäurle I** (2014) *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *The Plant Cell* **26**: 1792–1807
- Stillmark PH** (1888) Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceen. Inaugural dissertation. Dorpat, Tartu
- Stoeckli S, Mody K, Dorn S** (2008) *Aphis pomi* (Hemiptera: Aphididae) population development, shoot characteristics, and antibiosis resistance in different apple genotypes. *Journal of Economic Entomology* **101**: 1341–1348
- Stoger E, Williams S, Christou P, Down RE, Gatehouse JA** (1999) Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Molecular Breeding* **5**: 65–73
- Strenkert D, Schmollinger S, Sommer F, Schulz-Raffelt M, Schroda M** (2011) Transcription factor-dependent chromatin remodeling at heat shock and copper-responsive promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* **23**: 2285–2301
- Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shetty HS** (2011) Pathogenesis related proteins in plant defense response. *Plant defence: biological control*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 379–403
- Sugio A, Dreos R, Aparicio F, Maule AJ** (2009) The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 642–654
- Sumner JB** (1919) The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*. *Journal of Biological Chemistry* **37**: 137–142
- Sun L, Ren H, Liu R, Li B, Wu T, Sun F, Liu H, Wang X, Dong H** (2010) An h-type thioredoxin functions in tobacco defense responses to two species of viruses and an abiotic oxidative stress. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1470–1485
- Sun M, Jiang F, Cen B, Huo H, Wu Z** (2019) Antioxidant enzymes act as indicators predicting intension of acquired and maintenance of acquired thermotolerance and the relationships between basal, acquired and maintenance of acquired thermotolerance of tomato. *Scientia Horticulturae* **247**: 130–137
- Sun M, Qian X, Chen C, Cheng S, Jia B, Zhu Y, Sun X** (2018) Ectopic expression of GsSRK in *Medicago sativa* reveals its involvement in plant architecture and salt stress responses. *Frontiers in Plant Science* **9**: 226
- Sun T, Busta L, Zhang Q, Ding P, Jetter R, Zhang Y** (2017) TGACG-BINDING FACTOR 1 (TGA1) and TGA4 regulate salicylic acid and pipecolic acid biosynthesis by modulating the expression of SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE DEFICIENT 1 (SARD1) and CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60g (CBP60g). *New Phytologist* **217**: 344–354
- Sun T, Huang J, Xu Y, Verma V, Jing B, Sun Y, Ruiz Orduna A, Tian H, Huang X, Xia S, et al** (2020a) Redundant CAMTA transcription factors negatively regulate the biosynthesis of salicylic acid and N-hydroxypipicolic acid by modulating the expression of SARD1 and CBP60g. *Molecular Plant* **13**: 144–156
- Sun T, Zhang Y** (2020) Short- and long-distance signaling in plant defense. *The Plant Journal* **105**: 505–517
- Sun T, Zhang Y, Li Y, Zhang Q, Ding Y, Zhang Y** (2015) ChIP-seq reveals broad roles of SARD1 and CBP60g in regulating plant immunity. *Nature Communications* **6**: 1–12

- Sun X, Lapin D, Feehan JM, Stolze SC, Kramer K, Dongus JA, Rzemieniewski J, Blanvillain-Baufumé S, Harzen A, Bautor J, et al** (2021) Pathogen effector recognition-dependent association of NRG1 with EDS1 and SAG101 in TNL receptor immunity. *Nature Communications* **12**: 1–15
- Sun Y, Li L, Macho AP, Han Z, Hu Z, Zipfel C, Zhou JM, Chai J** (2013) Structural Basis for flg22-Induced Activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 Immune Complex. *Science* **342**: 624–628
- Sun Y, Qiao Z, Muchero W, Chen JG** (2020b) Lectin receptor-like kinases: the sensor and mediator at the plant cell surface. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1989
- Suza WP, Staswick PE** (2008) The role of JAR1 in Jasmonoyl-I-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta* **227**: 1221–1232
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R** (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**: 32–43
- Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Cogez V, Bonas U, Büttner D** (2010) Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *New Phytologist* **187**: 983–1002
- Szittyá G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas Á, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J** (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal* **22**: 633–640
- Taiz L** (2013) Agriculture, plant physiology, and human population growth: past, present, and future. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **25**: 167–181
- Takashi Y, Kobayashi Y, Tanaka K, Tamura K** (2009) *Arabidopsis* replication protein A 70a is required for DNA damage response and telomere length homeostasis. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1965–1976
- Tanaka K, Heil M** (2021) Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in plant innate immunity: applying the danger model and evolutionary perspectives. *Annual Review of Phytopathology* **59**: 53–75
- Tang Y, Zhang Z, Lei Y, Hu G, Liu J, Hao M, Chen A, Peng Q, Wu J** (2019) Cotton WATs modulate SA biosynthesis and local lignin deposition participating in plant resistance against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science* **10**: 526
- Tao F, Wang J, Guo Z, Hu J, Xu X, Yang J, Chen X, Hu X** (2018) Transcriptomic analysis reveal the molecular mechanisms of wheat higher-temperature seedling-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Frontiers in Plant Science* **9**: 240
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK** (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 260–270
- Tharaud M, Menggad M, Paulin JP, Laurent J** (1994) Virulence, growth, and surface characteristics of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. *Microbiology* **140**: 659–669
- Thibaud JB, Davidian JC, Sentenac H, Soler A, Grignon C** (1988) H⁺ Cotransports in corn roots as related to the surface pH shift induced by active H⁺ excretion. *Plant Physiology* **88**: 1469–1473
- Thibault B, Le Lezec M** (1990) Sensibilité au feu bactérien des principales variétés de pommier et de poirier utilisées en Europe. Programme de recherche Agrimed. Le feu bactérien des Pomoidae (*Erwinia amylovora*, Burill, Winslow et al.). Recherches appliquées conduites en Europe (1978-1988). Commission des communautés européennes, Luwembourg, pp 96–109
- Tholl D** (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 297–304

- Thomson SV** (2000) Epidemiology of fire blight. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, pp 9–36
- Thordal-Christensen H** (2020) A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**: 3963–3976
- Tian W, Wang C, Gao Q, Li L, Luan S** (2020) Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions. *Nature Plants* **6**: 750–759
- Tomczynska I, Stumpe M, Doan TG, Mauch F** (2020) A *Phytophthora* effector protein promotes symplastic cell-to-cell trafficking by physical interaction with plasmodesmata-localised callose synthases. *New Phytologist* **227**: 1467–1478
- Tonhati R, Mello SC, Momesso P, Pedroso RM** (2020) L-proline alleviates heat stress of tomato plants grown under protected environment. *Scientia Horticulturae* **268**: 109370
- Torres CA, Sepúlveda G, Kahlaoui B** (2017) Phytohormone interaction modulating fruit responses to photooxidative and heat stress on apple (*Malus domestica* Borkh.). *Frontiers in Plant Science* **8**: 2129
- Torres MA** (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* **138**: 414–429
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **37**: 1130–1134
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* **141**: 373–378
- Transue TR, Smith AK, Mo H, Goldstein IJ, Saper MA** (1997) Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nature Structural Biology* **4**: 779–783
- Trapp S, Croteau R** (2001) Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 689–724
- Treutter D** (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* **4**: 147–157
- Tripathi D, Jiang Y-L, Kumar D** (2010) SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Letters* **584**: 3458–3463
- Triplett LR, Melotto M, Sundin GW** (2009) Functional analysis of the N terminus of the *Erwinia amylovora* secreted effector DspA/E reveals features required for secretion, translocation, and binding to the chaperone DspB/F. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1282–1292
- Tsaneva M, Van Damme EJM** (2020) 130 years of plant lectin research. *Glycoconjugate Journal* **37**: 533–551
- Turechek WW** (2004) Apple diseases and their management. In SAMH Naqvi, ed, *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1–108
- Uma B, Swaroopa Rani T, Podile AR** (2011) Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology* **168**: 2141–2152
- Unsicker SB, Kunert G, Gershenzon J** (2009) Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 479–485
- Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, Atkinson HJ** (1997) Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *The Plant Journal* **12**: 455–461
- Vaid N, Macovei A, Tuteja N** (2013) Knights in action: Lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. *Molecular Plant* **6**: 1405–1418

- Vaid N, Pandey P, Srivastava VK, Tuteja N** (2015) Pea lectin receptor-like kinase functions in salinity adaptation without yield penalty, by alleviating osmotic and ionic stresses and upregulating stress-responsive genes. *Plant Molecular Biology* **88**: 193–206
- Vallad GE, Goodman RM** (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* **44**: 1920–1934
- Van Damme EJM** (2008) Plant lectins as part of the plant defense system against insects. In A Schaller, ed, *Induced plant resistance to herbivory*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 285–307
- Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ** (2004) Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends in Plant Science* **9**: 484–489
- Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ** (2008) Plant lectins. *Advances in Botanical Research* **48**: 107–209
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougé P** (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**: 575–692
- Van Der Biezen EA, Jones JDG** (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 454–456
- Van Holle S, Van Damme EJM** (2019) Messages from the past: new insights in plant lectin evolution. *Frontiers in Plant Science* **10**: 36
- Van Huijsduijnen RAMH, Alblas SW, De Rijk RH, Bol JF** (1986) Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins and resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species. *Journal of General Virology* **67**: 2135–2143
- Van Parijs J, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ** (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**: 258–264
- Van Parijs J, Joosen HM, Peumans WJ, Geuns JM, Van Laere AJ** (1992) Effect of the *Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Archives of Microbiology* **158**: 19–25
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT** (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 259–288
- Vandesompele, Preter D, Pattyn, Poppe, Roy V, Paepe D, Speleman** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**: 1–12
- Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY** (2018) Plant–pathogen warfare under changing climate conditions. *Current Biology* **28**: R619–R634
- Venisse JS, Barny MA, Paulin JP, Brisset MN** (2003) Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. *FEBS Letters* **537**: 198–202
- Venisse JS, Gullner G, Brisset MN** (2001) Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology* **125**: 2164–2172
- Vergne E, de Bernonville TD, Dupuis F, Sourice S, Cournol R, Berthelot P, Barny MA, Brisset MN, Chevreau E** (2014) Membrane-targeted HrpN_{Ea} can modulate apple defense gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 125–135

- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J** (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell* **6**: 959–965
- Vetter J** (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* **38**: 11–36
- Vieira Dos Santos C, Rey P** (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science* **11**: 329–334
- Vigers AJ, Wiedemann S, Roberts WK, Legrand M, Selitrennikoff CP, Fritig B** (1992) Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science* **83**: 155–161
- Vila L, Quilis J, Meynard D, Breitler JC, Marfà V, Murillo I, Vassal JM, Messeguer J, Guiderdoni E, San Segundo B** (2005) Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 187–202
- Vinatzer BA, Teitzel GM, Lee M-W, Jelenska J, Hotton S, Fairfax K, Jenrette J, Greenberg JT** (2006) The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Molecular Microbiology* **62**: 26–44
- Visser EA, Wegrzyn JL, Myburg AA, Naidoo S** (2018) Defence transcriptome assembly and pathogenesis related gene family analysis in *Pinus tecunumanii* (low elevation). *BMC Genomics* **19**: 1–13
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF** (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177–206
- Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, Park S-W, Yang Y, Kumar D, Zhou F, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E, et al** (2008) Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56**: 445–456
- Vogt I, Wöhner T, Richter K, Flachowsky H, Sundin GW, Wensing A, Savory EA, Geider K, Day B, Hanke M, et al** (2013) Gene-for-gene relationship in the host–pathogen system *Malus x robusta* 5 – *Erwinia amylovora*. *New Phytologist* **197**: 1262–1275
- Wallaart RAM** (1980) Distribution of sorbitol in *Rosaceae*. *Phytochemistry* **19**: 2603–2610
- Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM** (2013) Ribosome-inactivating proteins. *Virulence* **4**: 774–784
- Walters D, Newton A, Lyon G** (2007) Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. John Wiley & Sons (2014)
- Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G** (2005) Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* **95**: 1368–1373
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND** (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1263–1280
- Walton JD** (1994) Deconstructing the cell wall. *Plant Physiology* **104**: 1113–1118
- Wan J, Zhang XC, Stacey G** (2008) Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 831–833
- Wang C, Huang X, Li Q, Zhang Y, Li J-L, Mou Z** (2019a) Extracellular pyridine nucleotides trigger plant systemic immunity through a lectin receptor kinase/BAK1 complex. *Nature Communications* **10**: 1–14
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X** (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* **17**: 1784–1790
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* **308**: 1036–1040

- Wang J, Wang J, Shang H, Chen X, Xu X, Hu X** (2019b) TaXa21, a LRR-rich receptor like kinase associated with TaWRKY76 and TaWRKY62, plays positive roles in wheat high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**: 1526–1535
- Wang L, Tsuda K, Truman W, Sato M, Nguyen LV, Katagiri F, Glazebrook J** (2011) CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. *The Plant Journal* **67**: 1029–1041
- Wang M, Sun Y, Gu Z, Wang R, Sun G, Zhu C, Guo S, Shen Q** (2016a) Nitrate protects cucumber plants against *Fusarium oxysporum* by regulating citrate exudation. *Plant and Cell Physiology* **57**: 2001–2012
- Wang S, Durrant WE, Song J, Spivey NW, Dong X** (2010) *Arabidopsis* BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 22716–22721
- Wang S, Sun J, Fan F, Tan Z, Zou Y, Lu D** (2016b) A *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* effector, XopR, associates with receptor-like cytoplasmic kinases and suppresses PAMP-triggered stomatal closure. *Science China Life Sciences* **59**: 897–905
- Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M** (2006) A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* **27**: 2782–2786
- Wang X** (1999) The Role of Phospholipase D in Signaling Cascades. *Plant Physiology* **120**: 645–652
- Wang X, Bi W, Gao J, Yu X, Wang H, Liu D** (2018) Systemic acquired resistance, NPR1, and pathogenesis-related genes in wheat and barley. *Journal of Integrative Agriculture* **17**: 2468–2477
- Wang X, Sager R, Cui W, Zhang C, Lu H, Lee JY** (2013) Salicylic acid regulates plasmodesmata closure during innate immune responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 2315–2329
- Wang X, Yang F, von Bodman SB** (2012) The genetic and structural basis of two distinct terminal side branch residues in stewartan and amylovoran exopolysaccharides and their potential role in host adaptation. *Molecular Microbiology* **83**: 195–207
- Wang Y, Bao Z, Zhu Y, Hua J** (2009) Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 498–506
- Wang Y, Nsibo DL, Juhar HM, Govers F, Bouwmeester K** (2016c) Ectopic expression of *Arabidopsis* L-type lectin receptor kinase genes LecRK-I.9 and LecRK-IX.1 in *Nicotiana benthamiana* confers *Phytophthora* resistance. *Plant Cell Reports* **35**: 845–855
- Wang Y, Sun J, Ali SS, Gao L, Ni X, Li X, Wu Y, Jiang J** (2020) Identification and expression analysis of *Sorghum bicolor* gibberellin oxidase genes with varied gibberellin levels involved in regulation of stem biomass. *Industrial Crops and Products* **145**: 111951
- Wang Z, Cheng J, Fan A, Zhao J, Yu Z, Li Y, Zhang H, Xiao J, Muhammad F, Wang H, et al** (2017) LecRK-V, an L-type lectin receptor kinase in *Haynaldia villosa*, plays positive role in resistance to wheat powdery mildew. *Plant Biotechnology Journal* **16**: 50–62
- Wani SH, Anand S, Singh B, Bohra A, Joshi R** (2021) WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Reports* **40**: 1071–1085
- Warneys R, Gaucher M, Robert P, Aligon S, Anton S, Aubourg S, Barthes N, Braud F, Cournol R, Gadenne C, et al** (2018) Acibenzolar-S-methyl reprograms apple transcriptome toward resistance to rosy apple aphid. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1795
- Warren JR, Kowalski MM** (1977) Inhibition of ConA erythroagglutination by alkali-treated lipopolysaccharide. *Experimental Cell Research* **107**: 462–466
- Wasternack C, Hause B** (2019) The missing link in jasmonic acid biosynthesis. *Nature Plants* **5**: 776–777

- Watkins WM, Morgan WTJ** (1952) Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature* **169**: 825–826
- Webb B, Sali A** (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* **54**: 5–6
- Wei G, Liu RS, Wang Q, Liu WY** (2004) Toxicity of two type II ribosome-inactivating proteins (cinnamomin and ricin) to domestic silkworm larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **57**: 160–165
- Wei Z, Betz FS** (2006) Messenger®: An environmentally sound solution for crop production and protection. *Crop Protection Products for Organic Agriculture*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 195–211
- Wei ZM, Beer SV** (1995) hrpL activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *Journal of Bacteriology* **177**: 6201–6210
- Wei ZM, Sneath BJ, Beer SV** (1992) Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. *Journal of Bacteriology* **174**: 1875–1882
- Weidenbach D, Esch L, Möller C, Hensel G, Kumlehn J, Höfle C, Hüchelhoven R, Schaffrath U** (2016) Polarized defense against fungal pathogens is mediated by the jacalin-related lectin domain of modular Poaceae - specific proteins. *Molecular Plant* **9**: 514–527
- Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C** (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 1279–1291
- Weller DM** (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* **97**: 250–256
- Wendehenne D, Durner J, Chen Z, Klessig DF** (1998) Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* **47**: 651–657
- Wenig M, Ghirardo A, Sales JH, Pabst ES, Breitenbach HH, Anritter F, Weber B, Lange B, Lenk M, Cameron RK, et al** (2019) Systemic acquired resistance networks amplify airborne defense cues. *Nature Communications* **10**: 1–14
- Wenzel M, Gers-Barlag H, Schimpl A, Rüdiger H** (1993) Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **374**: 887–894
- Wenzel M, Rüdiger H** (1995) Interaction of pea (*Pisum sativum* L.) lectin with pea storage proteins. *Journal of Plant Physiology* **145**: 191–194
- Westphal L, Strehmel N, Eschen-Lippold L, Bauer N, Westermann B, Rosahl S, Scheel D, Lee J** (2019) pH effects on plant calcium fluxes: lessons from acidification-mediated calcium elevation induced by the γ -glutamyl-leucine dipeptide identified from *Phytophthora infestans*. *Scientific Reports* **9**: 1–14
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, et al** (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* **8**: 973–982
- Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen TL, Takahashi K, Wike C, Woo K, Yutani H, Dunnington D** (2020) ggplot2: Create elegant data visualisation using the grammar of graphics. R package, version 3.3.3.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562–565
- Wilson M** (1997) Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**: 188–191

- Wisniewski M, Fuchigami L, Wang Y, Srinivasan C, Norilli J** (2002) Overexpression of a cytosolic ascorbate peroxidase gene in apple improves resistance to heat stress. XXXVI International Horticultural Congress and Exhibition 144
- Withers J, Dong X** (2016) Posttranslational modifications of NPR1: a single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLOS Pathogens* **12**: e1005707
- Wöhner TW, Richter K, Sundin GW, Zhao Y, Stockwell VO, Sellmann J, Flachowsky H, Hanke M-V, Peil A** (2017) Inoculation of *Malus* genotypes with a set of *Erwinia amylovora* strains indicates a gene-for-gene relationship between the effector gene *eop1* and both *Malus floribunda* 821 and *Malus* 'Evereste'. *Plant Pathology* **67**: 938–947
- Wu DC, Zhu JF, Shu Z-Z, Wang W, Yan C, Xu SB, Wu DX, Wang CY, Dong Z, Sun G** (2020) Physiological and transcriptional response to heat stress in heat-resistant and heat-sensitive maize (*Zea mays* L.) inbred lines at seedling stage. *Protoplasma* **257**: 1615–1637
- Wu J, Kim SG, Kang KY, Kim JG, Park S-R, Gupta R, Kim YH, Wang Y, Kim ST** (2016) Overexpression of a pathogenesis-related protein 10 enhances biotic and abiotic stress tolerance in rice. *The Plant Pathology Journal* **32**: 552–562
- Wu J, Luo X, Guo H, Xiao J, Tian Y** (2006) Transgenic cotton, expressing *Amaranthus caudatus* agglutinin, confers enhanced resistance to aphids. *Plant Breeding* **125**: 390–394
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports* **1**: 639–647
- Wu Z, Han S, Zhou H, Tuang ZK, Wang Y, Jin Y, Shi H, Yang W** (2019) Cold stress activates disease resistance in *Arabidopsis thaliana* through a salicylic acid dependent pathway. *Plant, Cell & Environment* **42**: 2645–2663
- Xiang S, Wu S, Zhang H, Mou M, Chen Y, Li D, Wang H, Chen L, Yu D** (2020) The PIFs redundantly control plant defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plants* **9**: 1246
- Xiao C, Chen F, Yu X, Lin C, Fu Y-F** (2009) Over-expression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **71**: 39–50
- Xiao S, Brown S, Patrick E, Brearley C, Turner JG** (2003) Enhanced transcription of the *Arabidopsis* disease resistance genes RPW8. 1 and RPW8. 2 via a salicylic acid–dependent amplification circuit is required for hypersensitive cell death. *The Plant Cell* **15**: 33–45
- Xie Z, Zhang ZL, Hanzlik S, Cook E, Shen QJ** (2007) Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant Molecular Biology* **64**: 293–303
- Xin Z, Wang A, Yang G, Gao P, Zheng Z-L** (2008) The *Arabidopsis* A4 subfamily of lectin receptor kinases negatively regulates abscisic acid response in seed germination. *Plant Physiology* **149**: 434–444
- Xiong L, Yang Y** (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid–inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell* **15**: 745–759
- Xu J, Zhang L, Yang D, Li Q, He Z** (2015) Thymidine kinases share a conserved function for nucleotide salvage and play an essential role in *Arabidopsis thaliana* growth and development. *New Phytologist* **208**: 1089–1103
- Xu Q, Liu Y, Wang X, Gu H, Chen Z** (1998) Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 899–905

- Xu Y, Chang Pfl, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell* 1077–1085
- Xu Z, Zou L, Ma W, Cai L, Yang Y, Chen G** (2017) Action modes of transcription activator-like effectors (TALEs) of *Xanthomonas* in plants. *Journal of Integrative Agriculture* 16: 2736–2745
- Xue GP, Drenth J, McIntyre CL** (2014) TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. *Journal of Experimental Botany* 66: 1025–1039
- Yadeta KA, Hanemian M, Smit P, Hiemstra JA, Pereira A, Marco Y, Thomma BPHJ** (2011) The *Arabidopsis thaliana* DNA-Binding protein AHL19 mediates *Verticillium* wilt resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1582–1591
- Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I** (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* 103: 315–321
- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA** (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10104–10109
- Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, et al** (2012) Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *The Plant Cell* 24: 778–793
- Yan S, Dong X** (2014) Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology* 20: 64–68
- Yang R, Tang X** (1993) Tissue-specific accumulation of rice endosperm chitin-binding protein (ES-CBP) in developing seeds and its degradation in germination seeds. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 19: 195–203
- Yang S, Hua J** (2004) A haplotype-specific resistance gene regulated by BONZAI1 mediates temperature-dependent growth control in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 1060–1071
- Yao F, Song C, Wang H, Song S, Jiao J, Wang M, Zheng X, Bai T** (2020) Genome-wide characterization of the HSP20 gene family identifies potential members involved in temperature stress response in apple. *Frontiers in Genetics* 11: 1418
- Yazaki K** (2005) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters* 580: 1183–1191
- Yeh CH, Kaplinsky NJ, Hu C, Charng Y** (2012) Some like it hot, some like it warm: Phenotyping to explore thermotolerance diversity. *Plant Science* 195: 10–23
- Yekondi S, Liang FC, Okuma E, Radziejwoski A, Mai H-W, Swain S, Singh P, Gauthier M, Chien HC, Murata Y, et al** (2017) Nonredundant functions of *Arabidopsis* LecRK-V.2 and LecRK-VII.1 in controlling stomatal immunity and jasmonate-mediated stomatal closure. *New Phytologist* 218: 253–268
- Yi SY, Kim JH, Joung Y-H, Lee S, Kim W-T, Yu SH, Choi D** (2004) The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 2862–2874
- Yoo CY, Miura K, Jin JB, Lee J, Park HC, Salt DE, Yun D-J, Bressan RA, Hasegawa PM** (2006) SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in *Arabidopsis* independent of salicylic acid. *Plant Physiology* 142: 1548–1558

- Yu K, Soares JM, Mandal MK, Wang C, Chanda B, Gifford AN, Fowler JS, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P** (2013) A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Reports* **3**: 1266–1278
- Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou JM, He SY, Xin XF** (2021a) Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* **592**: 105–109
- Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin X-F** (2021b) PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102030
- Yuan P, Jauregui E, Du L, Tanaka K, Poovaiah B** (2017) Calcium signatures and signaling events orchestrate plant–microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 173–183
- Yuan X, Hulin MT, Sundin GW** (2020) Effectors, chaperones, and harpins of the Type III secretion system in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*: a review. *Journal of Plant Pathology* **103**: 25–39
- Zander M, Chen S, Imkampe J, Thurow C, Gatz C** (2012) Repression of the *Arabidopsis thaliana* jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif. *Molecular Plant* **5**: 831–840
- Zarattini M, Farjad M, Launay A, Cannella D, Soulié MC, Bernacchia G, Fagard M** (2020) Every cloud has a silver lining: how abiotic stresses affect gene expression in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **72**: 1020–1033
- 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
- Zemach A, Kim MY, Hsieh PH, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer SL, Zilberman D** (2013) The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* **153**: 193–205
- Zeng W, He SY** (2010) A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **153**: 1188–1198
- Zha X, Luo X, Qian X, He G, Yang M, Li Y, Yang J** (2009) Over-expression of the rice LRK1 gene improves quantitative yield components. *Plant Biotechnology Journal* **7**: 611–620
- Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y** (2009) Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3781–3796
- Zhang H, Sonnewald U** (2017) Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. *The Plant Journal* **90**: 839–855
- Zhang K, Halitschke R, Yin C, Liu C-J, Gan S-S** (2013) Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 14807–14812
- Zhang L, Chen L, Yu D** (2017a) Transcription factor WRKY75 interacts with DELLA proteins to affect flowering. *Plant Physiology* **176**: 790–803
- Zhang W, He SY, Assmann SM** (2008) The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *The Plant Journal* **56**: 984–996
- Zhang X, Gong X, Li D, Yue H, Qin Y, Liu Z, Li M, Ma F** (2021) Genome-wide identification of PRP genes in apple genome and the role of MdPRP6 in response to heat stress. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 5942

- Zhang Y, Bak DD, Heid H, Geider K** (1999a) Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. *Journal of Molecular Biology* **289**: 1239–1251
- Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X, Dong X** (1999b) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 6523–6528
- Zhang Y, Li X** (2019) Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 29–36
- Zhang Y, Xu S, Ding P, Wang D, Cheng YT, He J, Gao M, Xu F, Li Y, Zhu Z, et al** (2010) Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 18220–18225
- Zhang Y, Zhao L, Zhao J, Li Y, Wang J, Guo R, Gan S, Liu C-J, Zhang K** (2017b) S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiology* **175**: 1082–1093
- Zhao J, Lu Z, Wang L, Jin B** (2020) Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 117
- Zhao K, Zhang D, Lv K, Zhang X, Cheng Z, Li R, Zhou B, Jiang T** (2019) Functional characterization of poplar WRKY75 in salt and osmotic tolerance. *Plant Science* **289**: 110259
- Zhao Y, Blumer SE, Sundin GW** (2005) Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *Journal of Bacteriology* **187**: 8088–8103
- Zhao Y, He S-Y, Sundin GW** (2006) The *Erwinia amylovora* avrRpt2EA gene contributes to virulence on pear and AvrRpt2EA is recognized by *Arabidopsis* RPS2 when expressed in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 644–654
- Zhao Y, Qi M** (2011) Comparative Genomics of *Erwinia amylovora* and Related *Erwinia* Species — What do We Learn? *Genes* **2**: 627–639
- Zhao Y, Sundin GW, Wang D** (2009) Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants of *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Microbiology* **55**: 457–464
- Zheng X, Spivey NW, Zeng W, Liu PP, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X** (2012) Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host & Microbe* **11**: 587–596
- Zhou F, Pichersky E** (2020) More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **55**: 1–10
- Zhou H, Lin J, Johnson A, Morgan RL, Zhong W, Ma W** (2011) *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 targets a host enzyme to suppress isoflavone biosynthesis and promote infection in soybean. *Cell Host & Microbe* **9**: 177–186
- Zhou J, Wang J, Cheng Y, Chi YJ, Fan B, Yu JQ, Chen Z** (2013) NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genetics* **9**: e1003196
- Zhou Z, Wu Y, Yang Y, Du M, Zhang X, Guo Y, Li C, Zhou JM** (2015) An *Arabidopsis* plasma membrane proton ATPase modulates JA signaling and is exploited by the *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB for stomatal invasion. *The Plant Cell* **27**: 2032–2041
- Zhu B, Ye C, Lü H, Chen X, Chai G, Chen J, Wang C** (2006) Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, GmHsfA1, in soybeans (*Glycine max*). *Journal of Plant Research* **119**: 247–256

- Zhu H, Dardick CD, Beers EP, Callanhan AM, Xia R, Yuan R** (2011) Transcriptomics of shading-induced and NAA-induced abscission in apple (*Malus domestica*) reveals a shared pathway involving reduced photosynthesis, alterations in carbohydrate transport and signaling and hormone crosstalk. *BMC Plant Biology*. **11**: 1–20
- Zhu K, Huesing JE, Shade RE, Bressan RA, Hasegawa PM, Murdock LL** (1996) An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (*Leguminosae*). *Plant Physiology* **110**: 195–202
- Zhu T, Herrfurth C, Xin M, Savchenko T, Feussner I, Goossens A, De Smet I** (2021) Warm temperature triggers JOX and ST2A-mediated jasmonate catabolism to promote plant growth. *Nature Communications* **12**: 1–8
- Zhu Y, Qian W, Hua J** (2010) Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *PLoS Pathogens* **6**: e1000844
- Ziadi S, Poupard P, Brisset MN, Paulin JP, Simoneau P** (2001) Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**: 33–43
- Ziegler J, Facchini PJ** (2008) Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 735–769
- Zimmermann L, Stephens A, Nam S-Z, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva V** (2018) A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *Journal of Molecular Biology* **430**: 2237–2243
- Zipfel C** (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* **35**: 345–351
- Zou M, Yuan L, Zhu S, Liu S, Ge J, Wang C** (2016) Effects of heat stress on photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of a heat-sensitive and heat-tolerant cultivar of wucaï (*Brassica campestris* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* **39**: 1–10
- van der Zwet T, Orolaza-Halbrecht N, Zeller W** (2012) Chapter 10: The disease cycle of fire blight. Fire blight: history, biology, and management. The American Phytopathological Society, pp 155–182

Table des matières

1	INTRODUCTION	1
1.1	Généralités sur l'immunité végétale	3
1.1.1	Mécanismes de défense passifs	3
1.1.1.1	Barrières physiques	4
1.1.1.2	Composés antimicrobiens préformés	5
1.1.2	Reconnaissance et mécanismes de défense actifs	6
1.1.2.1	Immunité basale déclenchée par la reconnaissance de PAMPs/DAMPs	6
1.1.2.2	Immunité basale réprimée par les effecteurs	7
1.1.2.3	Immunité spécifique déclenchée par la relation <i>R/avr</i>	8
1.1.2.4	Modèle de co-évolution en zig-zag	9
1.1.3	Voies de signalisation impliquées dans les défenses	9
1.1.3.1	Signalisation intracellulaire	10
1.1.3.1.1	Accumulation de ROS	10
1.1.3.1.2	Signalisation calcique	11
1.1.3.1.3	Kinases et facteurs de transcription	12
1.1.3.2	Signalisation intercellulaire	13
1.1.3.2.1	Biosynthèse du SA	14
1.1.3.2.2	Régulation de la biosynthèse du SA	14
1.1.3.2.3	Perception et activation des gènes SA-dépendants	15
1.1.3.2.4	Définition de la SAR	17
1.1.3.2.5	Les acteurs de la SAR	18
1.1.3.3	Autres phytohormones impliquées dans les défenses	19
1.1.3.3.1	Acide jasmonique (JA)	20
1.1.3.3.2	Ethylène (ET)	20
1.1.3.3.3	Interaction du JA et de l'ET avec le SA	21
1.1.4	Réponses de défense	21
1.1.4.1	Isolement du bioagresseur	22
1.1.4.2	Production de protéines PR	23
1.1.4.3	Synthèse de métabolites	25
1.2	Les stimulateurs de défenses des plantes	26
1.2.1	Définition et exemples de SDP	26
1.2.2	Acibenzolar-S-methyl	28
1.2.3	Efficacité des SDP	29
1.3	Cas particulier du pathosystème pommier-<i>E. amylovora</i>	30
1.3.1	Le pommier	30
1.3.2	Le feu bactérien	31
1.3.3	Facteurs de virulence et d'agressivité	32
1.3.4	Sensibilité et résistance au feu bactérien	35
1.3.4.1	QTL de résistance à <i>Erwinia amylovora</i>	35
1.3.4.2	Les défenses du pommier face à <i>E. amylovora</i>	35
2	CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU FACTEUR DE RÉSISTANCE INDUIT PAR L'ASM, LES MDAGGS	38
2.1	Généralités sur les lectines végétales	38
2.1.1	Historique et définition des lectines	38
2.1.2	Classification des lectines végétales	39
2.1.2.1	Classification selon le nombre de sites de fixation et leur spécificité	39
2.1.2.2	Classification selon leur séquence nucléotidique et leur structure tertiaire	40
2.1.2.3	Classification selon leur localisation et leur inductibilité	40
2.1.3	Fonction des lectines chez les plantes	41
2.1.3.1	Rôle lié au stockage protéique	41
2.1.3.2	Rôle de senseur cellulaire	41
2.1.3.3	Rôle dans les symbioses racinaires	42
2.1.3.4	Rôle dans les défenses	43
2.2	Découverte de lectines induites par l'ASM chez le pommier	45
2.2.1	Les MdAGGs, une nouvelle famille de protéines induites par l'ASM	45

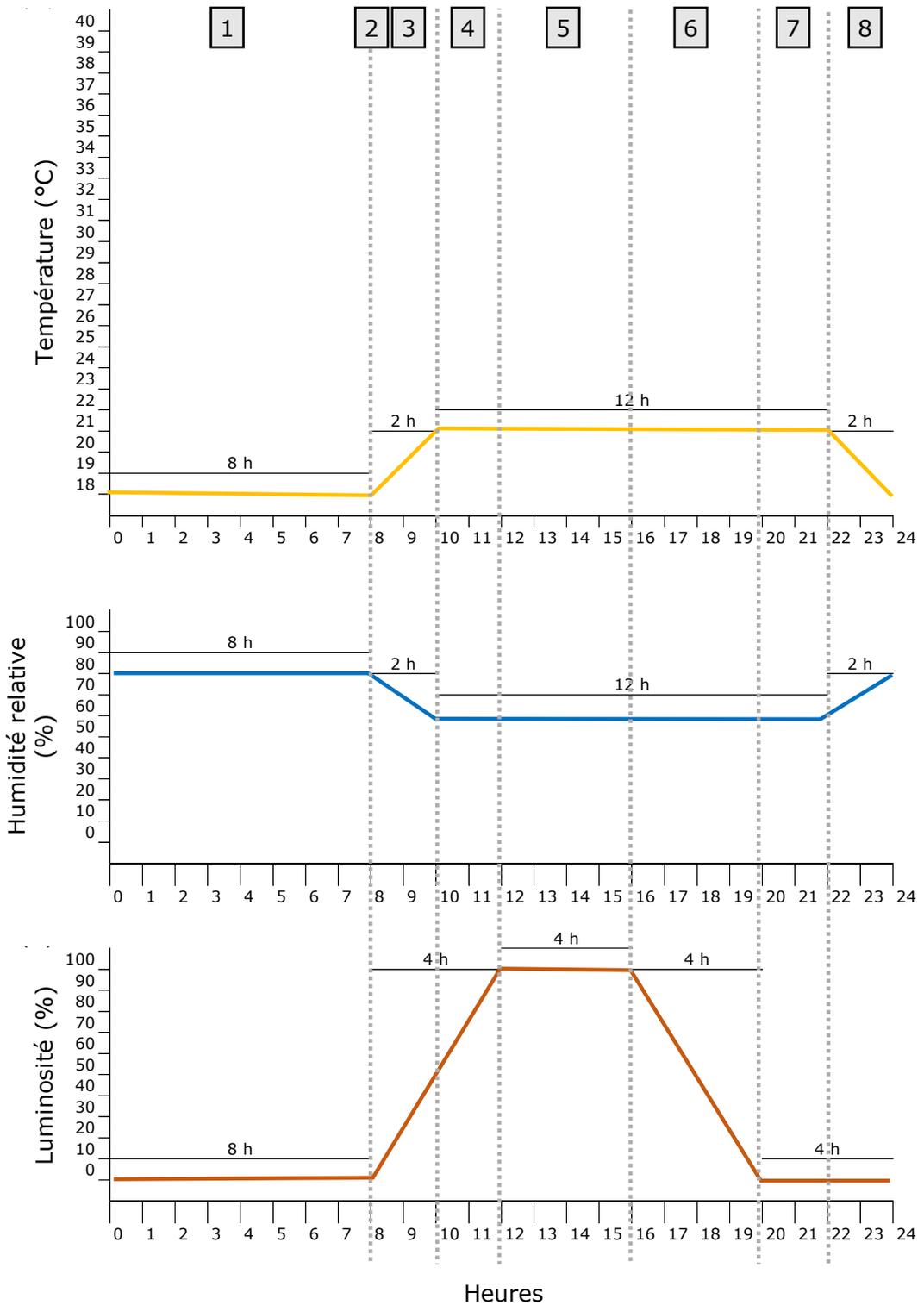
2.2.2	Modélisation de la structure tridimensionnelle de la MdAGG10	46
2.3	Développement méthodologique pour étudier le comportement des MdAGGs	47
2.3.1	Méthodes antérieures d'analyse transcriptionnelle et protéique.....	47
2.3.2	Evaluation de différentes méthodes d'extraction des MdAGGs	47
2.3.3	Optimisation de l'extraction phénolique des MdAGGs.....	48
2.4	Comportement transcriptionnel et protéique des MdAGGs	49
2.4.1	Comportement basal dans les parties aériennes	49
2.4.2	Expression des MdAGGs et efficacité de différents SDP candidats	50
2.4.3	Cinétique d'induction et d'accumulation dans la jeune feuille (JF) traitée à l'ASM	50
2.4.4	Comportement systémique après une élicitation locale à l'ASM.....	51
2.4.5	Détection apoplastique des protéines dans les feuilles traitées à l'ASM	52
2.4.6	Etude du comportement des MdAGGs au regard de la la persistance d'action de l'ASM vis-à-vis du feu bactérien.....	52
2.4.7	Induction des <i>MdAGGs</i> par l'ASM dans différents organes de l'arbre en verger	53
2.4.8	Expression basale des <i>MdAGGs</i> dans les fleurs et les pédoncules floraux de différentes variétés	54
2.5	Modulation de l'expression des <i>MdAGGs</i> en réponse à l'infection par <i>E. amylovora</i>	55
2.5.1	Modulation T3SS-dépendante après infection de génotypes résistants ou sensibles ...	55
2.5.2	Rôle des facteurs de pathogénicité dans la répression des <i>MdAGGs</i> dans un génotype sensible	56
2.6	Etude fonctionnelle du rôle des MdAGGs <i>in vitro</i>	57
2.6.1	Synthèse de la MdAGG10 recombinante.....	57
2.6.2	Tests d'agglutination bactérienne <i>in vitro</i>	58
2.6.3	Tests d'inhibition de croissance bactérienne	59
2.6.4	Oligomérisation de la MdAGG10 selon le pH	59
2.6.5	Implication des charges électriques dans l'interaction de MdAGG10 avec les ligands..	60
2.7	Discussion	61
3	ETUDE DE L'EFFET DE LA CHALEUR SUR L'EFFICACITÉ DE L'ASM.....	68
3.1	Généralités sur les stress biotiques combinés aux stress abiotiques : exemple de la chaleur.....	68
3.1.1	Défenses des plantes faces aux contraintes environnementales.....	68
3.1.1.1	Rôle du statut physiologique dans la pathogénie.....	68
3.1.1.2	Impact des stress abiotiques sur les défenses	69
3.1.2	Impact de la chaleur sur la physiologie et les défenses	70
3.1.2.1	Impacts négatifs d'un stress chaleur sur la plante	70
3.1.2.2	Perception de la chaleur	71
3.1.2.3	Régulation de la réponse à la chaleur	72
	Régulation épigénétique	73
	Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle	74
	Régulation hormonale.....	75
3.1.2.4	Acteurs de la tolérance à la chaleur	75
	HSP75	
	Antioxydants et osmoprotectants	76
	Dégradation des protéines	77
	Modification de la composition lipidique.....	77
	Thermorégulation.....	78
3.1.2.5	Réchauffement et thermotolérance	78
3.1.2.6	Impact de la chaleur dans les interactions plante- pathogène	79
3.2	Mise au point des conditions thermiques impactant l'efficacité de l'ASM	81
3.2.1	Etude préliminaire vérifiant un effet de la chaleur sur l'ASM	82
3.2.2	Etude des conditions environnementales en verger	82
3.2.3	Effet de vagues de chaleur « naturelles » sur l'efficacité de protection de l'ASM vis-à-vis d' <i>E. amylovora</i>	83
3.3	Reprogrammation transcriptomique du pommier en réponse à l'ASM et/ou à la chaleur	86
3.3.1	Expériences et comparaisons réalisées pour l'analyse transcriptomique.....	86

3.3.2	Effectifs des transcrits différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons	87
3.3.3	Ontologie des gènes différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons ..	88
	Catégories fonctionnelles modulées par l'ASM dans les deux modalités de température	88
	Catégories fonctionnelles modulées par la température dans les plantes traitées à l'eau d'une part et à l'ASM d'autre part	89
	Catégories fonctionnelles modulées par l'ASM en condition normale, mais au comportement modifié par la chaleur	90
3.3.4	Partitionnement des données par la méthode CAST	91
3.3.5	Validation des marqueurs issus de l'analyse transcriptomique	93
3.4	Analyse ciblée de quelques marqueurs chez le pommier en réponse à l'ASM et/ou la chaleur	95
3.4.1	Comportement transcriptionnel et protéique de MdAGGs, MdPR-2 et MdPR-10	95
3.4.2	Comportement des marqueurs pré-sélectionnés dans différentes situations d'application d'un stress chaleur	95
3.5	Discussion	96
	Marqueurs moins induits par l'ASM en condition de chaleur	101
	Marqueurs moins réprimés par l'ASM en condition de chaleur	104
4	CONCLUSION GÉNÉRALE	108
5	MATÉRIELS ET MÉTHODES	111
5.1	Matériel végétal et conditions de culture	111
5.1.1	Matériel végétal	111
5.1.2	Conditions de culture semi-contrôlées	112
5.1.3	Conditions de culture contrôlées	112
5.2	SDP candidats et procédures d'application	113
5.3	Souches bactériennes et procédures d'inoculation	113
5.3.1	Souches bactériennes et dosages des inocula	113
5.3.2	Méthodes d'inoculation	114
5.4	Évaluation de l'incidence et de la sévérité du feu bactérien	114
5.5	Mesure du pH apoplastique et des fuites d'électrolytes	115
5.6	Échantillonnage dédié à l'analyse des défenses	115
5.7	Analyse transcriptionnelle	116
5.7.1	Extraction d'ARN	116
5.7.2	Rétrotranscription (RT)	116
5.7.3	PCR quantitative (qPCR)	116
5.8	Analyse transcriptomique par microarray	117
5.8.1	Extraction, amplification et marquage	117
5.8.2	Hybridations et scans des puces	117
5.9	Analyse protéique	118
5.9.1	Extraction protéique des tissus	118
5.9.2	Extraction des fluides apoplastiques	119
5.9.3	Dosage et migration SDS-PAGE	119
5.9.4	Transfert et immunodétection	120
5.10	Production et caractérisation de la protéine MdAGG10 recombinante	121
5.10.1	Production de la MdAGG10	121
5.10.2	Chromatographie d'exclusion stérique	121
5.10.3	Spectrophotométrie par fluorescence	122
5.10.4	Modélisation de la structure tridimensionnelle <i>in silico</i>	122
5.11	Tests d'agglutination	123
5.12	Tests d'inhibition de croissance bactérienne	123
5.13	Analyse de données et statistiques	124
6	BIBLIOGRAPHIE	125

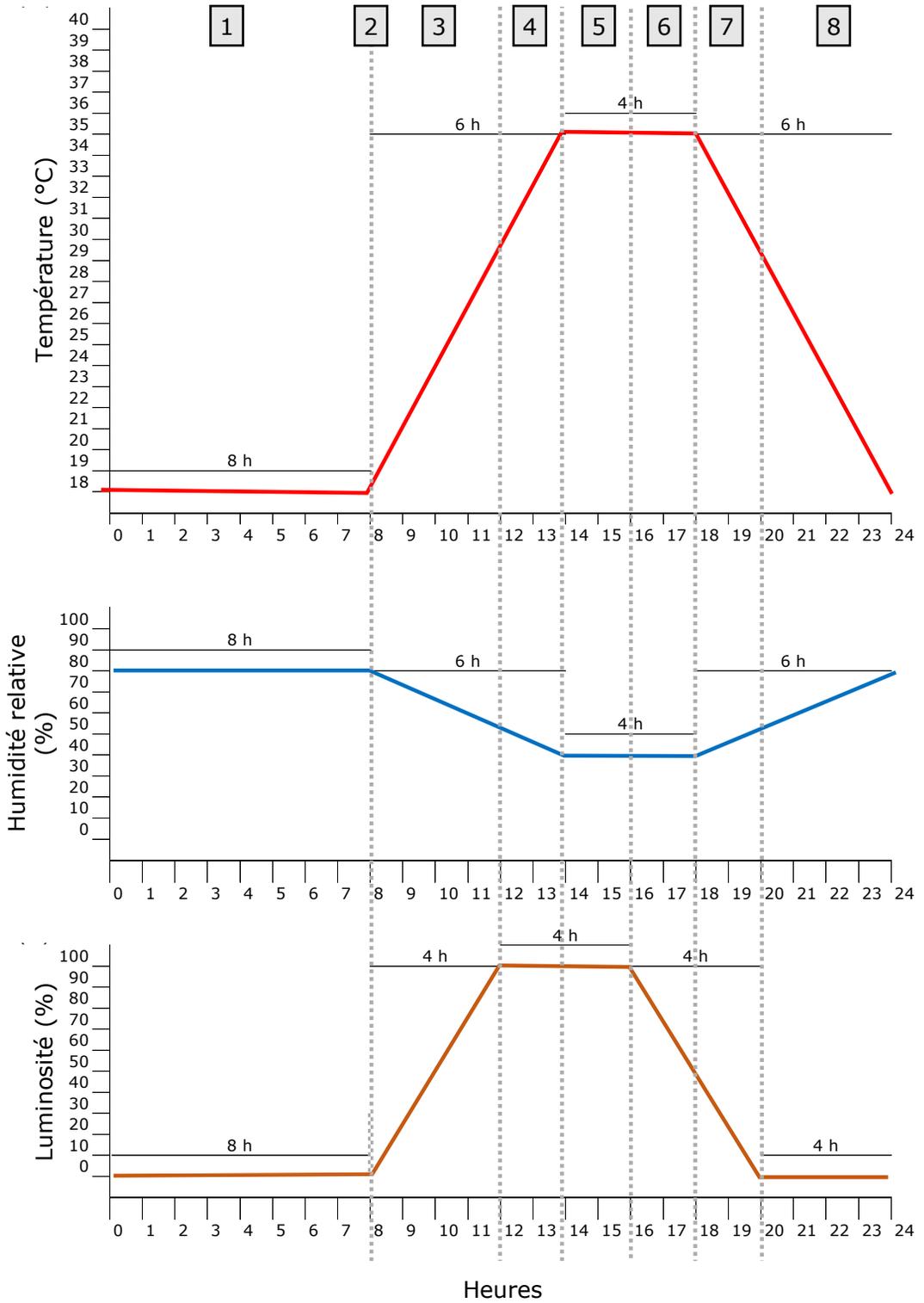
Annexes

Annexe 1 : Changement journalier de température, d'humidité relative et de luminosité des programmes témoin (A), mimant une vague de chaleur « naturelle » (B) et une vague de chaleur « brutale » (C).

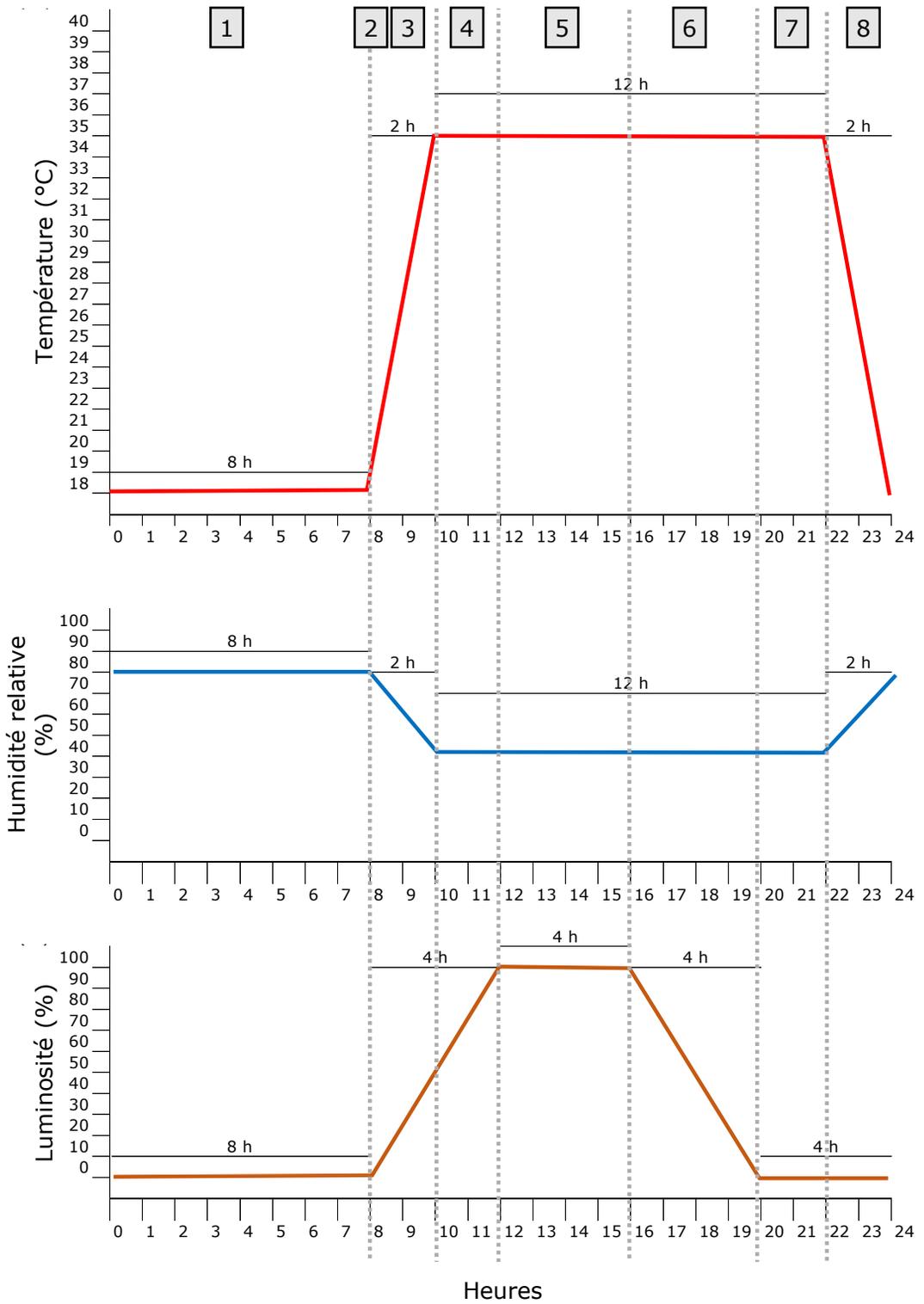
A



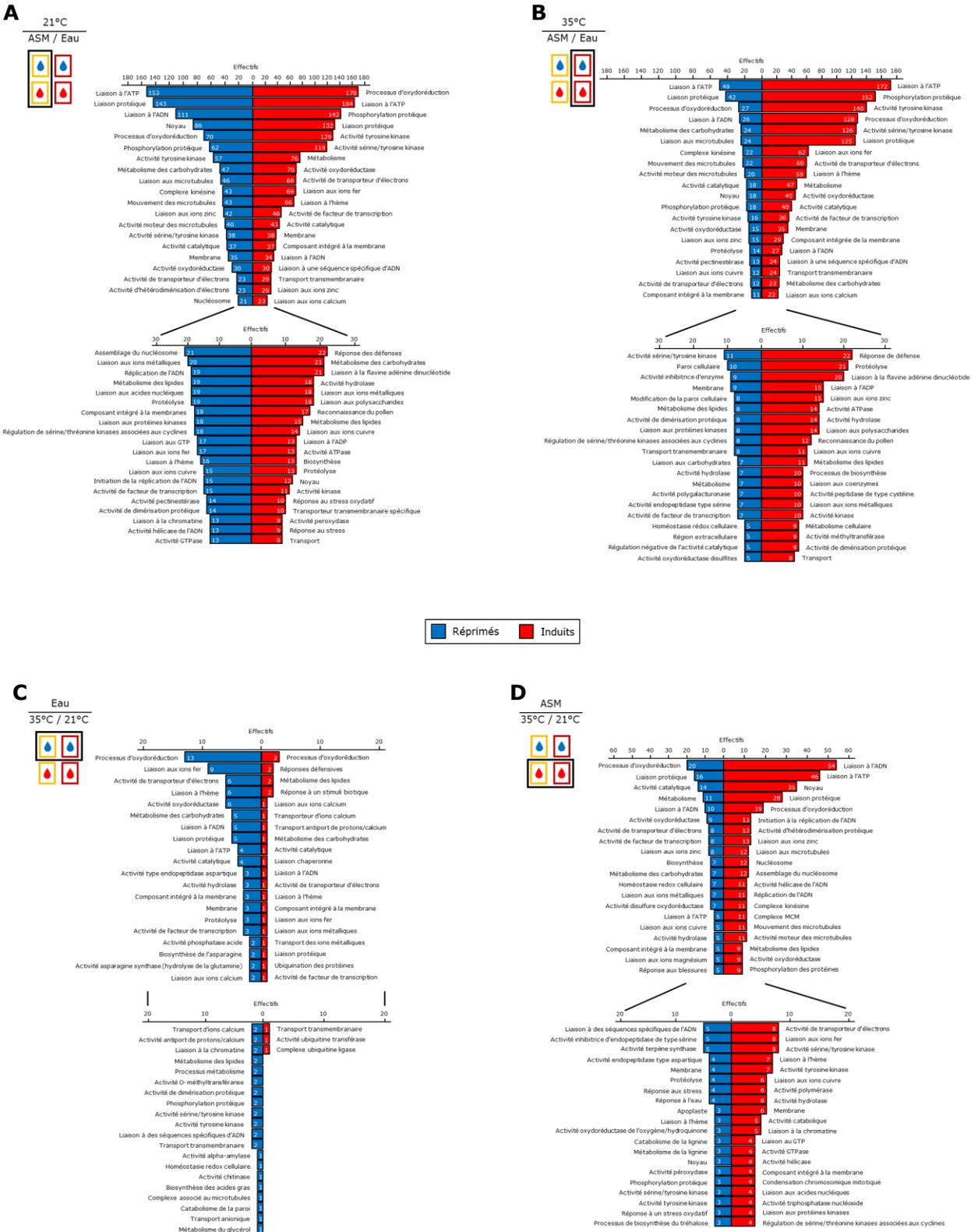
B



c



Annexe 2 : Ontologie globale regroupant le processus biologique, le compartiment cellulaire et la fonction moléculaire des gènes sous- ou surexprimés par l'ASM 3 jours après application pour des greffes exposées à l'enchaînement de programme témoin (A) ou 4 h x 3 (B), et par 3 vagues de chaleur 2 jours après la fin de la dernière vague pour des greffes GDDH13 traitées à l'eau (C) ou à l'ASM (D) 3 jours auparavant. Les 40 premières classes d'ontologies sont les plus représentées sont affichées.



Annexe 3 : Séquences, accessions et concentration ([C]) des amorces utilisées. Les accessions ciblées sans ou avec SNP au niveau des amorces sont indiquées en gras ou non respectivement. Les 3 gènes de référence utilisés pour calculer les expressions relatives sont Actin, TuA et GAPDH.

Cible	Protéine codée	Accession	Séquences des amorces	[C] (nM)
<i>ARA</i>	Arabinose kinase	MD08G1124400 MD15G1103100	di 5'-TGCCTTTATGGGTCGGAAGATG-3' re 5'-GAGGTGACAGGTTGCACAAGTA-3'	200
<i>AHL</i>	Predicted AT-hook DNA-binding family protein	MD08G1196300 MD15G1384100	di 5'-AAGAAGAAGACACCAGCCGAA-3' re 5'-GGGCCGTCGGATGACTT-3'	200
<i>BIS2</i>	Biphenyl-synthase 2	MD14G1160800 MD15G1132000 MD04G1111500 MD08G1116200 MD14G1160900 MD15G1131700 MD15G1132300	di 5'-CCTGATTTCTTGTTCGAGTAC-3' re 5'-TTGGACCTCAGGGTTCA-3'	200
<i>BGAL12</i>	Beta-galactosidase 12	MD15G1206800 MD02G1079200	di 5'-CCGTGTATGGTCATTGGAGAA-3' re 5'-CAACGTGATCGGCCTAGAA-3'	200
<i>BXL1</i>	Beta-xylosidase 1	MD13G1157400 MD16G1158300	di 5'-CGAGGTACACAAGGACCATACAC-3' re 5'-GGTCTCTGAACTCTGCTTCGATT-3'	200
<i>CDNAJ</i>	Chaperone DnaJ-domain	MD10G1121200	di 5'-GCCTACAGAAAGCTAGCCAGAA-3' re 5'-ATCCCTGTCGTAGTTTGCTCTTT-3'	100
<i>Crypt</i>	Cryptdin protein-related	MD09G1199000	di 5'-GCCATGGTACTGTCTCCGATTT-3' re 5'-TGGACAGAGAGTTAATTGGTGGTG-3'	300
<i>GAL</i>	D-mannose binding lectin protein with Apple-like carbohydrate-binding domain	MD03G1242400 MD11G1262600 MD11G1262100	di 5'-ATGCCTTCACTCTTGCTCTACG-3' re 5'-TGTTGGCGGTGTTGCTTTG-3'	400
<i>GibOx1</i>	Arabidopsis thaliana gibberellin 2-oxidase 1	MD10G1194100	di 5'-CTCCGCTGAAGCCATATCAA-3' re 5'-GTGTCTAAACGGAGGGAGGAAAG-3'	200
<i>GST7</i>	Glutathione S-transferase tau 7	MD05G1184300	di 5'-AGACTTGGCTTTGGGATGGATAG-3' re 5'-CTCCTTGATCTCAGGCACATCTT-3'	200
<i>LAC7</i>	Laccase 7	MD16G1147100 MD04G1142300	di 5'-CTGACGATACTGTCGGCTTTGA-3' re 5'-TGAGGTTGGGCATGGG-3'	200
<i>LKR/SDH</i>	Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	MD02G1105000 MD02G1105300	di 5'-GCTAGCTATGTTGATGAATCCATGTC-3' re 5'-CATATGATCTATCCCAGGGTCCAAG-3'	200
<i>PR-6</i>	Serine protease inhibitor	MD13G1208700	di 5'-TGGGCTCAGAATGTGAAGTAAG-3' re 5'-GTCAACCCATACCCAACCTAT-3'	200

<i>ExCaNa</i>	Sodium/calcium exchanger family protein / calcium-binding EF hand family protein	MD10G1284700 MD10G1284800 MD10G1284900	di 5'-CCTTCTTTCACGACCTCGTATGT-3' re 5'-GTTTCATGAATGCCGCGTTGTAA-3'	200
<i>TPS4</i>	Terpene synthase 4	MD17G1080700 MD17G1080500 MD17G1080800 MD17G1080400 MD17G1080300	di 5'-AGGAGAAAGTGAGCTTGAGGATG-3' re 5'-ACCGAGCAAGCCATGGAATA-3'	200
<i>TRX</i>	Thioredoxin	MD10G1311900 MD05G1336400	di 5'-CTTCGGTGGCTATGAACTCATTCT-3' re 5'-CGTTGCACCGTCCCTTATCA-3'	200
<i>G76E2</i>	UDP-glucosyl transferase 76E2	MD03G1082200 MD03G1081900	di 5'-GAGAAAGAGGGAAGAATGGAGATGG-3' re 5'-GGGAGTTGAACTGGGTGTGAATA-3'	200
<i>WRKY75</i>	WRKY DNA-binding protein 75	MD13G1122100 MD16G1122400	di 5'-GCTACTACAGGTGCACACATCA-3' re 5'-TCAGTAGACTTCTCGATGGGATGA-3'	100
<i>ANT</i>	Integrase-type DNA-binding superfamily protein (ANT)	MD08G1077100	di 5'-AGCGCCAGCCATTGAGTATAA-3' re 5'-CTCACTGAACCGACCGATTCT-3'	200
<i>AP2B3</i>	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	MD03G1047900	di 5'-TGACCCACTTGACTGCTTCTC-3' re 5'-CTCAAAGCGGGAAGTCTATGT-3'	200
<i>ATXR6</i>	ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED PROTEIN 6 (ATXR6)	MD01G1224300	di 5'-GCTTGGTGGTCTCGAAGAAGAA-3' re 5'-GGCGCCATTCCAGGGATATAA-3'	200
<i>BRCA1</i>	Breast cancer susceptibility 1	MD05G1060000 MD10G1256100	di 5'-GGTAGACTAAGGCTGCAGAACAA-3' re 5'-CCCTCTGGAACAGGCTTCTT-3'	200
<i>BRCA2</i>	BRCA2-like B	MD01G1008700	di 5'-ATGGTCACCGTCTGCAATTA-3' re 5'-CTCGACTTTCGAGCACTACTAT-3'	400
<i>CDC6</i>	Cell division control 6	MD03G1072700 MD11G1078800	di 5'-CTAGAAGGAAGATGACGTGGTAATAG-3' re 5'-TCGGCTAGGTCTATGGCATTG-3'	100
<i>DDM1</i>	Chromatin remodeling 1	MD02G1149400 MD15G1264100	di 5'-CCAACCTCGGAAGAACTGCAATC-3' re 5'-GCGGGCAAACAGGTACTTTAAC-3'	200
<i>CMT3</i>	Chromomethylase 3	MD03G1011100 MD11G1012800	di 5'-GGGAATGCCGTTGCTTATGATG-3' re 5'-AGCCTCTGAACTCTGTCTTGG-3'	200
<i>CLV3</i>	CLAVATA3/ESR-RELATED 16	MD13G1023500	di 5'-CCAGGCAAGCTATACGGAGATG-3' re 5'-TACACAGGAGAAACAGCGGAAG-3'	100
<i>DEL1</i>	DP-E2F-like 1	MD06G1181700	di 5'-CCCTAGTTGGATGCATTCTCTCT-3' re 5'-CATACGCAGCACGTCTCTAACT-3'	100

<i>dUTPase1</i>	DUTP-PYROPHOSPHATASE-LIKE 1	MD08G1034400 MD08G1034500 MD15G1031300	di 5'-CTGAAGGAACCTATGCACGAATTG-3' re 5'-GCAATCCTATCACCCCTCCTTGA-3'	200
<i>FLA12</i>	FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 12	MD03G1114700 MD03G1114600 MD11G1133200	di 5'-TCCCAGATTTCACTACTACCCAAA-3' re 5'-CAGAATAGACAGTGCCTGAGATTGA-3'	200
<i>H2A.W7</i>	Histone H2A.W7	MD12G1215400 MD04G1201800	di 5'-GTACCGGCGCTCCCATTTA-3' re 5'-AAGCTCCTCGTCGTTTCTCAC-3'	400
<i>Hop2</i>	Arabidopsis Hop2 homolog	MD16G1044800 MD13G1044000	di 5'-AGCGAGTTGAGGGAGAAATAAA-3' re 5'-TCTGGCTTGACCAACGTAAC-3'	300
<i>IQ6</i>	IQ-domain 6	MD08G1064300 MD15G1057400	di 5'-GCATTCAAGAGGGAGAGAGCAA-3' re 5'-AACGCTCTAACCAACTCCATCC-3'	200
<i>MYB66</i>	myb domain protein 66	MD16G1093200	di 5'-GAGCCCTTTTCGTTGTCTCTTA-3' re 5'-GGCCACTTCCATGTACCCTTT-3'	200
<i>ENODL17</i>	Early nodulin-like protein 17	MD17G1223900	di 5'-ATTTGAGAGCCCTTCGACTATTT-3' re 5'-CTCCCTGCCAAGTCTATGGTTT-3'	300
<i>NPK1</i>	NPK1-related protein kinase 3	MD13G1186500 MD16G1187200	di 5'-GGACATCAAGGGTGCAAACATC-3' re 5'-GCTATGGCCAGTCTGGAGAATAA-3'	200
<i>PAT9</i>	PATATIN-like protein 9	MD11G1284700 MD03G1264100	di 5'-CAGAATTCAGGCGTTCGGATTG-3' re 5'-TCTCCGTTTGTCTCCGTCATAA-3'	200
<i>RING1</i>	Breast cancer associated RING 1	MD10G1178800 MD05G1192200	di 5'-CTCAGAAGAAGTCTGGAACGA-3' re 5'-CAGCTATATCCTGGGCTCATT-3'	200
<i>RPA70</i>	RPA70-kDa subunit B	MD14G1212400 MD06G1225500	di 5'-CATCGCTGATCAATCTCCCATAGT-3' re 5'-CATAACAGGACCGCAACTTCT-3'	200
<i>StMC2</i>	Structural maintenance of chromosomes 2	MD01G1182300 MD07G1252800	di 5'-CTGCTGGGACGAGAATGTATGA-3' re 5'-CCAAGTCAGCGTTTCCATTAGC-3'	200
<i>Subt1.3</i>	Subtilase 1.3	MD01G1190400 MD01G1189600 MD01G1189900 MD01G1189100 MD01G1188800	di 5'-TGTGATTTGGGAAGCAATTCAACT-3' re 5'-CACGGTCGCAAAATCACAATCTT-3'	200
<i>ThyK</i>	Thymidine kinase	MD09G1121200 MD17G1112200	di 5'-GATACGCCATTGATTCGGTTGTG-3' re 5'-AAACTGAGCCTCGTCGATTCC-3'	200
<i>WEE1</i>	WEE1 kinase homolog	MD11G1303200 MD03G1283400 MD11G1302700	di 5'-GCCGCAAGAAATCCTGAATGAG-3' re 5'-AACGAATGACCAGGAAGGAGTG-3'	200

<i>HSP40</i>	Heat shock protein 40	MD10G1289200 MD05G1310300	di 5'-CCCAAAGACCCCTCCAAGAA-3' re 5'-TTCACATAGCACATCGGCTC-3'	200
<i>HSP90.1</i>	Heat shock protein 90.1	MD01G1208700	di 5'-AATTACCCGGATGTTGAAGC-3' re 5'-TGACATCCAATTGACTCCA-3'	200
<i>HSP101</i>	Heat shock protein 101	MD06G1201600	di 5'-GCAGAAGTCGGATGTGTTGA-3' re 5'-CCGGAAGTGTCTGCATTTT-3'	200
<i>PR-2</i>	β -1,3-glucanase	MD14G1079900 MD12G1083700 MD12G1083900 MD12G1084100 MD14G1078700	di 5'-AATTGTTATATCGGAGAGTG-3' re 5'-TGGCAAAGATGTAAGTTTC-3'	400
<i>PR-10</i>	Ribonuclease-like	MD13G1160900 MD13G1161100 MD13G1161300 MD16G1160400 MD16G1160500 MD16G1161100 MD16G1161400 MD16G1161500	di 5'-CCTGCTAGGTTGTACAATGCTCT-3' re 5'-GTCAATTCATCAACCTTGTGCT-3'	200
<i>AGG</i>	Agglutinine	MD10G1026620 MD10G1027230 MD10G1027240 MD10G1027260 MD10G1026610 MD10G1026810 MD10G1026820 MD10G1027010 MD10G1027030 MD10G1027110 MD10G1027210 MD10G1027220 MD10G1027250 MD06G1232610	di 5'-CAGCTGCTGACCGAAATGAAAC-3' re 5'-TCTGACTTGGGAGACTGAGTAGAT-3'	300
<i>Actin</i>	Actine	MD14G1142600	di 5'-CAACCTCTCGTCTGTGATAATG-3' re 5'-GCATCCTTCTGTCCCATCC-3'	100
<i>TuA</i>	Tubuline-alpha	MD03G1004400	di 5'-GTTCAATGCTGTTGGTGGTG-3' re 5'-CTGCGGAGAAGGATAGATGG-3'	300
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase	MD16G1111100	di 5'-CTTGTCTCCGCCCTTCC-3' re 5'-CGTAGTTCATCCATTGTTGC-3'	300

Article

1 **Short title**

2 Apple lectins agglutinate *E. amylovora*

3

4 **Authors for Contact details**

5 Dr. Alexandre Degrave

6 Agrocampus Ouest – Institut Agro

7 2, rue André Lenôtre

8 49000 Angers

9 France

10

11 **Title**

12 Search for host defense markers uncovers an apple agglutination factor corresponding with
13 fire blight resistance

14

15 **Authors**

16 Erwan Chavonet ¹, Matthieu Gaucher,¹ Romain Warneys,¹ Antoine Bodelot,¹ Christelle
17 Heintz,¹ Anthony Juillard,¹ Raphaël Cournol,¹ Göran Widmalm,² Joanna K. Bowen,³ Cyril
18 Hamiaux,³ Marie-Noëlle Brisset,¹ Alexandre Degrave ^{1,* ‡}

19

20 ¹Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

21 ²Department of Organic Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stockholm University, S-106 91
22 Stockholm, Sweden

23 ³The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited, Mount Albert Research
24 Centre, Auckland 1025, New Zealand

25

26 *Author for communication: alexandre.degrave@agrocampus-ouest.fr

27 ‡Senior author.

28

29 The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this
30 article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors
31 (<https://academic.oup.com/plphys/pages/General-Instructions>) is Alexandre Degrave.

32

33

34 **One sentence summary**

35 A defense-inducible plant lectin aggregates bacteria by binding to surface bacterial
36 polysaccharides, and accumulation of the lectin corresponds with enhanced resistance.

37

38 **Footnotes**

39 *Author contributions*

40 M.G., MN.B. and A.D. conceived research plans and supervised the experiments; E.C., M.G.,
41 R.W., MN.B., Cy.H. and A.D. designed the experiments; E.C., M.G., R.W., A.B., Cy.H., A.J.,
42 Ch.H., G.W., R.C., MN.B. and A.D. performed the experiments; E.C., M.G., Cy.H, G.W.,
43 MN.B and A.D. analysed the data; E.C. drafted the manuscript, which was completed by
44 M.G., MN.B., Cy.H., JK.B. and A.D. and reviewed by all authors; A.D. agrees to serve as the
45 author responsible for contact and ensures communication.

46

47

48 *Email address of Author for Contact*

49 alexandre.degrave@agrocampus-ouest.fr

50 **Abstract**

51

52 Pathogenesis-Related (PR) proteins are extensively used as molecular markers to dissect
53 the signaling cascades leading to plant defense responses. However, studies focusing on the
54 biochemical or biological properties of these proteins remain rare. Here, we identify and
55 characterize a class of apple (*Malus domestica*) PR proteins, named *M. domestica*
56 AGGLUTININS (MdAGGs), belonging to the amaranthin-like lectin family. By combining
57 molecular and biochemical approaches, we show that abundant production of MdAGGs in
58 leaf tissues corresponds with enhanced resistance to the bacterium *Erwinia amylovora*, the
59 causal agent of the disease fire blight. We also show that *E. amylovora* represses the
60 expression of *MdAGG* genes by injecting the type 3 effector DspA/E into host cells and by
61 secreting bacterial exopolysaccharides. Using a purified recombinant MdAGG, we show that
62 the protein agglutinates *E. amylovora* cells *in vitro* and binds bacterial lipopolysaccharides at
63 low pH, conditions reminiscent of the intercellular pH occurring *in planta* upon *E. amylovora*
64 infection. We finally provide evidence that negatively charged polysaccharides, such as the
65 free exopolysaccharide amylovoran progressively released by the bacteria, act as decoys
66 relying on charge-charge interaction with the MdAGG to inhibit agglutination. Overall, our
67 results suggest that production of this particular class of PR proteins may contribute to apple
68 innate immunity mechanisms active against *E. amylovora*.

69 Introduction

70

71 Fire blight, caused by *Erwinia amylovora* (*Ea*), is the most destructive bacterial
72 disease of *Maloideae*, leading to significant economic losses in apple (*Malus domestica*)
73 orchards if infectious outbreaks are not controlled (Bonn & Van der Zwet, 2000). The
74 bacterium invades its host primarily through flowers or wounded organs, migrates
75 apoplastically causing necrosis of succulent aerial organs, and can ultimately invade woody
76 tissues leading sometimes to the death of the tree (Thompson, 2000).

77 Understanding the cross-talk between *Ea* and host plants has been the focus of
78 numerous studies in the last decades. On the bacterial side, two essential pathogenicity
79 factors have been described: exopolysaccharides (EPS) mainly composed of amylovan
80 (Geider, 2000) either attached to the cell body to form the capsule or released as free-EPS
81 (Bennett & Billing, 1980; Belleman et al., 1994) and the type III secretion system (T3SS)
82 (Steinberger & Beer, 1988; Barny et al., 1990; Tharaud et al., 1994), a molecular needle
83 capable of injecting protein-effectors into plant cells. Two T3SS-secreted effectors (T3E) are
84 required for full virulence: DspA/E (Gaudriault et al., 1997; Bogdanove et al., 1998) triggers
85 cell death and the release of nutrients into the apoplast (Venisse et al., 2003; Boureau et al.,
86 2006) and HrpN (harpin, Wei et al., 1992) allows the translocation of DspA/E and other T3Es
87 into the plant cell (Bocsanczy et al., 2008; Boureau et al., 2011). Moreover, DspA/E was
88 reported to interfere with the apple response to infection by suppressing callose deposition
89 (Boureau et al., 2006) and expression of genes involved in the jasmonate pathway (Dugé De
90 Bernonville et al., 2012).

91

92 On the host plant side, several resistance quantitative trait loci (QTL) have been mapped in
93 both *Malus domestica* and wild or ornamental *Malus* species (Peil et al., 2021). Some of
94 them have been shown to contain receptors and kinases encoding genes and are thought to
95 be linked to perception mechanisms (Emeriewen et al., 2019). In this respect, two additional
96 bacterial T3Es seem to be involved in gene-for-gene relationships leading to resistance in
97 some *Malus* genotypes: avrRpt2_{EA}, recognized by the CC-NBS-LRR receptor encoded by the
98 resistance gene *FIRE BLIGHT MALUS ROBUSTA 5* (*FB_Mr5*) indirectly through the
99 cleavage of apple RPM1-INTERACTING PROTEIN 4 (MdRIN4) in the wild specie *Malus*
100 *robusta 5* located in linkage group 3 QTL (Vogt et al., 2013 ; Prokchorchik et al., 2020) and
101 Eop1, which acts as an avirulent factor in the wild species *Malus floribunda* 821 and the
102 ornamental cultivar 'Evereste' but whose link to a resistance gene remains to be elucidated
103 (Wöhner et al., 2018). Other studies have been dedicated to the characterization of apple

104 defense compounds that effectively inhibit *Ea*. Apple phenolic compounds exhibiting
105 antibacterial activity against the bacterium have been described (Chizzali *et al.*, 2012;
106 Gaucher *et al.*, 2013; Skłodowska *et al.*, 2018) with the corresponding bacterial multidrug
107 efflux pump able to bypass their antimicrobial effect (Burse *et al.*, 2004). Regarding proteins,
108 Romeiro *et al.* (1981b) reported an unidentified apple protein called malin able to agglutinate
109 *Ea* cells. Further research determined that malin interacts with *Ea* lipopolysaccharide (LPS)
110 (Romeiro *et al.*, 1981a), a carbohydrate chain anchored to the external membrane by fatty
111 acid. LPSs are essential for Gram-negative bacteria to withstand antimicrobial compounds
112 even though they are recognized as Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) and
113 trigger plant defenses (Dow *et al.*, 2000).

114 The synthetic functional analog of salicylic acid, acibenzolar-S-methyl (ASM, also
115 called BTH), has been shown to promote apple resistance to fire blight and to induce the
116 production of diverse PR (pathogenesis-related) proteins in otherwise susceptible apple
117 genotypes (Brisset *et al.*, 2000; Maxson-Stein *et al.*, 2002; Dugé de Bernonville *et al.*, 2014;
118 Aćimović *et al.*, 2015; Marolleau *et al.*, 2017). These proteins were initially defined as plant
119 proteins induced in pathological or related situations (van Loon *et al.*, 1994). To date, 19 PR
120 protein families (Arora *et al.*, 2020) have been identified in different plant species and
121 classified according to their common biochemical and biological properties. For the majority
122 of PR proteins, their role in resistance is still unclear but some anti-microbial activities have
123 been characterized *in vitro* for several families (van Loon *et al.*, 2006) including PR-2 (β -1,3-
124 glucanases activity) (Balasubramanian *et al.*, 2012) and PR-10 (ribonuclease-like proteins)
125 (Liu & Ekramoddoullah, 2006).

126 Warneys *et al.* (2018) recently reported on a family of 17 apple lectin proteins (19.0 to
127 20.6 kDa), named apple AGGLUTININS (MdAGGs), which accumulate in plant tissues upon
128 elicitation by ASM. The underlying gene sequences are highly conserved and include
129 encoding sequence for a single agglutinin domain similar to *Amaranthus caudatus* agglutinins
130 (Warneys *et al.*, 2018), which have been described in numerous plant species (Dang *et al.*,
131 2017). Agglutinins (AGG) are lectins able to recognize and bind specific carbohydrates
132 present at the surface of prokaryotic or eukaryotic cells, thereby promoting cell aggregation
133 (Peumans & Van Damme, 1995).

134 The present work aimed to unravel the function of MdAGGs in the interaction between
135 apple and the fire blight pathogen. We monitored gene expression and accumulation of
136 MdAGGs under various pathological or related situations and compared levels with two PR
137 markers, MdPR-2 and MdPR-10. Functional validation assays performed with a recombinant
138 MdAGG protein combined with modelling studies allowed us to explore the biological function

139 of these proteins. We finally investigated whether and how *Ea* pathogenicity factors
140 counteract these proteins that could be classified as a class of PR proteins.

141

142 **Results**

143

144 **ASM defense induction leads to local and systemic production of MdAGGs in** 145 **susceptible plants**

146

147 The dynamics of MdAGGs production was investigated in the young leaves of ASM-treated
148 seedlings compared to water-treated seedlings by measuring the expression of their
149 encoding genes and consequent protein accumulation across a 5-day time course. Levels of
150 gene expression (Figure 1A) and protein accumulation (Figure 1B) for MdAGGs were
151 compared with those relating to the two defense markers, MdPR-2 and MdPR-10. ASM
152 treatment triggered the overexpression of *MdAGGs* and the accumulation of the
153 corresponding proteins respectively one and two days after the treatment, as it did for *MdPR-*
154 *2* and *MdPR-10*. For *MdPR-10*, accumulation of transcripts tends to peak at day 2, whereas
155 *MdPR-2* and *MdAGGs* transcripts remained at important levels post ASM treatment over the
156 entire time course. Moreover, these experiments showed that the differential accumulation of
157 transcripts between ASM- and water-treated samples was higher for *MdAGGs* than it was for
158 *MdPRs* (\approx 250-fold for *MdAGGs* vs \approx 60- and 16-fold for *MdPR-2* and *MdPR-10* respectively,
159 compared to water-treated leaves). Regarding protein accumulation in water-treated
160 samples, only MdAGGs remained undetectable, whereas MdPR-10 were detected from day
161 3 and MdPR-2 at day 5 suggesting a constitutive expression due to the maturation of the
162 leaves for these latter proteins.

163 We next investigated the systemic behaviour of MdAGG transcripts and proteins when
164 a single leaf was treated with ASM or water. Treatments were therefore applied on either a
165 young or a mature leaf, located two nodes below, and 5 days later, the treated leaf as well as
166 the other untreated organs (shoot tip, leaf, stem) were sampled for transcript and protein
167 analysis (Figure 2). Overall, the treatment with ASM induced higher levels of MdAGG
168 transcript and protein production when it was applied on young leaves compared to mature
169 leaves. In both cases, MdAGGs were up-regulated and produced in the stem, however ASM-
170 treatment of the young leaf had no impact on either transcription or protein production in the
171 mature leaf. Conversely, ASM applied on the mature leaf triggered *MdAGG* gene expression
172 in the young leaf even though this expression did not lead to detectable amounts of proteins.
173 Finally, overexpression of *MdAGG* genes in shoot tips was observed upon treatment of both

174 young and mature leaves, but the corresponding proteins were not detected. Altogether,
175 ASM treatment on either leaf promotes systemic activation of *MdAGG* gene expression, but
176 proteins seem to be only detected when high transcription levels are reached.

177 In order to determine if *MdAGGs* systemic detection in ASM-treated plants could be
178 attributed to loading of the protein from apoplastic fluids, we performed extracellular fluid
179 (EcF) analysis of ASM or water-treated seedlings. Although *MdPR-2* accumulated in EcF
180 from ASM-treated plants, *MdAGGs* could not be detected (Supplemental Figure S1),
181 suggesting that systemic accumulation of *MdAGGs* in distant organs is not due to an
182 apoplastic transport of the proteins.

183

184 ***MdAGG* production correlates with enhanced resistance to *Ea* WT in susceptible** 185 **seedlings**

186

187 We next investigated the correlation between the production of each defense marker
188 and resistance to *Ea* WT by studying contrasting situations of induced-resistance. Protection
189 efficiency provided by 9 different PRI candidates toward *Ea* WT was therefore assessed and
190 the effects of each PRI candidate on *MdAGGs* and *MdPRs* were analysed 3 days after
191 treatment (Figure 3). Regarding pathogenicity tests, the water-treated plants recorded from
192 66.7 to 94.7% disease incidence depending on the experiments (Supplemental Table S1).
193 Among the 9 PRI candidates, ASM and NAA provided protection efficiencies >40% compared
194 to their respective water-controls inoculated with *Ea* WT.. The protection efficiencies provided
195 by the remaining 7 PRI candidates ranged from no protection to ≈25% protection for Pro-Ca.
196 Overall, the ability of each PRI candidate to induce the expression of each marker gene was
197 found to be positively correlated with the protection efficiency it provides toward *Ea* WT
198 (Figure 3A). The correlations observed between protection efficiency and *MdPR-2* and
199 *MdPR-10* expression were relatively low ($R = 0.78$ and 0.68 respectively), even though the
200 detection intensity of *MdPR-2* proteins was consistent with the protection efficiency provided
201 by the different PRI candidates (Figure 3B). In contrast, the correlation coefficient was
202 particularly strong for *MdAGGs* ($R = 0.93$; Figure 3A). At the protein level, *MdAGGs* were
203 detected in samples treated with NAA and ASM, and to a lesser extent in samples treated
204 with KHCO (calculated protection rate of ≈20%). *MdAGGs* can therefore be considered as
205 defense markers of the protection efficiency provided by different PRI candidates to *Ea* WT.

206 To expand this correlative analysis, we investigated the production of *MdAGGs* using
207 an experimental setting revealing the persistency of action of ASM. In this setting, apple
208 seedlings were either treated once with ASM or water and further inoculated with *Ea* WT

209 (protection efficiency) or sampled (RNA and protein extraction) at 7, 14 or 21 days after that
210 treatment; or treated 4 times 2 days apart with inoculation or sampling performed 21 days
211 after the last treatment (Figure 4A). Three weeks after inoculation, the water-treated plots of
212 the different time-settings displayed a disease incidence ranging from 57.8 to 85.0
213 (Supplemental Table S2). A single ASM treatment provided a significant protection toward *Ea*
214 WT, when applied 7 and 14 days before inoculation, but its effect was abolished if applied 21
215 days before (Figure 4B). However, 4 successive treatments with ASM were able to
216 significantly protect apple seedlings against *Ea* WT for up to 21 days. Again, in all cases
217 where apple seedlings were significantly protected by ASM from *Ea* WT, we observed a
218 significant over-expression of *MdAGG* genes and detected the accumulation of the
219 corresponding proteins (Figure 4C, D). *MdAGGs* can therefore be considered as markers of
220 the persistency of action of ASM.

221 Altogether, these results show that enhanced resistance of apple to *Ea* WT provided
222 by PRIs is related to *MdAGG* production.

223

224 ***MdAGGs* are repressed by *Ea* pathogenicity factors in susceptible apple genotypes**

225

226 To gain insight into the transcriptional pattern of *MdAGG* genes during the first 24
227 hours of apple infection by *Ea* WT, we compared the transcriptome of the susceptible apple
228 genotype MM106 either inoculated with the wild-type or a T3SS-deficient mutant strain to
229 previously acquired transcriptomic data obtained from ASM- or water-treated apple seedlings
230 (Warneys *et al.*, 2018). This comparison shows that each individual *MdAGG* gene detected
231 by the microarray chip that was significantly up-regulated in response to ASM in apple
232 seedlings was significantly down-regulated by *Ea* WT in a T3SS-dependent manner in the
233 susceptible genotype MM106 (Figure 5A). These results suggest that during the early steps
234 of the infection, *Ea* WT is able to actively repress the expression of *MdAGG* genes in
235 susceptible plants by injecting T3Es.

236 To identify the bacterial pathogenicity factors involved in this repression, we infiltrated
237 apple seedlings with various bacterial knock-out mutants and monitored *MdAGG* gene
238 expression after 48 hours (Figure 5B). The results show that *MdAGG* gene expression was
239 significantly up-regulated by *Ea* WT compared to mock inoculation. At this time-point, we
240 could not observe any significant difference in *MdAGG* expression between *Ea* WT-
241 inoculated plants and those inoculated with non-pathogenic *t3ss* or *hrpN* mutants. However,
242 when plants were inoculated with the non-pathogenic *dspA/E* or *ams* mutants, *MdAGG* gene
243 expression was significantly up-regulated compared to expression levels in plants inoculated

244 with the wild-type strain. Expression of *MdAGGs* was also significantly up-regulated in plants
245 inoculated with the *dspA/E* mutant compared to those inoculated with the *t3ss* or *hrpN*
246 mutants. We next investigated *MdAGG* protein accumulation in leaf tissues inoculated with
247 the same bacterial strains 5 days after inoculation with higher-titrating bacterial suspensions
248 of the non-necrotizing strains *Ea t3ss* or *Ea dspA/E* (Figure 5C). *MdAGGs* were only detected
249 in leaf tissues after inoculation with the *Ea dspA/E* knock-out mutant.

250 Altogether, these results suggest that in susceptible plants, the T3SS-dependant
251 effector *DspA/E* and the bacterial exopolysaccharide are both able to repress the expression
252 of *MdAGG* genes triggered by one or several unknown bacterial factors leading to *MdAGG*
253 proteins accumulation when *DspA/E* is absent.

254

255 ***MdAGG10* agglutinates the *Ea* acapsular mutant in acidic condition *in vitro***

256

257 Apple plants produce a proteinaceous defense factor which is able to agglutinate *Ea*
258 cells at low pH and that has affinity for bacterial LPS and EPS (Romeiro *et al.*, 1981a,b).
259 Having established that *MdAGGs* encode defense proteins systematically associated with
260 enhanced resistance to *Ea* and that bacterial pathogenicity factors inhibit *MdAGG* gene
261 expression during the first days of the susceptible interaction, we next hypothesized that
262 *MdAGGs* act as plant resistance effectors. In agreement with their predicted lectin fold, we
263 further hypothesized that *MdAGGs* are the long thought-after bacterial agglutination factors
264 observed by Romeiro *et al.* To test these hypotheses, we focused our functional studies on
265 *MdAGG10*, chosen for its highest sequence similarity with the greatest number of *MdAGGs*
266 and for its high expression level upon ASM-treatment (Warneys *et al.*, 2018). We therefore
267 produced and purified a recombinant 6His-MBP-*MdAGG10* protein from *Escherichia coli*.
268 Proteolytic cleavage of the N-terminal 6His-MBP tag caused spontaneous crystal-like
269 aggregation of *MdAGG10*, allowing separation of the cleaved protein from the soluble 6His-
270 MBP tag by centrifugation (Supplemental Figure S2A, S2B). Solubilization of this crystalline
271 material was achieved by a high pH shift, immediately followed by dilution in buffer solutions.
272 When 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl (pH 8.5) was used as dilution buffer, size exclusion
273 chromatography showed that *MdAGG10* elutes as a single peak with only traces of higher
274 oligomeric species. Comparisons with elution volumes of known molecular weight markers
275 indicated that solubilized *MdAGG10* is monomeric under these conditions (Supplemental
276 Figure S2C).

277 Agglutination assays showed that bacterial suspensions containing *Ea* cells
278 completely devoid of EPS (*Ea ams*) or devoid of free-EPS (*Ea* WT_{washed}) form aggregates

279 within 30 minutes, only when they are incubated with solubilized MdAGG10 at pH 4 (Figure
280 6A). When the pH value of the incubation solution was higher than 4.8, no bacterial
281 agglutination was visible, even after several hours of incubation (data shown only at pH 7.5).
282 When examined under the microscope, these aggregates appeared to be formed by bacterial
283 cells. Such bacterial agglutination did not take place at pH 4 when BSA was used instead of
284 MdAGG10 (Figure 6B), ruling out any artefactual pH-driven bacterial aggregation.

285 To confirm the role of free-EPS in the inhibition of the agglutinating property of
286 MdAGG10, the recombinant protein was set to incubate with different concentrations of EPS
287 purified from *Ea* WT before incubation with cells of the EPS-deficient mutant *Ea ams* (Figure
288 6C). Visible bacterial agglutination was completely abolished when MdAGG10 was pre-
289 incubated with EPS at concentrations higher than $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, thereby demonstrating that
290 free-EPS recovered from *Ea* protects bacterial cells from being agglutinated by MdAGG10.

291 The outer membranes of Gram-negative bacteria are enriched in LPS, a strain-
292 dependent membrane-anchored polysaccharide triggering host defense responses and
293 involved in bacterial cell integrity. To determine if MdAGG10 has affinity for LPS extracted
294 from *Ea ams*, we performed the same inhibitory experiment as we did for EPS. Again, above
295 a threshold concentration of $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, *Ea* LPS extract completely abolished visible
296 bacterial agglutination by MdAGG10 (Figure 6D). Moreover, LPS purified from *E. coli* O55:B5
297 also prevented agglutination of *Ea ams* cells by MdAGG10 at concentrations of 40 to $80 \mu\text{g}$
298 mL^{-1} (Supplemental Figure S3). Taken together, the results from our agglutination assays
299 suggest that MdAGG10 is a plant lectin active at low pH which interacts with surface LPS and
300 bound-EPS thereby agglutinating *Ea* cells, whereas free-EPS acts as an anti-agglutinating
301 factor.

302 The observation that bacterial agglutination by MdAGG10 was pH-dependant
303 prompted us to further investigate the oligomeric state of solubilized MdAGG10 after dilution
304 in acidic solutions. Size exclusion chromatography profiles of solubilized MdAGG10 diluted in
305 50 mM Na acetate, 150 mM NaCl solutions of various pH (pH = 5.4, 4.9, 4.4 and 3.9) showed
306 that at pH 5.4, MdAGG10 co-exists as a mixture of monomers and dimers (Figure 7A).
307 However, when lowering the pH further, the intensity of the peaks for both species gradually
308 decreased to reach very low levels at pH 3.9. We reasoned that the lower intensity of the
309 fluorescence signal observed at lower pH could either result from fluorescence quenching at
310 lower pH values or from MdAGG10 forming aggregates that would be removed by the
311 centrifugation step systematically included prior to injection into the column. We therefore
312 compared the fluorescence spectra of samples prepared in the exact same conditions as
313 above (i.e. consisting of the supernatants after the centrifugation step) with samples that

314 were not centrifuged (Figure 7B). Strong fluorescence spectra were observed for all non-
315 centrifuged samples, ruling out significant pH-dependant quenching issues. Supernatants of
316 all samples, however, showed reduced fluorescence intensity when compared to non-
317 centrifuged samples (by ~5% at pH 8.5, ~30% at pH 5.4 and ~90% at pH 4.9 and below),
318 thereby following the trend seen by size exclusion chromatography. Altogether, these
319 experiments indicate that MdAGG10 undergoes pH-dependant self-association processes,
320 starting from monomers at pH 8.5 to lead to the formation of dimers at pH 5.4, and ultimately
321 resulting in the formation of aggregates large enough to sediment by centrifugation at pH
322 values of 4.9 and below.

323

324 **A matter of charges**

325 We next investigated the apoplastic pH and conductivity variations triggered by *Ea* WT
326 in leaf tissues. The pH values and conductivity of incubation medium of leaf disks sampled
327 from apple seedlings pre-treated 4 days before with ASM or water and infiltrated by *Ea* WT or
328 mock were therefore recorded for 48 hours. A substantial decrease in pH was observed, from
329 6 to 5.2, within 24 h in bathing solutions of *Ea*-inoculated leaf disks, with however no
330 substantial difference between ASM- or water-treated tissues (Figure 8A). This decrease was
331 associated with the cell leakage induced by the bacteria in both tissues (Figure 8B).

332 To provide a rational for the low pH activity of MdAGG10, we calculated the
333 electrostatic potential of a homology model of MdAGG10 at pH 4.0 and pH 7.5. As seen in
334 Figure 8C and 8D, a strongly positively charged surface area can be observed for MdAGG10
335 at pH 4.0 (and to a lesser extent at pH 7.5), at a location that corresponds to the di-
336 saccharide binding site of amaranthin (Figure 8E, Transue *et al.*, 1997). Such a positively
337 charged surface is consistent with the ability of MdAGG10 to bind negatively charged ligands.
338 In contrast however, a surface area in the direct vicinity of the putative ligand binding site
339 appears strongly negatively charged at pH 7.5, but neutral at pH 4.0. Although only
340 predictive, these results led us to propose that the terminal negatively charged α -D-
341 Galp4,6(R)Pyr residue of the amylovoran side-chain (the main constituent of *Ea* EPS) could
342 constitute the binding ligand of MdAGG10, interacting with the positively charged surface at
343 pH 4 but repelled by the neighbouring negative charges at pH 7.5. Competitive agglutination
344 experiments performed using a concentration range of Capsular Polysaccharides (CPS) from
345 *Klebsiella pneumoniae* serotypes K21, K26 and K74, all harbouring a terminal D-
346 Galp4,6(R)Pyr residue on the side-chain of their repeating unit, were able to inhibit
347 agglutination of *Ea* *ams* mutant cells by MdAGG10 (Figure 9). Interestingly, the concentration
348 thresholds allowing this inhibition were similar to the one measured for the EPS of *Ea*. By

349 contrast, uncharged *Lactobacillus helveticus* K16 EPS was not able to hamper the
350 agglutination properties of MdAGG10 at the same thresholds. We next wondered whether a
351 synthetic α -D-Galp4,6(R)Pyr-OMe on its own would inhibit *Ea* agglutination by MdAGG10.
352 Our results show that at concentrations of 5mM (Figure 9) the monosaccharide was not able
353 to inhibit MdAGG10 agglutination of the *Ea ams* mutant, suggesting that other
354 complementary features of EPS are required for the ligand to bind MdAGG10.

355 Finally, we performed different inhibition tests including thermal denaturation of
356 MdAGG10 or addition of various glycans, CaCl₂ or EDTA. Among all the conditions tested,
357 only carboxymethylcellulose and pectin, two negatively charged polysaccharides, inhibited
358 the agglutination properties of MdAGG10 (Figure 9).

359

360 Discussion

361

362 Major advances in the understanding of plant innate immunity include the discovery of
363 underlying mechanisms of pathogen recognition, downstream signalling and transcriptional
364 activation of defense-related genes. In contrast, little is known about the “end-players”, i.e.
365 plant compounds that are directly involved in the restriction of the infection progress. In this
366 study, several features of gene expression and protein accumulation of MdAGGs in various
367 situations relating to apple resistance were consistent with a role of this family of proteins in
368 apple defense against *Ea*. This led us to explore the biological action of the protein and to
369 demonstrate its bacterial agglutination property.

370 *MdAGGs* appeared to be locally and to a lesser extent systemically expressed in all
371 aerial organs following ASM application. Our results did not support an apoplastic secretion
372 and further transport of the proteins, which is in accordance with the global absence of signal
373 peptides in amaranthin-like lectins (Dang *et al.*, 2017), but rather the transport of a MdAGGs-
374 triggering signal. The tendency of this signal to “move” to young organs in a source-sink
375 motion suggests that induction signalling occurs through conductive vessels. Indeed, the
376 different known SAR signal molecules start at the site of pathogen infection and disperse
377 systemically through the phloem network (Shine *et al.*, 2019). However, *MdAGG* gene
378 expression was not fully associated with respective protein detection, suggesting either
379 translation latency or post-transcriptional changes which inhibited translation. *BIPHENYL*
380 *SYNTHASE 2 (BIS2)*, another defence marker of the apple/*Ea* interaction encoding for an
381 enzyme of the biphenyl biosynthesis pathway, was also referenced with differences between
382 transcription and translation after infection. *BIS2* transcripts accumulate in leaves but the

383 protein is not detected in western blot analysis, suggesting possible translational repression
384 (Chizzali *et al.*, 2012).

385 Investigating further, we showed in susceptible apple plants that bacterial EPS as well
386 as T3SS-delivered DspA/E are involved in the repression of *MdAGG* expression resulting in
387 the moderate induction of these genes by *Ea* WT. This suggests that *MdAGGs* are part of
388 both PTI (PAMP-triggered Immunity) and ETI (effector-triggering immunity). PTI can be
389 activated by bacterial features such as flagellin or LPS and is described as a rapid and
390 broad-spectrum resistance (Nicaise *et al.*, 2009). The higher induction of *MdAGGs* by *Ea*
391 *ams* compared to *Ea* WT observed in our study suggests that bound- and free-EPS mask
392 bacterial PAMPs located on the outer membrane of the bacterial cell such as LPS, as
393 demonstrated in other bacteria (Jang & Matthews, 2018). Another, non-exclusive explanation
394 of *MdAGGs* induction by *Ea ams* could be based on the capacity of free-EPS to chelate Ca^{2+}
395 and subsequently block the calcium flux (Aslam *et al.*, 2008), thereby suppressing the further
396 signaling steps activated by Ca^{2+} entry that normally lead to plant defense gene responses
397 (Lecourieux *et al.*, 2006).

398 ETI is a process by which plants sense and react to the action of pathogen effectors
399 (Thordal-Christensen, 2020). Disease is possible with the help of additional effectors able to
400 suppress ETI. In our study, the higher induction of *MdAGGs* by *Ea DspA/E* compared to *Ea*
401 *t3ss* and *Ea* WT suggests that i) DspA/E is involved in the repression of the genes and ii)
402 other bacterial T3Es, operative in *Ea DspA/E* but inoperative in *Ea t3ss*, are involved in their
403 induction. HrpN, which allows translocation of bacterial T3Es into the host cell, was already
404 identified to elicit apple defense in susceptible genotypes (Vergne *et al.*, 2014), such as
405 callose deposition (Boureau *et al.*, 2011). Our work shows that HrpN is required for *MdAGGs*
406 induction as inoculation with *Ea hrpN* triggers a similar response as inoculation with *Ea t3ss*.
407 However, whether its activity relies on directly eliciting a response through the translocation
408 of effectors responsible for the induction remains to be determined. By contrast, DspA/E
409 seems to be clearly involved in the repression of *MdAGGs*, in accordance with the
410 suppressor function of this effector already reported for other plant defense responses
411 (Boureau *et al.*, 2006; Dugé De Bernonville *et al.*, 2012). These results are further supported
412 by the detection of *MdAGG* proteins in *Ea dspA/E*-inoculated tissues in contrast to those
413 inoculated by the *Ea t3ss* mutant.

414 EPS is known to be essential for *Ea* to colonize its host (Steinberger & Beer, 1988;
415 Bellemann & Geider, 1992; Tharaud *et al.*, 1994). Our work demonstrates that the presence
416 of free-EPS in *Ea* WT prevented the agglutinating action of recombinant *MdAGG10* and that
417 this protein agglutinated *Ea ams* cells only at low pH (<4.8). Our *ex-planta* assay with leaf

418 disks infiltrated with *Ea WT* demonstrated a shift of pH of the bathing solution as already
419 recorded by Pontais et al. (2008), although it never reaches pH 4.8 even for ASM-pretreated
420 leaf disks. This does not exclude that extrusion of protons from plant cells locally decreases
421 the apoplastic pH below the bulk medium pH as proposed by Thibaud et al. (1988). Rapid
422 pathogen-induced pH modification of the apoplast is a phenomenon that has been recently
423 analyzed in *Arabidopsis thaliana* upon *Fusarium oxysporum* infection. It is tightly regulated by
424 plant proton pumps which allow a very rapid acidification of the apoplast following pathogen-
425 derived molecule perception (Kesten et al., 2019). These findings altogether suggest that
426 conditions may be met for agglutination to occur *in planta* after infection by *Ea*. Indeed,
427 Huang et al. (1975) performed electron microscopy studies on apple leaves infiltrated with an
428 acapsular strain of *Ea* and showed that “granules appear to be agglutinating bacterial cells”.
429 This agglutination was not observed when apple leaves were infiltrated with an EPS-
430 producing strain of *Ea* (Huang et al., 1975).

431 Under acidic conditions, *Ea* cells were agglutinated only when its free-EPS was
432 removed. In contrast, adding purified EPS resulted in inhibition of bacterial agglutination by
433 MdAGG10. Romeiro et al. (1981b) had already identified a protein fraction containing an
434 agglutinating factor able to aggregate *Ea* cells in *Malus sylvestris x ranetka* seed and “Red
435 Delicious” genotype leaves. Like MdAGG10, this agglutination factor was inhibited by
436 increasing amounts of *Ea* EPS and was unaffected by heat denaturation, CaCl₂, EDTA and
437 various simple sugars (Romeiro et al., 1981b). These authors also demonstrated that the
438 agglutination factor interacted specifically with the core-region of *Ea* LPS (Romeiro et al.,
439 1981a). Our study shows that LPS extracted from *Ea* is able to inhibit bacterial cell
440 agglutination by MdAGG10. We also report that MdAGG10 agglutination is inhibited by the
441 LPS of *E. coli* O55:B5, which harbours negatively charged residues in its core region and
442 uncharged O-side chains (Rodriguez-Loureiro et al., 2018). Altogether, these findings highly
443 suggest that Romeiro’s mysterious agglutination factor includes MdAGGs. Due to the high
444 degree of conservation in the protein sequences, we postulate that the entire MdAGG family
445 has a redundant function, although this remains to be determined.

446 MdAGGs belong to the amaranthin-like lectin family, whose founding member was
447 isolated from *Amaranthus caudatus* seeds, characterized by two successive glycan-binding
448 domains called amaranthin, and able to bind Gal-β1,3-GalNAc-α-O-benzyl (Transue et al.,
449 1997). Amaranthin-like lectin encoding genes have recently been shown to be widespread
450 across the plant kingdom, although these can encode a variety of amaranthin domain-
451 containing proteins (Dang et al., 2017). In apple, the 17 MdAGGs are lectins defined by a
452 single amaranthin domain (Warneys et al., 2018). A structural model for MdAGG, based on

453 the crystallized lectin from *A. caudatus*, assumed a dimeric tail-to-tail association that allows
454 binding of two ligands (Warneys *et al.*, 2018). Our gel-filtration results now provide
455 experimental evidence that MdAGG10 has a tendency to auto-associate as dimers in mild
456 acidic conditions, ultimately leading to the formation of higher-order aggregates as the pH is
457 lowered further, therefore supporting this prediction. The ligand of amaranthin, Gal- β 1,3-
458 GalNAc- α -O-benzyl (Transue *et al.*, 1997), was neither found in the composition of
459 amylovoran (Nimtz *et al.*, 1996) nor in that of LPS from *Ea* (Ray *et al.*, 1986; Casillo *et al.*,
460 2017). However, we found that acidic polysaccharides were able to inhibit bacterial cell
461 agglutination by MdAGG10. This property was evident in particular for acidic bacterial
462 polysaccharides harbouring pyruvylated galactose residues terminally positioned at the side-
463 chains of their repeating units. Interestingly, studies performed with *Ea* strains affected in the
464 biosynthesis of this terminal pyruvylated-galactose residue were found to be unable to spread
465 systemically on apple (Wang *et al.*, 2012), leading the authors to hypothesis that *Ea* may
466 have gained advantage by producing this acidic pyruvylated EPS. The surface modelling of
467 MdAGG10 shows the presence of a positively-charged area which position corresponds to
468 the binding site of amaranthin, thereby suggesting this surface to be the binding site for the
469 negatively-charged side chains of EPS. This charge-charge interaction, already suggested by
470 Romeiro *et al.* (1981b), is strengthened by our findings showing that various acidic
471 polysaccharides inhibit MdAGG10-provoked cell agglutination. Although we showed that
472 acidic polysaccharides are involved in this binding event, we have not yet been able to
473 identify the minimal ligand of the MdAGG10 lectin.

474 Other plant lectins exhibit agglutinating properties against phytopathogenic bacteria
475 (Peumans & Van Damme, 1995). Potato (*Solanum tuberosum*) and corn (*Zea mays*)
476 agglutinins are able to bind respectively avirulent *Ralstonia solanacearum* or *Pantoea*
477 *stewartii* strains or virulent strains washed of their EPS, suggesting agglutination is prevented
478 by sufficient amounts of EPS (Sequeira & Graham, 1977; Bradshaw-Rouse *et al.*, 1981).
479 Potato agglutinin binds bacterial LPS by specific conjugation to the lipid A (Sequeira &
480 Graham, 1977) or with charge-charge interaction (Duvick & Sequeira, 1984). Wheat Germ
481 Agglutinin (WGA) is known to inhibit the growth of phytopathogenic fungi by binding N-
482 acetylglucosamine residues in the chitin-containing walls (Mirelman *et al.*, 1975; Ciopraga *et*
483 *al.*, 1999), but we observed that under acidic conditions, WGA is also able to agglutinate the
484 *Ea ams* mutant (Supplemental Figure S4). Altogether, these results suggest that plant lectins
485 like MdAGGs are able, maybe more generally than thought, to bind negatively-charged
486 glycans as far as they are released in the appropriate electro-chemical environment. This
487 could imply a broader spectrum of targets for plant defense-inducible lectins, where these

488 could bind to surface components of both fungal and bacterial pathogens, but also to gut
489 enterocytes of plant feeding insects, thereby hampering effective nutrition (Peumans & Van
490 Damme, 1995).

491

492 Taken together our data demonstrate that MdAGGs are candidates as apple
493 resistance effectors of the innate immunity to fire blight. The correlative evidence and *in vitro*
494 agglutination assays presented here will have to be completed by immunocytochemistry
495 experiments targeting MdAGGs in *Ea*-inoculated apples and by the analysis of various apple
496 transformants to evaluate the real contribution of MdAGGs in the quantitative resistance to
497 *Ea*. Moreover, we dedicated our study to the analysis of MdAGGs in plants naturally
498 susceptible to *Ea*, either displaying PRI-induced resistance or not. Whether expression of
499 MdAGGs is also activated in apple genotypes displaying gene-for-gene resistance to *Ea*
500 remains to be investigated. Finally, we propose to integrate stress-inducible agglutinins as a
501 different PR protein family since they have a function that differs from other PRs and are
502 induced along with other PRs proteins by SAR and in the presence of a pathogen. In
503 addition, they have other characteristics common to some PRs, such as their presence in
504 different plant species or their ability to act against a broad-spectrum of pathogens and pests.

505

506 **Materials and Methods**

507

508 **Plant material and growth conditions**

509

510 Apple (*Malus domestica*) seedlings (3-6 leaves) from open-pollinated *M. domestica* cv.
511 Golden Delicious were chosen for their overall susceptibility to fire blight. For the microarray
512 study, scions of MM106 grafted on MM106 rootstocks were chosen for their susceptibility to
513 fire blight (Durel et al., 2009). Plants were cultivated in greenhouse (semi-controlled
514 conditions, natural photoperiod supplemented with artificial light to reach a 16h photophase,
515 23-25 °C day, 17 °C night, watering every 2-4 days) in standard potting soil.

516

517 **PRI candidates and application procedure**

518

519 Commercial compounds (claiming or not a PRI action), their respective active
520 ingredients and working concentrations are listed in Table 1. Spray mixtures were prepared
521 with reverse osmosis water according to manufacturer's recommendations and reverse
522 osmosis water was systematically used as control in water-treated plant. PRI candidates or

523 water-control were applied by spraying each solution to runoff with a spray gun Aeryo-1.4
524 (Deltalyo, Mably, France) on all aerial parts, except in one experiment where a single leaf,
525 separated from the others with plastic sheets to prevent cross contamination, received the
526 treatment.

527

528 **Bacterial strains and inoculation procedures**

529

530 The CFBP1430 strain of *Erwinia amylovora* (*Ea* WT), virulent on most cultivated apple
531 genotypes (Paulin & Samson, 1973) was used in this study as well as mutants knocked-out
532 in genes involved in its pathogenicity (Table 2). Inoculum were all prepared from an
533 exponential growth phase culture cultivated on solid King's B medium (King *et al.*, 1954),
534 supplemented with appropriate antibiotics (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for mutants, overnight at 26°C

535 Experiments assessing the protective effect of PRI candidates were performed on
536 apple seedlings inoculated by a *Ea* WT suspension prepared in reverse osmosis water and
537 calibrated at 10^8 CFU mL^{-1} . Inoculation was carried out on the two youngest leaves, by
538 cutting $2/3$ of the leaf perpendicularly to the central midrib with scissors previously dipped in
539 the inoculum.

540 For apple defence analysis, inocula of *Ea* WT and mutants were calibrated at 10^7 CFU
541 mL^{-1} or 10^8 CFU mL^{-1} (for one experiment dedicated to MdAGG protein detection) in reverse
542 osmosis water supplemented with 0.01% (v/v) of wetting agent Silwet L-77® (De Sangosse
543 Ltd, Cambridge, UK). Inoculation was performed by immersion of growing shoots into these
544 bacterial suspensions or Silwet 0.01% (v/v, mock) followed by vacuum infiltration (3 min
545 beyond -0.9 MPa).

546 For apoplastic pH and electrolytes leakage measurement, inoculum of *Ea* WT was
547 prepared in MES buffer (0.1 mM pH 6) supplemented with Silwet L-77® 0.01% (v/v) and
548 calibrated at 10^9 CFU mL^{-1} . Inoculation was performed by vacuum infiltration of leaf discs (\emptyset
549 1.4 cm) immersed into this bacterial suspension or MES buffer + Silwet L-77® 0.01% (v/v,
550 mock) (Pontais *et al.*, 2008).

551

552 **PRI candidate protection efficiency assessment on whole seedlings**

553

554 In each experimental repeat, the design was a block of 3 replicate plots of 10
555 seedlings per treatment. Plants were inoculated 3 days after treatment with PRI candidates
556 or water, except for the experiments assessing the persistency of action of ASM where plants
557 were inoculated either 7, 14 or 21 days after the last treatment. Development of symptoms

558 (midrib, petiole and shoot necrosis) were assessed 3 weeks after inoculation. Disease
559 incidence (DI) was calculated per replicate plot, considering that a plant was diseased when
560 the necrosis reached at least the petiole of the inoculated leaf. Within each experimental
561 repeat, for each plot X: % protection = $[(\mu\text{DI}_{\text{water}} - \text{DI}_{\text{plotX}})/\mu\text{DI}_{\text{water}}] \times 100$, where $\mu\text{DI}_{\text{water}}$ is the
562 mean DI of the three plots of water-controls. Mean protection rate for a considered PRI
563 candidate is displayed as the mean of the protection rates calculated for each replicate plot in
564 each experimental repeat. Raw disease assessment data and protection efficiency
565 calculations are available from Supplemental Table S3.

566

567 **Apoplastic pH and electrolytes leakage measurement**

568

569 Leaf disks cut out from ASM- or water-treated leaves sampled 4 days after treatment
570 were prepared and incubated as described by Pontais *et al.* (2008). Briefly, leaf discs were
571 first vacuum-infiltrated with *Ea* WT or mock, then incubated in fresh MES buffer (0.1 mM, pH
572 6). Conductivity and pH of the incubation medium were measured every 12 h over a 48 h
573 period.

574

575 **Plant material sampling for defense analysis**

576

577 Regarding targeted analysis and for experiments carried out on inoculated plants or
578 plants that were fully sprayed by PRIs or water, sampling was performed by pooling 10 leaf
579 discs (\emptyset 0.9 cm) cut out from the parenchyma of the youngest expanded leaf from 5 different
580 plants just before spraying (untreated, day 0) and the days after in each treatment modality.
581 For the specific experiments carried out on seedlings where only one leaf was treated with
582 ASM or water, sampling was performed by pooling the tissues from 10 replicate plants before
583 treatment (untreated, day 0) and 5 days after. Tissues consist of either the youngest
584 expanded leaves, the leaves two nodes below, shoot tips (the plant apex down to the petiole
585 of the youngest expanded leaf, unfolded leaf included), or stem samples (the portions of stem
586 between the youngest expanded leaf and the leaf two nodes below). Samples were snap-
587 frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until further processing.

588 For the microarray analysis, each sample consisted of tissues from the youngest
589 expanded leaf pooled from 3 replicate plants inoculated 24 h before.

590

591 **Transcriptional analysis**

592

593 Entire leaves, shoot tips and stems were first crushed in liquid nitrogen using mortar
594 and pestle. The resulting powder or pooled leaf discs were ground to a fine powder in liquid
595 nitrogen using a tissue lyser (Retsch, Haan, Germany). Total RNA was extracted using the
596 Nucleospin® RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the
597 manufacturer's procedure. Purity and concentration of samples were assayed with a
598 NanoDrop® One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Reverse transcription was
599 performed on 2 µg of RNA using the M-MLV reverse transcriptase enzyme according to
600 standard procedures (M-MLV, Promega, Madison, WI, USA). The presence of cDNA and the
601 absence of gDNA was verified by polymerase chain reaction (PCR) using *EF-α* primers
602 flanking an intron (Supplemental material S1).

603 Reverse transcription quantitative PCR was performed with a CFX96™ system (Bio-
604 Rad, Hercules, CA, USA) as described in Marolleau et al., 2017. Primers used are listed in
605 Supplemental Table S4 and relative changes in gene expression (\log_2 ratio) were calculated
606 using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with normalization against 3 internal reference genes
607 (Vandesompele *et al.*, 2002). Relative expression comparisons were made between treated
608 plants and the appropriate calibrator, as indicated in figure legends.

609 For microarray analysis, the integrity of RNA was verified by gel electrophoresis
610 through a 1.2 % (w/v) agarose gel before amplification. Targets were prepared, labelled,
611 hybridized on the slide and scanned according to Celton *et al.* (2014).

612

613 **Apple protein extraction**

614

615 Tissues were ground to a fine powder using mortar and pestle in liquid nitrogen.
616 Hurkman & Tanaka (2006) phenolic extraction was performed on 200 mg of powder in
617 denaturing conditions as described in the Supplemental Material S2. Proteins were
618 solubilized in a modified Laemmli buffer (0.125 % SDS w/v, 10 % glycerol v/v, 5 mM DTT,
619 62.5 mM Tris, pH 7.5), assayed with Coomassie blue (Bradford, 1976) detailed in
620 Supplemental Material S3, and mixed with a Laemmli complement (20 % SDS w/v, 0.1 %
621 bromophenol blue w/v, 50 % β-mercaptoethanol v/v) (9:1 v/v) for the SDS-PAGE migration.
622 Procedure for protein extraction from extracellular fluids is detailed in Supplemental Material
623 S4.

624

625 **Apple protein separation and immunodetection**

626

627 Protein extracts were separated on 1D SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and protein
628 profiles were revealed by Coomassie blue with the method indicated in Supplemental
629 Material S5. The protein ladders Color Prestained Protein Standard Broad Range P7712S
630 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and MagicMark™ XP (Invitrogen, Carlsbad, CA,
631 USA) were used to reveal migration and immunodetection, respectively. Protein
632 immunodetection was performed as previously described (Warneys *et al.*, 2018) using rabbit
633 antibodies targeting MdAGGs, MdPR-2 and MdPR-10. These antibodies were obtained
634 through rabbit immunization programs with the following synthetic peptides (Eurogentec,
635 Seraing, Belgium): NKYLRYQLDAESDLN and TEKPNNEDYADKNYV for MdAGGs;
636 AEILEGDGGVGTIKK for MdPR-10; MAKPSSSVGRARGPS and TPELEKHWGLFSPNK for
637 MdPR-2.

638

639 **MdAGG10 recombinant production**

640

641 MdAGG10 was codon-optimized for bacterial expression and expressed as a
642 cleavable His-MBP fusion protein in *Escherichia coli* Rosetta-Gami 2. Cells were
643 resuspended in 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 500 mM NaCl, 10 mM imidazole and homogenized
644 twice at 10,000 p.s.i. using an EmuFlex C3 (Avestin). The soluble fraction was purified by
645 metal affinity chromatography using a 5 mL HisTrap™ HP column (GE healthcare) and
646 eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 150 mM NaCl, 300 mM Imidazole. Relevant fractions
647 were combined and cleavage of the His-MBP tag was done using Tobacco Etch Virus (TEV)
648 protease at a 1:100 (w/w) protease/protein ratio, with the reaction mixture being dialyzed
649 against 20 mM Tris-HCl, 200 mM ammonium sulfate, 1 mM DTT, 1 mM EDTA (pH 8.5) at 4
650 °C for 16 h. The dialysis bag was then transferred to the same buffer lacking DTT and EDTA
651 for 2 h. Upon TEV cleavage, MBP-free MdAGG10 spontaneously formed micro-crystalline
652 aggregates allowing recovery of the purified protein by centrifugation at 10,000 rpm for 5 min.
653 After 2 supplementary wash-centrifuge steps using 20 mM Tris-HCl, 200 mM ammonium
654 sulfate (pH 8.5), the pellet was resuspended in 20 mM Tris-HCl, 200 mM ammonium sulfate
655 (pH 8.5) and stored at 4 °C.

656

657 **Bacterial agglutination test**

658

659 Two mg of proteins were solubilized by adding 1 volume of 0.5 M NaOH and
660 immediately diluted 25 times in sodium acetate buffer (100 mM sodium acetate, pH 4) or Tris
661 buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5). MdAGG10 solutions (40 µg mL⁻¹) were mixed with *Ea* cells

662 suspended in reverse osmosis water at 10^8 CFU mL⁻¹ (v/v) and incubated at room
663 temperature for at least 30 min. In some experiments, *Ea* WT was washed from its free-EPS
664 (*Ea* WT_{washed}) by centrifugation of the bacterial suspension ($5,000 \times g$ for 5 min) and re-
665 suspension of the pelleted bacterial cells in reverse osmotic water at 10^8 CFU mL⁻¹. For
666 inhibition experiments, compounds (purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated)
667 were added to the dilution buffer containing proteins. As a control, the protein storage buffer
668 (Tris 20 mM, ammonium sulfate 200 mM pH 8.5) underwent the same procedure as that
669 performed for protein preparation. After incubation for 30 min at room temperature, protein
670 preparations were subsequently mixed with *Ea* cells as previously described. Low
671 magnification pictures were taken with a digital camera (U-CMAD3, Olympus, Tokyo, Japan)
672 mounted on a binocular microscope (SZX16, Olympus, Tokyo, Japan). Microscopy was
673 performed with an optical microscope (Axio Zoom.V16, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)
674 associated with a Hamamatsu ORCA-Flash4.0 digital camera (model C11440-22CU,
675 Hamamatsu Photonics K.K., Japan).

676

677 **Bacterial polysaccharide purification**

678

679 Capsular polysaccharides (CPS) from *Klebsiella pneumoniae* serotypes K21, K26 and
680 K74, exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus helveticus* K16 and the monosaccharide
681 methyl 4,6-*O*-[(*R*)-1-carboxyethylidene]- α -D-galactopyranoside were available at the
682 Department of Organic Chemistry, Stockholm University. ¹H NMR spectroscopy was used to
683 confirm that the galactose-containing *K. pneumoniae* CPS and the galactose
684 monosaccharide carried their 4,6-*O*-linked pyruvic acid acetal groups. *Ea* EPS was purified
685 from *Ea* WT cells grown overnight in liquid King B according to Bajpai *et al.*, 2016. LPS from
686 *Ea ams* was prepared using LPS isolation kit (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's
687 protocol.

688

689 **Size exclusion chromatography**

690

691 Solubilized MdAGG10 samples were prepared as for bacterial agglutination assays. 8 μ L of
692 MdAGG10 micro-crystalline material and 8 μ L 0.5 M NaOH were mixed to solubilize the
693 micro-crystals. In these conditions, the absorption spectrum measured on a Nanodrop had a
694 maximum at 290 nm, with OD₂₉₀ ~ 0.92. The solubilized sample was immediately diluted 50 x
695 in various dilution buffers (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8.5) ; 50 mM Na Acetate, 150
696 mM NaCl (pH 5.4, 4.9, 4.4 & 3.9)). 400 μ L of the diluted samples were centrifuged for 5 min

697 at 15,000 × *g* before being injected in a Superdex 75 10/300 GL column (Cytiva) mounted on
698 an Akta Pure FPLC (Cytiva) and equilibrated in the matching dilution buffer. Because of the
699 low concentration of the samples, elution profiles could not be monitored using UV
700 absorption. Instead, they were therefore monitored by intrinsic fluorescence using an inline
701 Shimadzu RF-20A fluorescence detector, with excitation and emission wavelengths of 280
702 and 340 nm, respectively. All elution profiles were recorded using the same settings for the
703 fluorescent detector (sensitivity = 2(MED), gain = 1 (x1), resulting in a sensitivity
704 magnification of x32).

705

706 **Fluorescence spectroscopy**

707

708 Samples were prepared in various buffers exactly as for the size exclusion chromatography
709 experiments. Prior to centrifugation, diluted samples were split in half, with one half being
710 centrifuged for 5 min at 15,000 × *g*, while the other half was not centrifuged. 175 µL of each
711 sample (non-centrifuged and supernatants of the centrifuged samples) and buffers alike were
712 dispensed in a black 96-well plate (Greiner Bio-One). Fluorescence measurements were
713 performed using a FlexStation 3 microplate reader (Molecular Devices). The excitation
714 wavelength was 280 nm (with 325 nm cut-off), and emission spectra were recorded between
715 300 and 450 nm at 10 nm intervals. Measurements were done using 6 flashes per read, and
716 the PMT gain was set to Medium. All fluorescence spectra were corrected for background
717 scattering as measured with buffer.

718

719 **Tridimensional modelling studies**

720

721 The MdAGG10 amino acid sequence was submitted to the HHPred server
722 (Zimmermann *et al.*, 2018) and the resulting pairwise alignment with *Amaranthus caudatus*
723 Agglutinin (Amaranthin, Transue *et al.*, 1997, PDB entry code 1JLY) was used for homology
724 modelling in Modeller (Webb & Sali, 2016). Charges were calculated with PDB2PQR
725 (Dolinsky *et al.*, 2004), using PROPKA to assign protonation states at provided pH, and the
726 PARSE forcefield. The electrostatic potential molecular surface was then rendered in PyMOL
727 2.4.1 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) using the
728 APBS Electrostatics plugin.

729

730 **Data analysis**

731

732 Data analysis was performed using RStudio software (R Core Team, 2019). Graphical
 733 representations were generated using the package “ggplot2” (Wickham *et al.*, 2020) in
 734 combination with “ggpubr” (Kassambara, 2020).

735 Except for microarrays, differences between conditions were tested with non-
 736 parametric tests. Pairwise comparisons were carried out with the Wilcoxon rank sum test
 737 (Bauer, 1972; Hollander & Wolfe, 1973). Multiple comparisons were performed with the
 738 Kruskal-Wallis rank sum test associated with pairwise Mann–Whitney U-tests with Bonferroni
 739 correction (Hollander & Wolfe, 1973) and statistical differences were established with a risk
 740 threshold of 5 %. Correlation tests were performed with Spearman's rank correlation test.

741 For microarrays, analysis were performed according to Celton *et al.* (2014). Briefly,
 742 pair-data files were extracted from the scanned images using DEVA 1.2.1 software (Roche).
 743 Statistical analyses were performed using R version 2.14.1 (R Core Team, 2019) and the
 744 package LIMMA 3.10.1 (Smyth, 2005) from the Bioconductor project. Data were normalized
 745 by the lowess method from LIMMA. A probe was flagged as differentially expressed if the
 746 log₂ ratio was ≤ -0.5 or ≥ 0.5 and if the corrected p-value was ≤ 0.05 .

747

748 **Accession numbers**

749

750 The microarray datasets presented in this study can be found in online repositories. The
 751 names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below:

752 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE175422>

and

753 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE176574>

754

755 **Supplemental data**

756

757 The following materials are available in the online version of this article.

758 Supplemental Material S1: cDNA quality-control PCR

759 Supplemental Material S2: Protein extraction

760 Supplemental Material S3: Protein assay

761 Supplemental Material S4: Extraction of extracellular fluids and measurement of
 762 G6PDH activity

763 Supplemental Material S5: Migration SDS-PAGE and protein profile revelation

764 Supplemental Table S1: Incidence of *Ea* on apple seedlings inoculated 3 days after
 765 one treatment by PRI candidates.

766 Supplemental Table S2: Incidence of *Ea* on apple seedlings inoculated 7, 14 or 21
767 days after a single ASM or water treatment, or 21 days after the last treatment of a
768 succession of 4 daily treatments.

769 Supplemental Table S3: Raw disease incidence of *Ea* on apple and protection
770 efficiency calculation (two excel sheets, one referring to Figure 3, one referring to Figure 4).

771 Supplemental Table S4: RT-qPCR primer sequences.

772

773 Supplemental Figure S1: Western blotting of MdAGGs, MdPR-2 and MdPR-10 on
774 apoplastic proteins recovered from young apple leaves seedlings 3 days after ASM or water
775 treatment.

776 Supplemental Figure S2: Purification, solubilisation and gel filtration of recombinant
777 MdAGG10.

778 Supplemental Figure S3: Effect of LPS from *Escherichia coli* strain O55:B5 on *Ea ams*
779 agglutination by MdAGG10.

780 Supplemental Figure S4: Effect of Wheat Germ Agglutinin (WGA) on *Ea ams*
781 agglutination.

782

783 *Funding information*

784 This research was conducted in the framework of the regional programme "Objectif Végétal,
785 Research, Education and Innovation in Pays de la Loire", supported by the French Region
786 Pays de la Loire, Angers Loire Métropole and the European Regional Development Fund. It
787 was supported by a grant from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement
788 Supérieur et de la Recherche, France (to E.C.), from the Embassy of France in New Zealand
789 (F2RP, French-Related Research Project, to Cy.H.), and from the Swedish Research Council
790 grant no. 2017-03703 (to GW).

791

792 **Acknowledgments**

793

794 We would like to thank David Macherel for consulting advice for protein extraction,
795 Anne Imberty for fruitful discussions and reviewing of the manuscript, the New Zealand
796 Institute for Plant & Food Research (Auckland, New Zealand) for hosting A. D. for the
797 production and the analysis of recombinant protein, and the platforms ANAN (Analysis of
798 Nucleic Acids), IMAC (Cell Imaging) and PHENOTIC (greenhouse facilities) of the SFR
799 QUASAV for excellent technical assistance.

800

801 **Tables**

802

803 Table 1: Active substance and concentration of PRI candidates

804

Tradename	Firm	Function	Active substance	Abbreviation	Concentration
Armcarb®	De Sangosse	Biofungicide	Potassium bicarbonate	KHCO	12.25 g L ⁻¹
Bion® 50WG	Syngenta	PRI	Acibenzolar-S-Methyl	ASM	0.4 g L ⁻¹
Exilis®	De Sangosse	Thinning agent	6-Benzylaminopurine	6BA	18.75 mL L ⁻¹

Kendal®	Valagro	Biostimulant	Natural organic matter	NOM	7.5 mL L ⁻¹
LBG-01F34®	De Sangosse	PRI	Potassium phosphonate	KHP	10 mL L ⁻¹
Pitpom® Plus	YaraVita	Foliar fertilizer	Calcium	Ca	20 mL L ⁻¹
Regalis® Plus	BASF	PRI, growth regulator	Prohexadione-calcium	Pro-Ca	2.5 g L ⁻¹
Rhodofix®	Nufarm	Thinning agent	1-Naphtylacetic acid	NAA	1.5 g L ⁻¹
Trafos® Mg-Ca-Si	Tradecorps	Foliar fertilizer	P, K, Mg, Ca, Si	Mg-Ca-Si	10 mL L ⁻¹

805

806 Table 2: Wild-type strain and knock-out mutants of *E. amylovora* used in this study

807

Strain name	Abbreviation	Characteristics	Reference
CFBP1430	<i>Ea</i> WT	Wild-type strain isolated from <i>Crataegus</i>	(Paulin et al., 1973)
PMV6023	<i>Ea t3ss</i>	<i>hrcV</i> ::MudIIIPR13, Cm ^r , HR ⁻ , path ⁻	(Barry et al., 1995)
PMV6112	<i>Ea hrpN</i>	<i>hrpN</i> ::MudIIIPR13, Cm ^r , HR ⁺ , path ⁺	(Tharaud et al., 1994)
M52	<i>Ea dspA/E</i>	<i>dspA/E</i> ::uidA-Km, Km ^r , HR ⁻ , path ⁻	(Gaudriault et al., 1997)
PMV6089	<i>Ea ams</i>	<i>ams</i> ::MudIIIPR13, Cm ^r , HR ⁺ , path ⁻	(Tharaud et al., 1994)

Cm^r: chloramphenicol resistant; Km^r: kanamycin resistant, HR: hypersensitive response

808

809

810 Figure Legends

811

812 Figure 1: Daily kinetics of transcripts and proteins accumulation of MdAGGs, MdPR-2 and
 813 MdPR-10 in young leaves of apple seedlings for 5 days after acibenzolar-S-methyl (ASM) or
 814 water treatment. (A) Relative gene expression levels. Means (solid lines) and individual
 815 values (symbols) of \log_2 ratio of 5 biological replicates per treatment and sampling dates from
 816 2 experimental repeats ($n = 5$). \log_2 ratio relative to the mean of 2 untreated plants sampled
 817 at day 0 (1 sample in each experiment). Statistical differences were established between
 818 treatments at each sampling date by a Wilcoxon rank sum test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: not
 819 significant). Expression curves represent the average expression trend according to the non-
 820 parametric Loess method (span = 0.5). (B) Protein immunostaining. 10 μg of total proteins
 821 were loaded per well and loading homogeneity was verified by Coomassie brilliant blue gel
 822 stained. Representative experiment of 2 experimental repeats is shown.

823

824 Figure 2: Expression and accumulation of MdAGGs in shoot tips (ST), young leaves (Y),
 825 stems (S) and mature leaves (M) of apple seedlings sampled 5 days after acibenzolar-S-
 826 methyl (ASM) or water treatment of either the young or the mature leaf. Each value in colored
 827 cells corresponds to the mean (\pm sd) \log_2 ratio of *MdAGG* expression in the considered
 828 samples ($n=2$ from 2 experimental repeats) relative to the mean of untreated ST samples
 829 (day 0). Red, white and blue colors indicate gene expression above, equal to and below the
 830 mean of this calibrator. Western blot membranes showing MdAGGs accumulation and the
 831 corresponding Coomassie brilliant blue gel of total proteins (15 μg per well) are below each
 832 expression value. Representative experiment from 2 experimental repeats is shown ($n=2$,
 833 same samples as those used for gene expression).

834

835 Figure 3: Relationships between protection efficiency against *Ea* provided by different PRI
 836 candidates and transcripts and proteins accumulation of MdAGGs, MdPR-2 and MdPR-10 in
 837 young leaves of apple seedlings 3 days after treatments. (A) Scatter plot of correlation
 838 between protection efficiency and mean relative gene expression values. Protection
 839 efficiency was evaluated 3 weeks after inoculation on n replicate plots of 10 plants each from
 840 i experimental repeats ($n[i] = 81[27]$ for ASM, $39[13]$ for NAA, $18[6]$ for 6BA and NOM, $15[5]$
 841 for Mg-Ca-Si and Pro-Ca, $12[4]$ for KHCO and KHP, $9[3]$ for Ca). Expression data were
 842 computed from analysis performed on independent experimental repeats ($n = 9$ for ASM, $n =$
 843 5 for NAA, 4 for other PRIs). The mean value of water-treated samples was used for the
 844 calculation of the \log_2 ratio of each defense gene. Red lines represent linear regressions.

845 Error bars represent standard errors. Correlations were computed with Rho (R) of spearman
 846 rank correlation test ($P=0.00075$, 0.017 and 0.05 for *MdAGGs*, *MdPR-2* and *MdPR-10*
 847 respectively). (B) Protein immunostaining. $10\ \mu\text{g}$ of total proteins were loaded per well and
 848 loading homogeneity was verified by Coomassie brilliant blue gel staining. Representative
 849 experiment from 2 experimental repeats is shown. ASM, Acibenzolar-S-Methyl; NAA, 1-
 850 NaphtylAcetic Acid; KHCO_3 , potassium bicarbonate; Pro-Ca, Prohexadione-Calcium; KHP,
 851 potassium phosphonate; Mg-Ca-Si, mineral elements P, K, Mg, Ca and Si; 6BA, 6-
 852 Benzylaminopurine; NOM, Natural Organic Matter; Ca, Calcium.

853

854 Figure 4: Relationships between ASM protection efficiency against *Ea* and MdAGG
 855 transcripts and proteins accumulation in young leaves of apple seedlings. (A) Experimental
 856 design with inoculation or sampling carried out at 7, 14 or 21 days after a single Acibenzolar-
 857 S-Methyl (ASM) or water treatment, or 21 days after the last treatment of a succession of 4
 858 treatments 2 days apart. Arrows represent each application. (B) Protection efficiencies 3
 859 weeks post-inoculation are represented by box plots. Means, medians, IQR and outliers are
 860 indicated by diamonds, lines, boxes and unfilled circles respectively. Whiskers indicate the
 861 most extreme values between the nearest quartile and $1.5 \times \text{IQR}$. Data were obtained from 3
 862 replicate plots of 10 plants in 3 to 4 experimental repeats ($n = 9$ for inoculation carried out 7
 863 days after single treatments and 21 days after 4 treatments, $n = 12$ for inoculation carried out
 864 14 and 21 days after single treatments). (C) Relative gene expression of *MdAGGs*. Each
 865 point corresponds to the \log_2 ratio of one biological replicate, with 2 independent
 866 experimental repeats containing 2 to 3 replicates per repeat ($n = 5$). The mean value of
 867 water-treated samples was used for the calculation of the \log_2 ratio within each sampling
 868 date. Significance of Wilcoxon rank sum test: $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$, ns: not
 869 significant. (D) Protein immunostaining. $10\ \mu\text{g}$ of total proteins were loaded per well and
 870 loading homogeneity was verified by Coomassie brilliant blue gel staining. Representative
 871 experiment from 2 experimental repeats is shown.

872

873 Figure 5: MdAGGs expression and accumulation modulation by *Ea*. (A) *MdAGGs* expression
 874 modulation by *Ea T3SS* in the susceptible MM106 genotype compared to modulation by
 875 Acibenzolar-S-Methyl (ASM) in apple seedlings. Microarray analysis is represented as a
 876 scatter plot comparing the relative expressions (\log_2 ratio) of apple genes in seedlings treated
 877 3 days before with ASM relative to water treatment (x axis, mean of 4 experiments), versus
 878 the relative expression (\log_2 ratio) in MM106 grafted scions inoculated 24 h before inoculation
 879 by *Ea* WT relative to plants inoculated by the *Ea t3ss* mutant (y axis, mean of 2 experiments).

880 Each scattered point represents a single apple gene. *MdAGGs* are represented by white
 881 circles. Gray points correspond to genes that are not significantly differentially expressed in at
 882 least one of the two comparisons ($P > 0.05$ and $-0.5 < \log_2 \text{ratio} < 0.5$). (B) Boxplots representing
 883 *MdAGGs* relative expression (\log_2 ratio) in young leaves of apple seedlings 2 days after
 884 infiltration by *Ea* WT, *Ea t3ss*, *Ea hrpN*, *Ea dspA/E*, *Ea ams* at 10^7 CFU mL⁻¹ and mock.
 885 Means, medians, IQR and outliers are indicated by diamonds, lines, boxes and unfilled
 886 circles respectively. Whiskers indicate the most extreme values between the nearest quartile
 887 and $1.5 \times$ IQR. The mean value of mock-infiltrated samples was used for the calculation of
 888 the \log_2 ratio. Expression values were obtained from n biological replicates from i
 889 experimental repeats ($n[i] = 14[10]$ for *Ea t3ss*, $12[10]$ for control and *Ea* WT, $10[8]$ for *Ea*
 890 *dspA/E* and for *Ea hrpN*, $10[6]$ for *Ea ams*). Significance of Wilcoxon rank sum test: * $P < 0.05$,
 891 ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant. (C) Protein immunostaining targeting *MdAGGs* in
 892 young leaves of apple seedlings 5 days after infiltration by *Ea t3ss*, *Ea dspA/E* at 10^8 CFU
 893 mL⁻¹ and mock. $50 \mu\text{g}$ of total proteins were loaded per well. Loading homogeneity was
 894 verified by Coomassie brilliant blue gel staining. Representative experiment from 2
 895 experimental repeats is shown.

896

897 Figure 6: *MdAGG10*-driven agglutination of *Ea* cells. Agglutination tests of mixtures
 898 containing recombinant *MdAGG10*, or Bovine Serum Albumin (BSA, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) in acidic (pH
 899 4) or near-neutral condition (pH 7.5) (A) Macroscopic view of *MdAGG10* incubated with *Ea*
 900 WT, washed *Ea* WT or *Ea ams* mutant cells at pH 4 or pH 7.5 (scale bar: $200 \mu\text{m}$). (B)
 901 Microscopic view of *MdAGG10*, or BSA incubated with *Ea ams* mutant cells at pH 4 or pH 7.5
 902 (scale bar: $10 \mu\text{m}$). (C and D) Macroscopic view of *Ea ams* cells incubated at pH 4 with
 903 *MdAGG10* or control buffer, both pre-incubated with a concentration range of EPS (C, 0 to
 904 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, scale bar: $100 \mu\text{m}$) or *Ea* LPS extracts (D, 0 to $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$, scale bar: 200
 905 μm) purified from *Ea* WT and *Ea ams* respectively. Bacterial cells were always incubated with
 906 proteins at final concentrations of respectively 10^8 CFU mL⁻¹ and of $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pictures were
 907 taken 30 to 60 minutes after onset of the bacteria/protein incubation at room temperature.

908

909 Figure 7: Auto-association of *MdAGG10* in acidic conditions. (A) Stacked gel filtration profiles
 910 of solubilized *MdAGG10*, diluted in 50 mM Na acetate, 150 mM NaCl at various pH, as
 911 indicated. The arrows indicate the elution volumes of the peaks of molecular weight markers
 912 prepared in the 50 mM Na acetate, 150 mM NaCl (pH 5.4) buffer. All samples were
 913 centrifuged 5 min at $15,000 \times g$ prior to injection. (B) Intrinsic fluorescence spectrum of
 914 solubilized *MdAGG10* samples in different conditions: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH =

915 8.5) or 50 mM Na acetate, 150 mM NaCl (pH = 5.4 down to pH = 3.9). Excitation wavelength
916 was 280 nm. Full circles correspond to non-centrifuged solubilized samples. Open circles
917 correspond to the supernatant of the solubilized samples after 5 min centrifugation at 15,000
918 $\times g$.

919

920 Figure 8: Modulation of pH induced by the bacteria in apple tissues and consequences on the
921 predicted functional sites of MdAGG10. (A and B) Change in pH (A) and conductivity (B) of
922 incubation media of leaf disks sampled from Acibenzolar-S-Methyl (ASM) or water-treated
923 apple seedlings and infiltrated with *Ea* WT or mock for 48 h (n=3, mean \pm SD). (C and D)
924 Predicted surface electrostatic potential of the MdAGG10 model calculated at pH 4 (C) or 7.5
925 (D) using PyMOL molecular graphics program. White, neutral; blue, positive charge; red,
926 negative charge. (E) Superposition of MdAGG10 predicted 3D structure (shown in blue) and
927 template structure (*A. caudatus* amaranthin, PDB: 1jlx, residues 1-154 are shown in green),
928 including position of the ligand Gal- β 1,3-GalNAc- α -O-benzyl (shown in orange). Structures in
929 C, D and E are all represented in the same orientation.

930

931 Figure 9: Glycan or treatments affecting *Ea ams* cell agglutination by MdAGG10 compared to
932 the previously reported apple agglutination factor (Romeiro *et al.*, 1981b). +: treatment or
933 compound inhibits MdAGG10 agglutination (minimal inhibiting concentration for bacterial
934 polysaccharides is 10 to 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$); -: treatment or compound does not inhibit MdAGG10
935 agglutination (highest concentration tested for bacterial polysaccharides is 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$); nd:
936 not determined; Gal, galactose. Glc, glucose. Man, mannose. GlcA, glucuronic acid. PyrGal,
937 4,6-O-pyruvylated galactose. One repeating unit of bacterial polysaccharide is represented
938 for each bacterial strain.

939

940

941

942 **References**

943

944 Aćimović SG, Zeng Q, McGhee GC, Sundin GW, Wise JC (2015) Control of fire blight
945 (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and
946 antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front*
947 *Plant Sci* 6: 16

948 Arora R, Kumar A, Singh IK, Singh A (2020) Pathogenesis related proteins: a defensin for
949 plants but an allergen for humans. *Int J Biol Macromol* 157: 659–672

950 Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, De Castro
951 C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR, Cooper RM (2008) Bacterial
952 polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* 18:
953 1078–1083

954 Bajpai VK, Majumder R, Rather IA, Kim K (2016) Extraction, isolation and purification of
955 exopolysaccharide from lactic acid bacteria using ethanol precipitation method.
956 *Bangladesh J Pharmacol* 11: 573–576

957 Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J, Sakthivel N (2012) Plant β -1,3-glucanases: their
958 biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi.
959 *Biotechnol Lett* 34: 1983–1990

960 Barny MA, Guinebretière MH, Marçais B, Coissac E, Paulin JP, Laurent J (1990) Cloning of a
961 large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Mol Microbiol*
962 4: 777–786

963 Barny MA (1995) *Erwinia amylovora* HrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a
964 reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on
965 tobacco, *Eur J Plant Pathol* 101: 333–340

966 Bauer DF (1972) Constructing confidence sets using rank statistics. *J Am Stat Assoc* 67:
967 687–690

968 Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K (1994) Visualization of capsule formation by
969 *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *Int J Biol Macromol*
970 16: 290–296

971 Bellemann P, Geider K (1992) Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants
972 of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J Gen Microbiol* 138:
973 931–940

974 Bennett RA, Billing E (1980). Origin of polysaccharide component of ooze from plants
975 infected with *Erwinia amylovora*. *J Gen Microbiol* 116: 341–349

- 976 Bocsanczy AM, Nissinen RM, Oh CS, Beer SV (2008) HrpN of *Erwinia amylovora* functions
977 in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol* 9: 425–434
- 978 Bogdanove AJ, Bauer DW, Beer SV (1998) *Erwinia amylovora* secretes DspE, a
979 pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion)
980 pathway. *J Bacteriol* 180: 2244–2247
- 981 Bonn GW, Van der Zwet T (2000) Distribution and economic importance of fire blight. In
982 Vanneste JL (Ed.), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*.
983 CABI, Wallingford, UK, pp 37–53
- 984 Boureau T, ElMaarouf-Bouteau H, Garnier A, Brisset MN, Perino C, Pucheu I, Barny MA
985 (2006) DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and
986 growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Mol*
987 *Plant Microbe Interact* 19: 16–24
- 988 Boureau T, Siamer S, Perino C, Gaubert S, Patrit O, Degrave A, Fagard M, Chevreau E,
989 Barny MA (2011) The HrpN effector of *Erwinia amylovora*, which is involved in type III
990 translocation, contributes directly or indirectly to callose elicitation on apple leaves. *Mol*
991 *Plant Microbe Interact* 24: 577–584
- 992 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
993 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:
994 248–254
- 995 Bradshaw-Rouse JJ, Whatley MH, Coplin DL, Woods A, Sequeira L, Kelman A (1981)
996 Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a corn agglutinin: correlation with
997 extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 42:
998 344–350
- 999 Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin J (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the
1000 accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *Eur J*
1001 *Plant Pathol* 106: 529–536
- 1002 Burse A, Weingart H, Ullrich MS (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump
1003 AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant*
1004 *Microbe Interact* 17: 43–54
- 1005 Casillo A, Ziaco M, Lindner B, Merino S, Mendoza-Barberá E, Tomás JM, Corsaro MM
1006 (2017) Structural characterization of core region in *Erwinia amylovora*
1007 lipopolysaccharide. *Int J Mol Sci* 18: 559
- 1008 Celton J, Gaillard S, Bruneau M, Pelletier S, Aubourg S, Martin-Magniette ML, Navarro L,
1009 Laurens F, Renou JP (2014) Widespread anti-sense transcription in apple is correlated

1010 with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-
1011 transcriptional control. *New Phytol* 203: 287–299

1012 Chizzali C, Gaid MM, Belkheir AK, Hänsch R, Richter K, Flachowsky H, Peil A, Hanke MV,
1013 Liu B, Beerhues L (2012) Differential expression of biphenyl synthase gene family
1014 members in fire-blight-infected apple ‘Holsteiner Cox’. *Plant Physiol* 158: 864–875

1015 Ciopraga J, Gozia O, Tudor R, Brezuica L, Doyle RJ (1999) *Fusarium* sp. growth inhibition by
1016 wheat germ agglutinin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1428: 424–432

1017 Dang L, Rougé P, Van Damme EJM (2017) Amaranthin-like proteins with aerolysin domains
1018 in plants. *Front Plant Sci* 8: 1368

1019 Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA (2004) PDB2PQR: An automated
1020 pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids*
1021 *Res* 32: 665–667

1022 Dow M, Newman MA, von Roepenack E (2000) The induction and modulation of plant
1023 defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* 38: 241–
1024 261

1025 Dugé de Bernonville T, Gaucher M, Flors V, Gaillard S, Paulin JP, Dat JF, Brisset MN (2012)
1026 T3SS-dependent differential modulations of the jasmonic acid pathway in susceptible
1027 and resistant genotypes of *Malus* spp. challenged with *Erwinia amylovora*. *Plant Sci*
1028 188: 1–9

1029 Dugé de Bernonville T, Marolleau B, Staub J, Gaucher M, Brisset MN (2014) Using molecular
1030 tools to decipher the complex world of plant resistance inducers : an apple case study.
1031 *J Agric Food Chem* 62: 11403–11411

1032 Durel CE, Denancé C, Brisset MN (2009) Two distinct major QTL for resistance to fire blight
1033 co-localize on linkage group 12 in apple genotypes ‘Evereste’ and *Malus floribunda*
1034 clone 821. *Genome* 52: 139–147

1035 Duvick JP, Sequeira L (1984) Interaction of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharide
1036 and extracellular polysaccharide with agglutinin from potato tubers. *Appl Environ*
1037 *Microbiol* 48: 192–198

1038 Emeriewen OF, Wöhner T, Flachowsky H, Peil A (2019) *Malus* hosts–*Erwinia amylovora*
1039 interactions: strain pathogenicity and resistance mechanisms. *Front Plant Sci* 10: 551

1040 Gaucher M, Dugé de Bernonville T, Guyot S, Dat JF, Brisset MN (2013) Same ammo,
1041 different weapons: Enzymatic extracts from two apple genotypes with contrasted
1042 susceptibilities to fire blight (*Erwinia amylovora*) differentially convert phloridzin and
1043 phloretin in vitro. *Plant Physiol Biochem* 72: 178–189

- 1044 Gaudriault S, Malandrin L, Paulin JP, Barny MA (1997) DspA, an essential pathogenicity
1045 factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is
1046 secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol Microbiol* 26:
1047 1057–1069
- 1048 Geider K (2000) Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: Structure, biosynthesis,
1049 regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. In Vanneste JL (Ed.), *Fire*
1050 *blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, UK,
1051 pp 117–140
- 1052 Hollander M, Wolfe DA, Chicken E (1973) *Nonparametric Statistical Methods*. John Wiley &
1053 Sons (Eds.), Inc, Hoboken, New Jersey
- 1054 Huang PY, Huang JS, Goodman RN (1975) Resistance mechanisms of apple shoots to an
1055 avirulent strain of *Erwinia amylovora*. *Physiol Plant Pathol* 6: 283–287
- 1056 Hurkman WJ, Tanaka CK (2006) Extraction of wheat endosperm proteins for proteome
1057 analysis. *J Chromatogr B* 849: 344–350
- 1058 Jang H, Matthews KR (2018) Influence of surface polysaccharides of *Escherichia coli*
1059 O157:H7 on plant defense response and survival of the human enteric pathogen on
1060 *Arabidopsis thaliana* and lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Microbiol* 70: 254–261
- 1061 Kassambara A (2020) ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots. R package, version
1062 0.4.0. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html>
- 1063 Kesten C, Gámez-arjona FM, Menna A, Scholl S, Dora S, Huerta AI, Huang H, Tintor N,
1064 Kinoshita T, Rep M, Krebs M, Schumacher K, Sánchez-Rodríguez C (2019) Pathogen-
1065 induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. *EMBO J* 38:
1066 e101822
- 1067 King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin
1068 and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44: 301–307.
- 1069 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
1070 bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
- 1071 Lecourieux D, Rajeva R, Pugin A (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New*
1072 *Phytol* 171: 249–269
- 1073 Liu JJ, Ekramoddoullah AKM (2006) The family 10 of plant pathogenesis-related proteins:
1074 their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses.
1075 *Physiol Mol Plant Pathol* 68: 3–13
- 1076 van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant
1077 pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Rep* 12: 245–264

- 1078 van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins
1079 in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135–162
- 1080 Marolleau B, Gaucher M, Heintz C, Degrave A, Warneys R, Orain G, Lemarquand A, Brisset
1081 MN (2017) When a plant resistance inducer leaves the lab for the field: Integrating
1082 ASM into routine apple protection practices. *Front Plant Sci* 8: 1938
- 1083 Maxson-Stein K, He SY, Hammerschmidt R, Jones AL (2002) Effect of treating apple trees
1084 with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein
1085 genes. *Plant Dis* 86: 785–790
- 1086 Mirelman D, Galun E, Sharon N, Lotan R (1975) Inhibition of fungal growth by wheat germ
1087 agglutinin. *Nature* 256: 414–416
- 1088 Nicaise V, Roux M, Zipfel C (2009) Recent advances in PAMP-triggered immunity against
1089 bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol*
1090 150: 1638–1647
- 1091 Nimtz M, Mort A, Domke T, Wray V, Zhang Y, Qiu F, Coplin D, Geider K (1996) Structure of
1092 amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia*
1093 *amylovora*. *Carbohydr Res* 287: 59–76
- 1094 Paulin JP, Samson R (1973) Feu bactérien en France. II. Caractères des souches d'*Erwinia*
1095 *amylovora* (Burrill) Winslow et al., 1920, isolées du foyer franco-belge. *Ann*
1096 *Phytopathol* 5: 389–397
- 1097 Peil A, Emeriewen OF, Khan A, Kostick S, Malnoy M (2021) Status of fire blight resistance
1098 breeding in *Malus*. *J Plant Pathol* 103: 3–12.
- 1099 Peumans WJ, Van Damme E (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 109:
1100 347–352
- 1101 Pontais I, Treutter D, Paulin JP, Brisset MN (2008) *Erwinia amylovora* modifies phenolic
1102 profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiol*
1103 *Plant* 132: 262–271
- 1104 Prokhorchik M, Choi S, Chung EH, Won K, Dangl JL, Sohn KH (2020) A host target of a
1105 bacterial cysteine protease virulence effector plays a key role in convergent evolution
1106 of plant innate immune system receptors. *New Phytol* 225: 1327–1342
- 1107 R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
1108 for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- 1109 Ray TC, Smith ARW, Carter KJ, Hignett RC (1986) Composition of lipopolysaccharides from
1110 four strains of *Erwinia amylovora*. *J Gen Microbiol* 132: 3159–3167

- 1111 Rodriguez-Loureiro I, Latza VM, Fragneto G, Schneck E (2018) Conformation of single and
1112 interacting lipopolysaccharide surfaces bearing O-side chains. *Biophys J* 114: 1624–
1113 1635
- 1114 Romeiro R, Karr A, Goodman R (1981a) *Erwinia amylovora* cell wall receptor for apple
1115 agglutinin. *Physiol Plant Pathol* 19: 383–390
- 1116 Romeiro R, Karr A, Goodman R (1981b) Isolation of a factor from apple that agglutinates
1117 *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* 68: 772–777
- 1118 Rosati C, Cadic A, Duron M, Renou JP, Simoneau P (1997) Molecular cloning and
1119 expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of *Forsythia*
1120 *x intermedia*. *Plant Mol Biol* 35: 303–311
- 1121 Sequeira L, Graham TL (1977) Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas*
1122 *solanacearum* by potato lectin. *Physiol Plant Pathol* 11: 43–54
- 1123 Shine MB, Xiao X, Kachroo P, Kachroo A (2019) Signaling mechanisms underlying systemic
1124 acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Sci* 279: 81–86
- 1125 Skłodowska M, Mikiciński A, Wielanek M, Kuźniak E, Piotr S (2018) Phenolic profiles in apple
1126 leaves and the efficacy of selected phenols against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Eur*
1127 *J Plant Pathol* 151: 213–228
- 1128 Smyth GK (2005) limma: Linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey VJ,
1129 Huber W, Irizarry RA, Dudoit S (eds) *Bioinformatics and computational biology*
1130 *solutions using R and Bioconductor*. *Statistics for biology and health*. Springer, New
1131 York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0_23
- 1132 Steinberger EM, Beer SV (1988) Creation and complementation of pathogenicity mutants of
1133 *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 1: 135–144
- 1134 Tharaud M, Menggad M, Paulin JP, Laurent J (1994) Virulence, growth, and surface
1135 characteristics of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. *Microbiology*
1136 140: 659–669
- 1137 Thibaud AJ, Davidian J, Sentenac H, Soler A, Grignon C (1988) H⁺ cotransports in corn roots
1138 as related to the surface pH shift induced by active H⁺. *Plant Physiol* 88: 1469–1473
- 1139 Thompson SV (2000) Epidemiology of fire blight. In Vanneste JL (Ed.), *Fire blight: the*
1140 *disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, UK, pp 9–37
- 1141 Thordal-Christensen H (2020) A holistic view on plant effector-triggered immunity presented
1142 as an iceberg model. *Cell Mol Life Sci* 77: 3963–3976
- 1143 Transue TR, Smith AK, Mo H, Goldstein IJ, Saper MA (1997) Structure of benzyl T-antigen
1144 disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat Struct Mol Biol* 4: 779–
1145 783

- 1146 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F
1147 (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric
1148 averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.1
- 1149 Venisse JS, Barny MA, Paulin JP, Brisset MN (2003) Involvement of three pathogenicity
1150 factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible
1151 interaction in pear. *FEBS Lett* 537: 198–202
- 1152 Vergne E, Dugé de Bernonville T, Dupuis F, Sourice S, Cournol R, Berthelot P, Barny MA,
1153 Brisset MN, Chevreau E (2014) Membrane-targeted HrpN_{Ea} can modulate apple
1154 defense gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* 27: 125–135
- 1155 Vogt I, Wöhner T, Richter K, Flachowsky H, Sundin GW, Wensing A, Savory EA, Geider K,
1156 Day B, Hanke MV, Magda-Viola H, Peil A (2013) Gene-for-gene relationship in the
1157 host-pathogen system *Malus × robusta* 5-*Erwinia amylovora*. *New Phytol* 197: 1262–
1158 1275
- 1159 Wang X, Yang F, von Bodman SB (2012) The genetic and structural basis of two distinct
1160 terminal side branch residues in stewartan and amylovoran exopolysaccharides and
1161 their potential role in host adaptation. *Mol Microbiol* 83: 195–207
- 1162 Warneys R, Gaucher M, Robert P, Aligon S, Anton S, Aubourg S, Barthes N, Braud F,
1163 Cournol R, Gadenne C, Heintz C, Brisset MN, Degrave A (2018) Acibenzolar-S-methyl
1164 reprograms apple transcriptome toward resistance to rosy apple aphid. *Front Plant Sci*
1165 9: 1795
- 1166 Webb B, Sali A (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr*
1167 *Protoc Bioinformatics* 54: 5.6.1-5.6.37
- 1168 Wei Z, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of
1169 hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*
1170 257: 85–88
- 1171 Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen TL, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H,
1172 Dunnington D (2020) ggplot2: Create elegant data visualisation using the grammar of
1173 graphics. R package, version 3.3.3. [https://cran.r-](https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html)
1174 [project.org/web/packages/ggplot2/index.html](https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html)
- 1175 Wöhner TW, Richter K, Sundin GW, Zhao Y, Stockwell VO, Sellmann J, Flachowsky H,
1176 Hanke MV, Peil A (2018) Inoculation of *Malus* genotypes with a set of *Erwinia*
1177 *amylovora* strains indicates a gene-for-gene relationship between the effector gene
1178 *eop1* and both *Malus floribunda* 821 and *Malus* 'Evereste'. *Plant Pathol* 67: 938–947

1179 Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas
1180 AN, Alva V (2018) A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new
1181 HHpred server at its core. *J Mol Biol* 430: 2237–2243

Figure 1

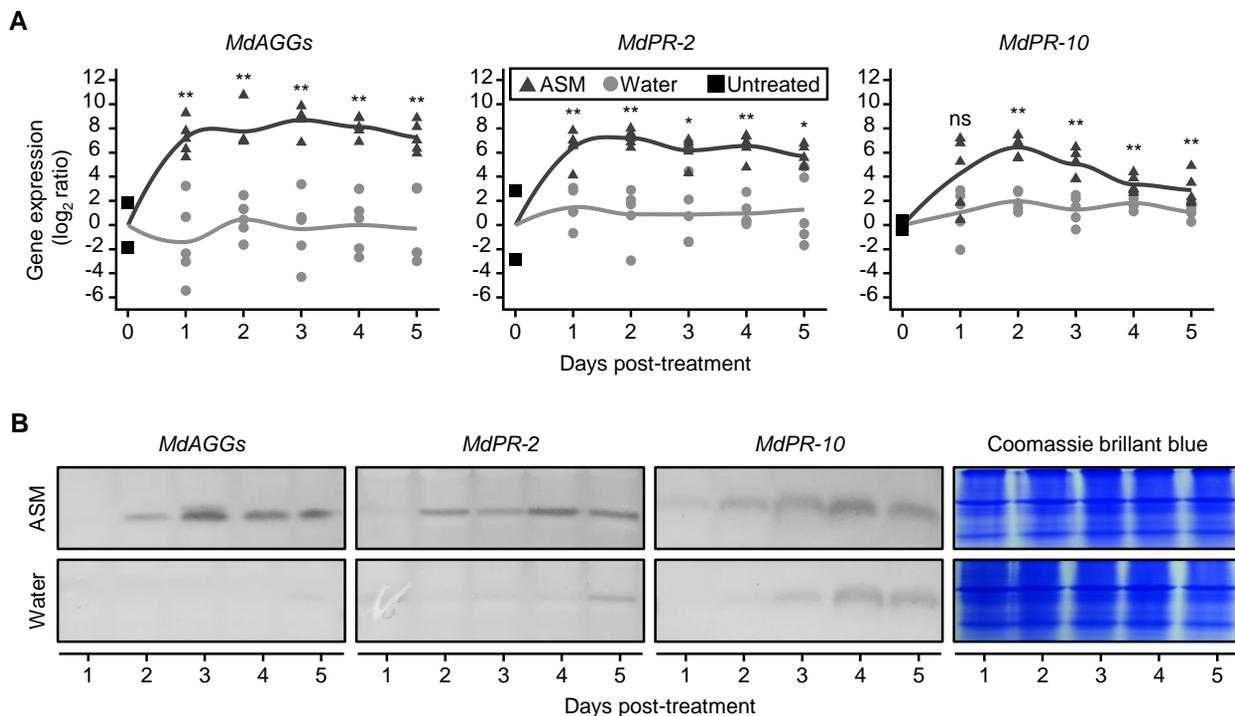


Figure 1: Daily kinetics of transcripts (A) and proteins (B) accumulation of MdAGGs, MdPR-2 and MdPR-10 in young leaves of apple seedlings for 5 days after ASM or water treatment. (A) Relative gene expression levels. Means (solid lines) and individual values (symbols) of \log_2 ratio of 5 biological replicates per treatment and sampling dates from 2 experimental repeats ($n = 5$). \log_2 ratio relative to the mean of 2 untreated plants sampled at day 0 (1 sample in each experiment). Statistical differences were established between treatments at each sampling date by a Wilcoxon rank sum test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: not significant). Expression curves represent the average expression trend according to the non-parametric Loess method (span = 0.5). (B) Protein immunostaining. 10 μg of total proteins were loaded per well and loading homogeneity was verified by Coomassie brilliant blue gel stained. Representative experiment of 2 experimental repeats is shown.

Figure 2

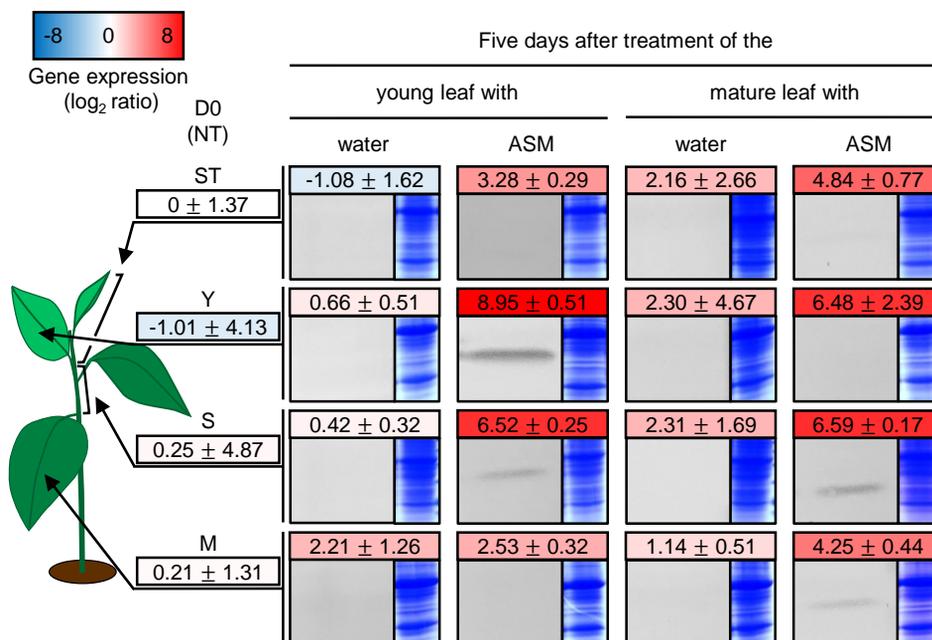


Figure 2: Expression and accumulation of MdAGGs in shoot tips (ST), young leaves (Y), stems (S) and mature leaves (M) of apple seedlings sampled 5 days after ASM or water treatment of either the young or the mature leaf. Each value in colored cells corresponds to the mean (\pm sd) \log_2 ratio of MdAGG expression in the considered samples ($n=2$ from 2 experimental repeats) relative to the mean of untreated ST samples (day 0). Red, white and blue colors indicate gene expression above, equal to and below the mean of this calibrator. Western blot membranes showing MdAGGs accumulation and the corresponding Coomassie brilliant blue gel of total proteins (15 μ g per well) are below each expression value. Representative experiment from 2 experimental repeats is shown ($n=2$, same samples as those used for gene expression).

Figure 3

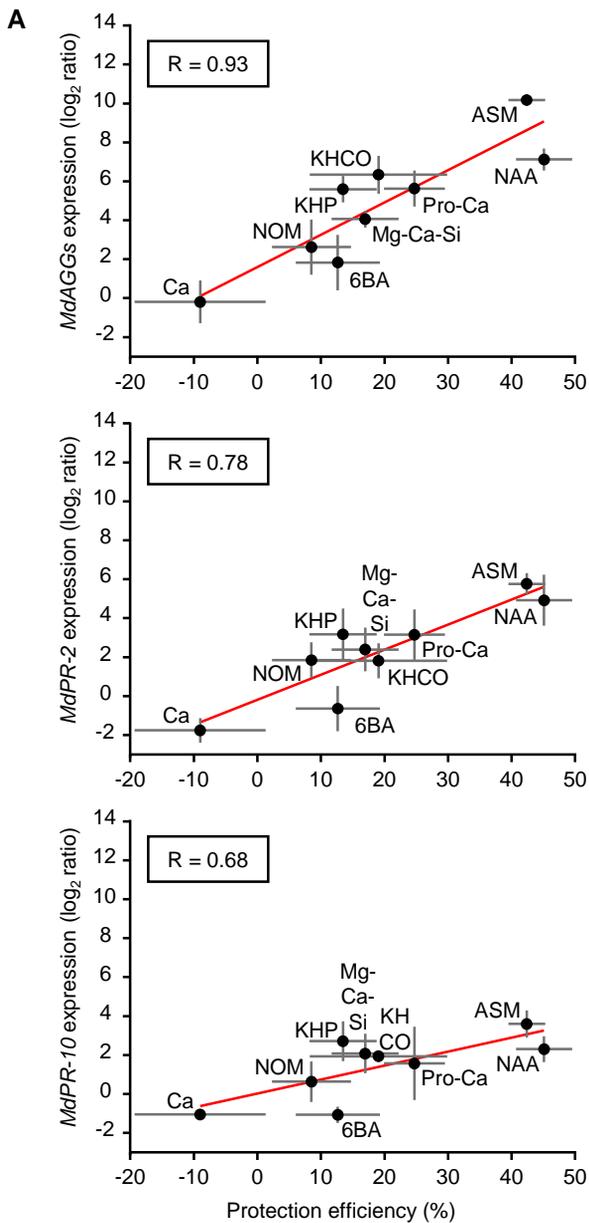


Figure 3: Relationships between protection efficiency against *Ea* provided by different PRI candidates and transcripts (A) and proteins accumulation (B) of MdAGGs, MdPR-2 and MdPR-10 in young leaves of apple seedlings 3 days after treatments. (A) Scatter plot of correlation between protection efficiency and mean relative gene expression values. Protection efficiency was evaluated 3 weeks after inoculation on *n* replicate plots of 10 plants each from *i* experimental repeats ($n[i] = 81[27]$ for ASM, $39[13]$ for NAA, $18[6]$ for 6BA and NOM, $15[5]$ for Mg-Ca-Si and Pro-Ca, $12[4]$ for KHCO and KHP, $9[3]$ for Ca). Expression data were computed from analysis performed on independent experimental repeats ($n = 9$ for ASM, $n = 5$ for NAA, 4 for other PRIs). The mean value of water-treated samples was used for the calculation of the log₂ ratio of each defense gene. Red lines represent linear regressions. Error bars represent standard errors. Correlations were computed with Rho (R) of spearman rank correlation test ($P=0.00075$, 0.017 and 0.05 for *MdAGGs*, *MdPR-2* and *MdPR-10* respectively). (B) Protein immunostaining. $10 \mu\text{g}$ of total proteins were loaded per well and loading homogeneity was verified by Coomassie brilliant blue gel staining. Representative experiment from 2 experimental repeats is shown. ASM, Acibenzolar-S-Methyl; NAA, 1-NaphtylAcetic Acid; KHCO, potassium bicarbonate; Pro-Ca, Prohexadione-Calcium; KHP, potassium phosphonate; Mg-Ca-Si, mineral elements P, K, Mg, Ca and Si; 6BA, 6-Benzylaminopurine; NOM, Natural Organic Matter; Ca, Calcium.

Figure 4

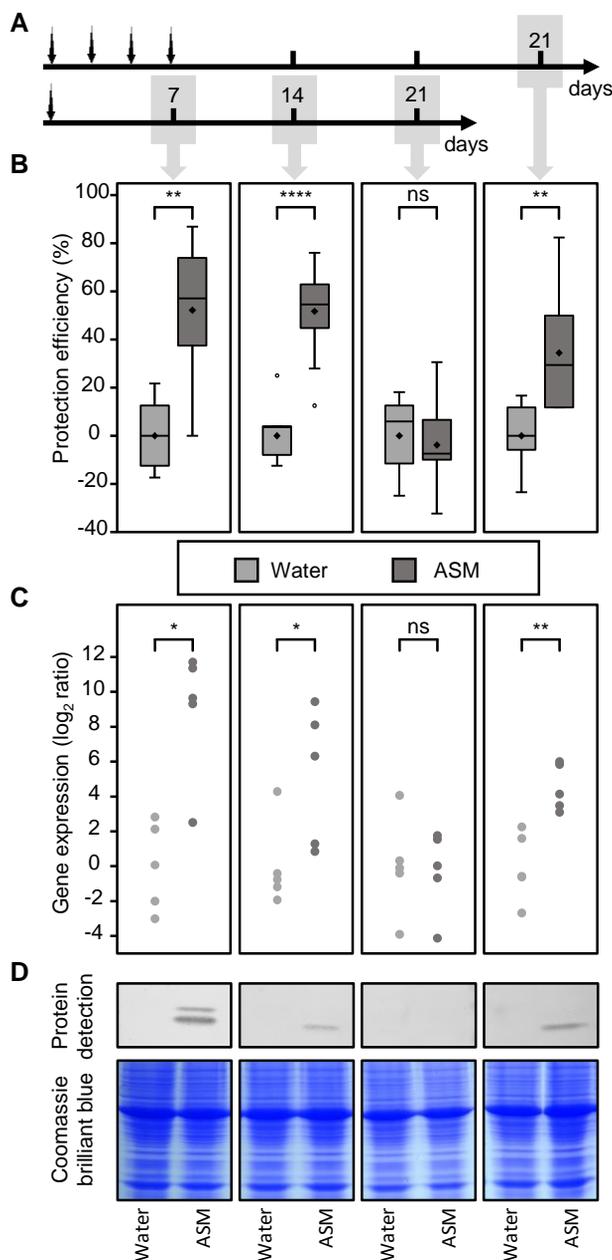


Figure 4: Relationships between ASM protection efficiency against *Ea* and MdAGG transcripts and proteins accumulation in young leaves of apple seedlings. (A) Experimental design with inoculation or sampling carried out at 7, 14 or 21 days after a single ASM or water treatment, or 21 days after the last treatment of a succession of 4 treatments 2 days apart. Arrows represent each application. (B) Protection efficiencies 3 weeks post-inoculation are represented by box plots. Means, medians, IQR and outliers are indicated by diamonds, lines, boxes and unfilled circles respectively. Whiskers indicate the most extreme values between the nearest quartile and 1.5 x IQR. Data were obtained from 3 replicate plots of 10 plants in 3 to 4 experimental repeats ($n = 9$ for inoculation carried out 7 days after single treatments and 21 days after 4 treatments, $n = 12$ for inoculation carried out 14 and 21 days after single treatments). (C) Relative gene expression of MdAGGs. Each point corresponds to the \log_2 ratio of one biological replicate, with 2 independent experimental repeats containing 2 to 3 replicates per repeat ($n = 5$). The mean value of water-treated samples was used for the calculation of the \log_2 ratio within each sampling date. Significance of Wilcoxon rank sum test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$, ns: not significant. (D) Protein immunostaining. 10 μg of total proteins were loaded per well and loading homogeneity was verified by Coomassie brilliant blue gel staining. Representative experiment from 2 experimental repeats is shown.

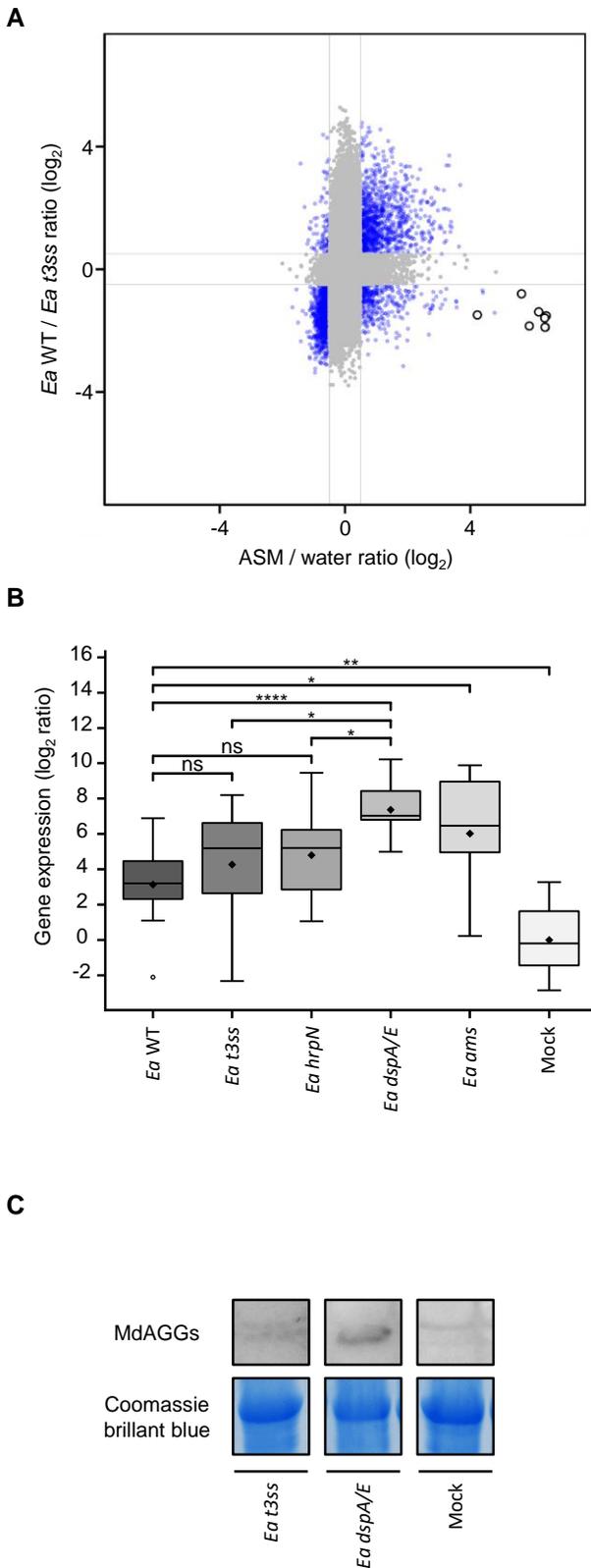


Figure 5: MdAGGs expression (A, B) and accumulation (C) modulation by *Ea*. (A) MdAGGs expression modulation by *Ea* T3SS in the susceptible MM106 genotype compared to modulation by ASM in apple seedlings. Microarray analysis is represented as a scatter plot comparing the relative expressions (\log_2 ratio) of apple genes in seedlings treated 3 days before with ASM relative to water treatment (x axis, mean of 4 experiments), versus the relative expression (\log_2 ratio) in MM106 grafted scions inoculated 24 h before inoculation by *Ea* WT relative to plants inoculated by the *Ea* t3ss mutant (y axis, mean of 2 experiments). Each scattered point represents a single apple gene. MdAGGs are represented by white circles. Gray points correspond to genes that are not significantly differentially expressed in at least one of the two comparisons ($P > 0.05$ and $-0.5 < \log_2 \text{ ratio} < 0.5$). (B) Boxplots representing MdAGGs relative expression (\log_2 ratio) in young leaves of apple seedlings 2 days after infiltration by *Ea* WT, *Ea* t3ss, *Ea* hrpN, *Ea* dspA/E, *Ea* ams at 10^7 CFU mL $^{-1}$ and mock. Means, medians, IQR and outliers are indicated by diamonds, lines, boxes and unfilled circles respectively. Whiskers indicate the most extreme values between the nearest quartile and 1.5 x IQR. The mean value of mock-infiltrated samples was used for the calculation of the \log_2 ratio. Expression values were obtained from n biological replicates from i experimental repeats ($n[i] = 14[10]$ for *Ea* t3ss, 12[10] for control and *Ea* WT, 10[8] for *Ea* dspA/E and for *Ea* hrpN, 10[6] for *Ea* ams). Significance of Wilcoxon rank sum test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant. (C) Protein immunostaining targeting MdAGGs in young leaves of apple seedlings 5 days after infiltration by *Ea* t3ss, *Ea* dspA/E at 10^8 CFU mL $^{-1}$ and mock. 50 μ g of total proteins were loaded per well. Loading homogeneity was verified by Coomassie brilliant blue gel staining. Representative experiment from 2 experimental repeats is shown.

Figure 6

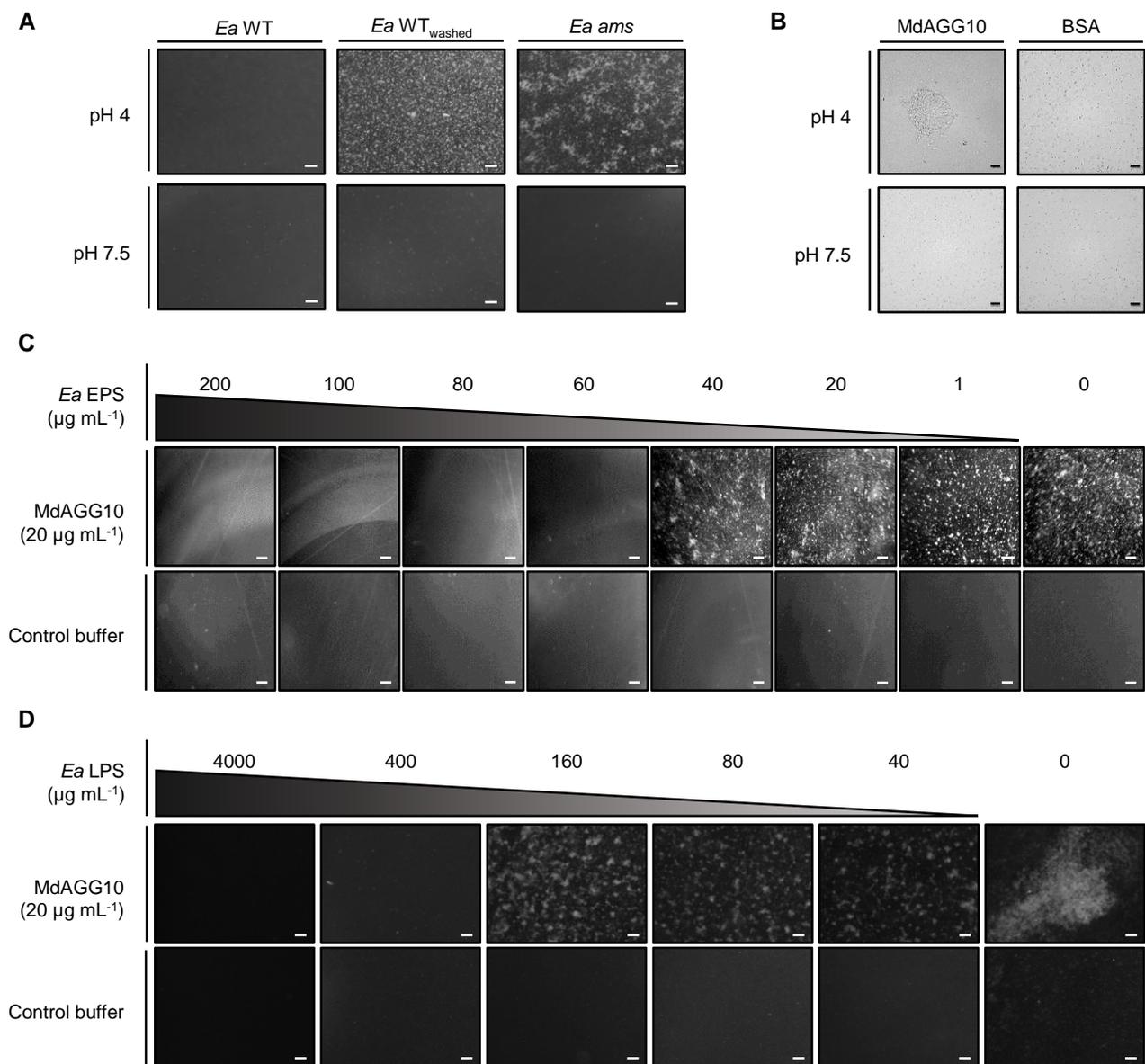


Figure 6: MdAGG10-driven agglutination of *Ea* cells. Agglutination tests of mixtures containing recombinant MdAGG10, or BSA (20 µg mL⁻¹) in acidic (pH 4) or near-neutral condition (pH 7.5) (A) Macroscopic view of MdAGG10 incubated with *Ea* WT, washed *Ea* WT or *Ea ams* mutant cells at pH 4 or pH 7.5 (scale bar: 200 µm). (B) Microscopic view of MdAGG10, or BSA incubated with *Ea ams* mutant cells at pH 4 or pH 7.5 (scale bar: 10 µm). (C and D) Macroscopic view of *Ea ams* cells incubated at pH 4 with MdAGG10 or control buffer, both pre-incubated with a concentration range of EPS (C, 1 to 200 µg mL⁻¹, scale bar: 100 µm) or *Ea* LPS extracts (D, 1 to 4000 µg mL⁻¹, scale bar: 200 µm) purified from *Ea* WT and *Ea ams* respectively. Bacterial cells were always incubated with proteins at final concentrations of respectively 10⁸ CFU mL⁻¹ and of 20 µg mL⁻¹. Pictures were taken 30 to 60 minutes after onset of the bacteria/protein incubation at room temperature.

Figure 7

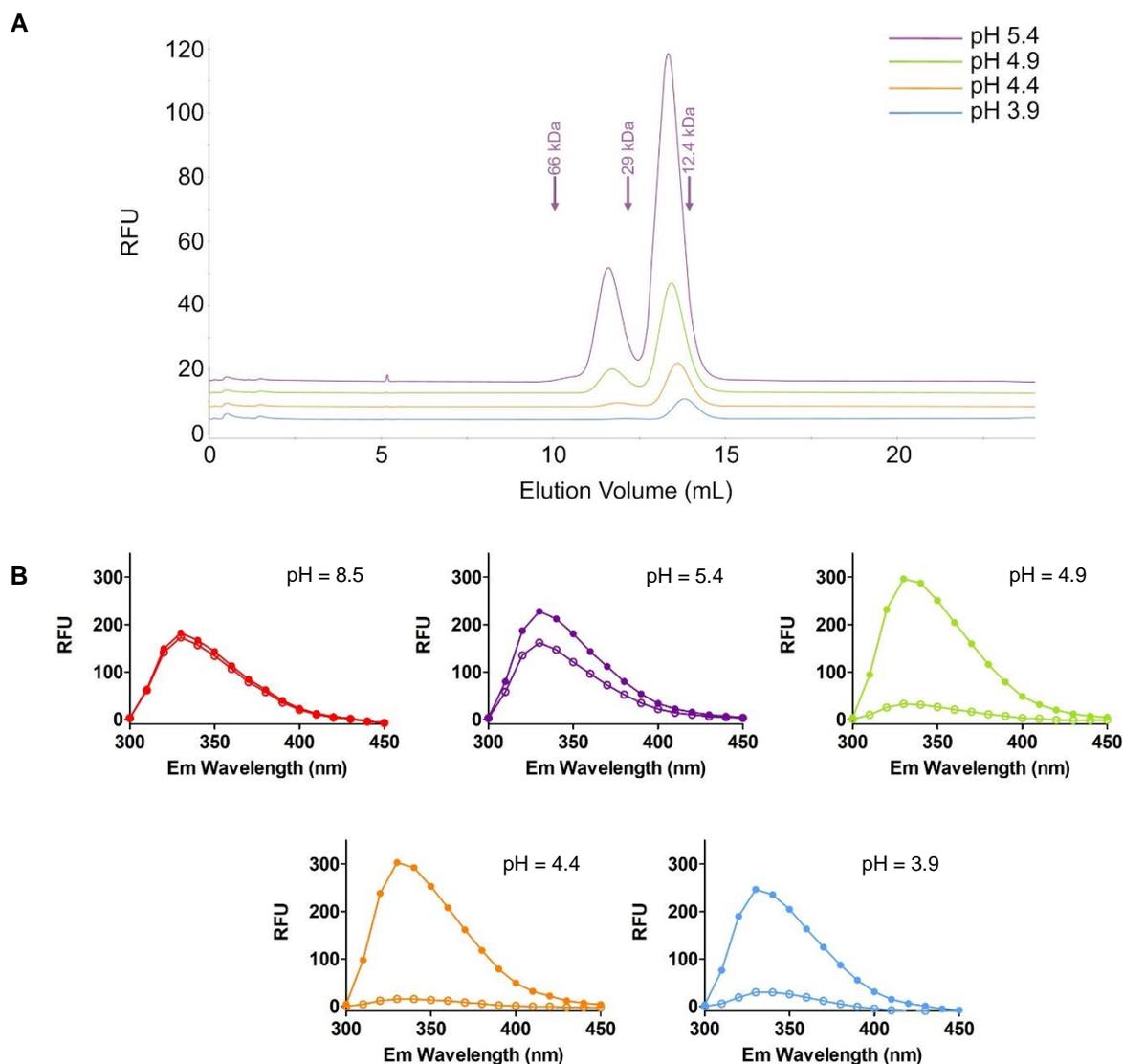


Figure 7: Auto-association of MdAGG10 in acidic conditions (A) Stacked gel filtration profiles of solubilized MdAGG10, diluted in 50 mM Na acetate, 150 mM NaCl at various pH, as indicated. The arrows indicate the elution volumes of the peaks of molecular weight markers prepared in the 50 mM Na acetate, 150 mM NaCl (pH 5.4) buffer. All samples were centrifuged 5 min at 15,000 × g prior to injection. (B) Intrinsic fluorescence spectrum of solubilized MdAGG10 samples in different conditions : 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH = 8.5) or 50 mM Na acetate, 150 mM NaCl (pH = 5.4 down to pH = 3.9). Excitation wavelength was 280 nm. Full circles correspond to non-centrifuged solubilized samples. Open circles correspond to the supernatant of the solubilized samples after 5 min centrifugation at 15,000 × g.

Figure 8

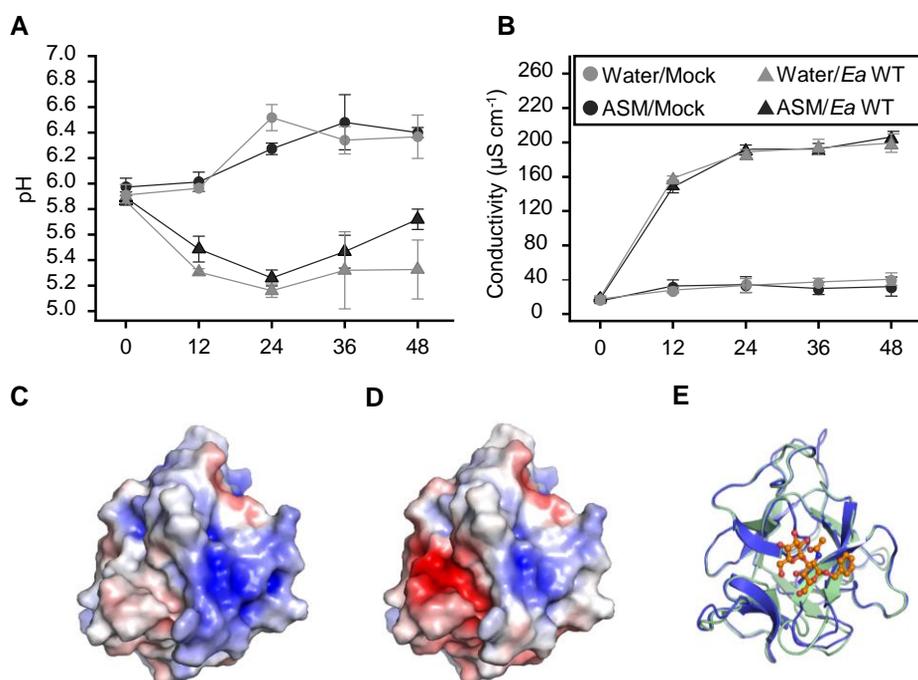


Figure 8: Modulation of pH induced by the bacteria in apple tissues and consequences on the predicted functional sites of MdAGG10. (A and B) Change in pH (A) and conductivity (B) of incubation media of leaf disks sampled from ASM- or water-treated apple seedlings and infiltrated with *Ea* WT or mock for 48 h. (C and D) Predicted surface electrostatic potential of the MdAGG10 model calculated at pH 4 (C) or 7.5 (D) using PyMOL molecular graphics program. White, neutral; blue, positive charge; red, negative charge. (E) Superposition of MdAGG10 predicted 3D structure (shown in blue) and template structure (*A. caudatus* amaranthin, PDB: 1jlx, residues 1-154 are shown in green), including position of the ligand Gal- β 1,3-GalNAc- α -O-benzyl (shown in orange). Structures in C, D and E are all represented in the same orientation.

Figure 9

Bacterial polysaccharides			Mono-, di-, polysaccharides and other treatments		
Inhibitor tested	MdAGG10	Agglutination factor*	Inhibitor tested	MdAGG10	Agglutination factor*
<i>K. pneumoniae</i> K21	+	nd	Heat (30 min / 100 °C)	-	-
<i>K. pneumoniae</i> K26	+	nd	CaCl ₂ (5 mM)	-	-
			EDTA (5 mM)	-	-
<i>K. pneumoniae</i> K74	+	nd	D-glucose (5 mM)	-	-
			D-galactose (5 mM)	-	-
<i>E. amylovora</i> WT	+	+	D-fructose (5 mM)	-	-
			L-arabinose (5 mM)	-	-
<i>L. helveticus</i> K16	-	nd	L-rhamnose (5 mM)	-	nd
			D-galacturonic acid (5 mM)	-	-
			Trehalose (5 mM)	-	nd
			Sucrose (5 mM)	-	-
			Maltose (5 mM)	-	nd
			<i>N</i> -acetyl-D-galactosamine (5 mM)	-	-
			4,6-Pyr- α -D-Galp-OMe (5 mM)	-	nd
			Carboxymethylcellulose (5 mg mL ⁻¹)	+	+
			Pectin (5 mg mL ⁻¹)	+	+
					(Na-poly-galacturonate)

* Romeiro et al., 1981b

Figure 9: Glycan or treatments affecting *Ea ams* cell agglutination by MdAGG10 compared to the previously reported apple agglutination factor (Romeiro *et al.*, 1981b). +: treatment or compound inhibits MdAGG10 agglutination (minimal inhibiting concentration for bacterial polysaccharides is 10 to 60 μ g mL⁻¹); -: treatment or compound does not inhibit MdAGG10 agglutination (highest concentration tested for bacterial polysaccharides is 200 μ g mL⁻¹); nd: not determined; Gal, galactose. Glc, glucose. Man, mannose. GlcA, glucuronic acid. PyrGal, 4,6-O-pyruvylated galactose. One repeating unit of bacterial polysaccharide is represented for each bacterial strain.

Parsed Citations

Ćimović SG, Zeng Q, McGhee GC, Sundin GW, Wise JC (2015) Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front Plant Sci* 6: 16

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Arora R, Kumar A, Singh IK, Singh A (2020) Pathogenesis related proteins: a defensin for plants but an allergen for humans. *Int J Biol Macromol* 157: 659–672

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Jensen TT, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR, Cooper RM (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* 18: 1078–1083

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bajpai VK, Majumder R, Rather IA, Kim K (2016) Extraction, isolation and purification of exopolysaccharide from lactic acid bacteria using ethanol precipitation method. *Bangladesh J Pharmacol* 11: 573–576

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J, Sakthivel N (2012) Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol Lett* 34: 1983–1990

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Barny MA, Guinebretière MH, Marçais B, Coissac E, Paulin JP, Laurent J (1990) Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Mol Microbiol* 4: 777–786

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Barny MA (1995) *Erwinia amylovora* HrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco, *Eur J Plant Pathol* 101: 333–340

Bauer DF (1972) Constructing confidence sets using rank statistics. *J Am Stat Assoc* 67: 687–690

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K (1994) Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *Int J Biol Macromol* 16: 290–296

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bellemann P, Geider K (1992) Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J Gen Microbiol* 138: 931–940

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bennett RA, Billing E (1980). Origin of polysaccharide component of ooze from plants infected with *Erwinia amylovora*. *J Gen Microbiol* 116: 341–349

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bocsanczy AM, Nissinen RM, Oh CS, Beer SV (2008) HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol* 9: 425–434

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bogdanove AJ, Bauer DW, Beer SV (1998) *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. *J Bacteriol* 180: 2244–2247

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bonn GW, Van der Zwet T (2000) Distribution and economic importance of fire blight. In Vanneste JL (Ed.), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, UK, pp 37–53

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

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

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Boureau T, Siamer S, Perino C, Gaubert S, Patrit O, Degrave A, Fagard M, Chevreau E, Barny MA (2011) The HrpN effector of *Erwinia amylovora*, which is involved in type III translocation, contributes directly or indirectly to callose elicitation on apple leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 577–584

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Bradshaw-Rouse JJ, Whatley MH, Coplin DL, Woods A, Sequeira L, Kelman A (1981) Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a

- corn agglutinin: correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 42: 344–350
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin J (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *Eur J Plant Pathol* 106: 529–536
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Burse A, Weingart H, Ullrich MS (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 43–54
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Casillo A, Zico M, Lindner B, Merino S, Mendoza-Barberá E, Tomás JM, Corsaro MM (2017) Structural characterization of core region in *Erwinia amylovora* lipopolysaccharide. *Int J Mol Sci* 18: 559
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Celton J, Gaillard S, Bruneau M, Pelletier S, Aubourg S, Martin-Magniette ML, Navarro L, Laurens F, Renou JP (2014) Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control. *New Phytol* 203: 287–299
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Chizzali C, Gaid MM, Belkheir AK, Hänsch R, Richter K, Flachowsky H, Peil A, Hanke MV, Liu B, Beerhues L (2012) Differential expression of biphenyl synthase gene family members in fire-blight-infected apple 'Holsteiner Cox'. *Plant Physiol* 158: 864–875
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Ciopruga J, Gozia O, Tudor R, Brezua L, Doyle RJ (1999) *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1428: 424–432
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dang L, Rougé P, Van Damme EJM (2017) Amarantin-like proteins with aerolysin domains in plants. *Front Plant Sci* 8: 1368
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA (2004) PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32: 665–667
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dow M, Newman MA, von Roepenack E (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* 38: 241–261
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dugé de Bernonville T, Gaucher M, Flors V, Gaillard S, Paulin JP, Dat JF, Brisset MN (2012) T3SS-dependent differential modulations of the jasmonic acid pathway in susceptible and resistant genotypes of *Malus* spp. challenged with *Erwinia amylovora*. *Plant Sci* 188: 1–9
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Dugé de Bernonville T, Marolleau B, Staub J, Gaucher M, Brisset MN (2014) Using molecular tools to decipher the complex world of plant resistance inducers: an apple case study. *J Agric Food Chem* 62: 11403–11411
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Durel CE, Denancé C, Brisset MN (2009) Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821. *Genome* 52: 139–147
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Duvick JP, Sequeira L (1984) Interaction of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide with agglutinin from potato tubers. *Appl Environ Microbiol* 48: 192–198
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Emeriewen OF, Wöhner T, Flachowsky H, Peil A (2019) *Malus* hosts–*Erwinia amylovora* interactions: strain pathogenicity and resistance mechanisms. *Front Plant Sci* 10: 551
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Gaucher M, Dugé de Bernonville T, Guyot S, Dat JF, Brisset MN (2013) Same ammo, different weapons: Enzymatic extracts from two apple genotypes with contrasted susceptibilities to fire blight (*Erwinia amylovora*) differentially convert phloridzin and phloretin in vitro. *Plant Physiol Biochem* 72: 178–189
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Gaudriault S, Malandrin L, Paulin JP, Barny MA (1997) DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol Microbiol* 26: 1057–1069
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Geider K (2000) Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: Structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovan and levan. In Vanneste JL (Ed.), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, UK, pp 117–140
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Hollander M, Wolfe DA, Chicken E (1973) *Nonparametric Statistical Methods*. John Wiley & Sons (Eds.), Inc, Hoboken, New Jersey

- Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Huang PY, Huang JS, Goodman RN (1975)** Resistance mechanisms of apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora*. *Physiol Plant Pathol* 6: 283–287
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Hurkman WJ, Tanaka CK (2006)** Extraction of wheat endosperm proteins for proteome analysis. *J Chromatogr B* 849: 344–350
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Jang H, Matthews KR (2018)** Influence of surface polysaccharides of *Escherichia coli* O157:H7 on plant defense response and survival of the human enteric pathogen on *Arabidopsis thaliana* and lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Microbiol* 70: 254–261
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Kassambara A (2020)** ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots. R package, version 0.4.0. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html>
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Kesten C, Gámez-arjona FM, Menna A, Scholl S, Dora S, Huerta AI, Huang H, Tintor N, Kinoshita T, Rep M, Krebs M, Schumacher K, Sánchez-Rodríguez C (2019)** Pathogen-induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. *EMBO J* 38: e101822
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954)** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44: 301–307.
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Lecourieux D, Rajeva R, Pugin A (2006)** Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol* 171: 249–269
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Liu JJ, Ekramoddoullah AKM (2006)** The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol* 68: 3–13
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994)** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Rep* 12: 245–264
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006)** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135–162
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Marolleau B, Gaucher M, Heintz C, Degraeve A, Warneys R, Orain G, Lemarquand A, Brisset MN (2017)** When a plant resistance inducer leaves the lab for the field: Integrating ASM into routine apple protection practices. *Front Plant Sci* 8: 1938
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Maxson-Stein K, He SY, Hammerschmidt R, Jones AL (2002)** Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Dis* 86: 785–790
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Mirelman D, Galun E, Sharon N, Lotan R (1975)** Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature* 256: 414–416
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Nicaise V, Roux M, Zipfel C (2009)** Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol* 150: 1638–1647
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Nimtz M, Mort A, Domke T, Wray V, Zhang Y, Qiu F, Coplin D, Geider K (1996)** Structure of amylovan, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydr Res* 287: 59–76
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Paulin JP, Samson R (1973)** Feu bactérien en France. II. Caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., 1920, isolées du foyer franco-belge. *Ann Phytopathol* 5: 389–397
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Peil A, Emeriewen OF, Khan A, Kostick S, Malnoy M (2021)** Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *J Plant Pathol* 103: 3–12.
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Peumans WJ, Van Damme E (1995)** Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 109: 347–352
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)
- Pontais I, Treutter D, Paulin JP, Brisset MN (2008)** *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiol Plant* 132: 262–271
Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Prokhorchik M, Choi S, Chung EH, Won K, Dangl JL, Sohn KH (2020) A host target of a bacterial cysteine protease virulence effector plays a key role in convergent evolution of plant innate immune system receptors. *New Phytol* 225: 1327–1342

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Ray TC, Smith ARW, Carter KJ, Hignett RC (1986) Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *J Gen Microbiol* 132: 3159–3167

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Rodriguez-Loureiro I, Latza VM, Fragneto G, Schneck E (2018) Conformation of single and interacting lipopolysaccharide surfaces bearing O-side chains. *Biophys J* 114: 1624–1635

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Romeiro R, Karr A, Goodman R (1981a) *Erwinia amylovora* cell wall receptor for apple agglutinin. *Physiol Plant Pathol* 19: 383–390

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Romeiro R, Karr A, Goodman R (1981b) Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* 68: 772–777

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Rosati C, Cadic A, Duron M, Renou JP, Simoneau P (1997) Molecular cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of *Forsythia × intermedia*. *Plant Mol Biol* 35: 303–311

Sequeira L, Graham TL (1977) Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiol Plant Pathol* 11: 43–54

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Shine MB, Xiao X, Kachroo P, Kachroo A (2019) Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Sci* 279: 81–86

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Skłódowska M, Mikiciński A, Wielanek M, Kuźniak E, Piotr S (2018) Phenolic profiles in apple leaves and the efficacy of selected phenols against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Eur J Plant Pathol* 151: 213–228

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Smyth GK (2005) *limma*: Linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey VJ, Huber W, Irizarry RA, Dudoit S (eds) *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Statistics for biology and health. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0_23

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Steinberger EM, Beer SV (1988) Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 1: 135–144

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Tharaud M, Menggad M, Paulin JP, Laurent J (1994) Virulence, growth, and surface characteristics of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. *Microbiology* 140: 659–669

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Thibaud AJ, Davidian J, Sentenac H, Soler A, Grignon C (1988) H⁺ cotransports in corn roots as related to the surface pH shift induced by active H⁺. *Plant Physiol* 88: 1469–1473

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Thompson SV (2000) Epidemiology of fire blight. In Vanneste JL (Ed.), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, UK, pp 9–37

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Thordal-Christensen H (2020) A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cell Mol Life Sci* 77: 3963–3976

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Transue TR, Smith AK, Mo H, Goldstein IJ, Saper MA (1997) Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat Struct Mol Biol* 4: 779–783

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.1

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Venisse JS, Barny MA, Paulin JP, Brisset MN (2003) Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. *FEBS Lett* 537: 198–202

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Vergne E, Dugé de Bernonville T, Dupuis F, Sourice S, Cournol R, Berthelot P, Barny MA, Brisset MN, Chevreau E (2014) Membrane-targeted HrpNEa can modulate apple defense gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* 27: 125–135

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Vogt I, Wöhner T, Richter K, Flachowsky H, Sundin GW, Wensing A, Savory EA, Geider K, Day B, Hanke MV, Magda-Viola H, Peil A (2013) Gene-for-gene relationship in the host-pathogen system *Malus × robusta* 5-Erwinia amylovora. *New Phytol* 197: 1262–1275

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wang X, Yang F, von Bodman SB (2012) The genetic and structural basis of two distinct terminal side branch residues in stewartan and amylovoran exopolysaccharides and their potential role in host adaptation. *Mol Microbiol* 83: 195–207

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Warneys R, Gaucher M, Robert P, Aligon S, Anton S, Aubourg S, Barthes N, Braud F, Cournol R, Gadenne C, Heintz C, Brisset MN, Degraeve A (2018) Acibenzolar-S-methyl reprograms apple transcriptome toward resistance to rosy apple aphid. *Front Plant Sci* 9: 1795

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Webb B, Sali A (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics* 54: 5.6.1-5.6.37

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wei Z, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85–88

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen TL, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D (2020) ggplot2: Create elegant data visualisation using the grammar of graphics. R package, version 3.3.3. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html>

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Wöhner TW, Richter K, Sundin GW, Zhao Y, Stockwell VO, Sellmann J, Flachowsky H, Hanke MV, Peil A (2018) Inoculation of *Malus* genotypes with a set of *Erwinia amylovora* strains indicates a gene-for-gene relationship between the effector gene eop1 and both *Malus floribunda* 821 and *Malus 'Evereste'*. *Plant Pathol* 67: 938–947

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva V (2018) A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *J Mol Biol* 430: 2237–2243

Google Scholar: [Author Only](#) [Title Only](#) [Author and Title](#)

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) ERWAN CHAVONET
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **01 / 09 / 2021**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



RÉSUMÉ

Comprendre le mode d'action des stimulateurs de défense des plantes (SDP) reste un enjeu pour fiabiliser leur utilisation en protection des cultures. Ce travail de thèse s'intéresse à deux aspects peu explorés : la caractérisation biologique d'effecteurs de résistance induits par les SDP et l'effet de stress abiotiques sur leur efficacité. Le modèle d'étude concerne le pommier et l'ASM (ou acibenzolar-S-methyl), SDP efficace contre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, en conditions contrôlées. Une première partie des travaux ont mis en évidence une forte corrélation entre le niveau de résistance induite vis-à-vis de la bactérie et le comportement transcriptionnel et protéique d'une famille de lectines, dénommée agglutinines (MdAGGs) et figurant parmi les défenses ASM-dépendantes les plus induites. La capacité d'*E. amylovora* à réprimer leur transcription dans des plantes non traitées a par ailleurs été observée. La production d'une protéine recombinante à partir d'un représentant de cette famille a permis de démontrer ses propriétés agglutinantes sur *E. amylovora in vitro*, dans des conditions compatibles avec celles rencontrées par la bactérie *in planta*, ce qui suggère l'implication des MdAGGs dans le ralentissement du processus infectieux quand le pommier est pré-traité à l'ASM. Dans une seconde partie des travaux, nous avons mis en évidence une perte d'efficacité de l'ASM par un stress de chaleur simulant des conditions stressantes rencontrées en verger sous nos latitudes. Une analyse transcriptomique a pu montrer que le déséquilibre défenses/croissance provoqué par l'ASM est moins fort lorsque les plantes subissent le stress abiotique. Une sélection de 25 gènes a pu être validée par RT-qPCR pour avoir des marqueurs susceptibles d'expliquer la perte d'efficacité de l'ASM. L'ensemble de ce travail fournit un effecteur de résistance original du pommier, des candidats effecteurs autres qui pourraient mériter des caractérisations biologiques ultérieures et une connaissance utile pour améliorer le positionnement des SDP en verger par rapport à la température.

mots-clés : acibenzolar-s-methyl, agglutinines, chaleur, pommier, feu bactérien, résistance

ABSTRACT

Understanding the mode of action of plant resistance inducers (PRI) remains a challenge in order to make their use in crop protection more reliable. This thesis focuses on two barely explored aspects: the functional characterization of resistance effectors induced by PRI and the effect of abiotic stresses on PRI efficacy. Our studies rely on the apple/ASM (or acibenzolar-S-methyl) model, ASM being an effective PRI capable of controlling the fire blight agent *Erwinia amylovora* under controlled conditions. A first chapter presents results which demonstrate a strong correlation between the level of resistance induced against the bacterium and the production of a family of lectins, named agglutinins (MdAGGs). MdAGGs stand out from other defence markers insofar they belong to genes that are among the most induced upon ASM treatment. The ability of *E. amylovora* to repress their transcription in apple plants was also observed. The production of a recombinant protein from a representative member of this family allowed us to demonstrate *in vitro* its agglutinating properties on *E. amylovora*. Interestingly, these properties were observed under electrochemical conditions similar to those encountered *in planta* by the bacterium. Altogether, these results suggest that MdAGGs, produced by apple upon ASM treatment, contribute to a process slowing down the bacterial infection. The following chapter highlights the impact of heat stress on ASM efficiency, lowered when plants are subjected to temperature regimens encountered in orchards during typical heat waves recently recorded in our latitudes. A transcriptomic analysis showed that the defence/growth imbalance caused by ASM is less pronounced when plants are subjected to heat stress. A selection of 25 genes were validated by RT-qPCR as potential markers for loss of ASM efficiency. Taken together, this work provides the community with an original apple resistance effector, other effector candidates that need to be explored further, and useful knowledge to improve the timing of PRI application in the orchard regarding thermal conditions.

keywords : acibenzolar-s-methyl, agglutinins, heat, apple, fire blight, resistance

Titre : Caractérisation d'un effecteur de résistance du pommier à *Erwinia amylovora* induit par un stimulateur de défenses des plantes (ASM), et étude de l'impact de la chaleur sur l'efficacité du traitement

Mots clés : acibenzolar-s-methyl, agglutinines, chaleur, pommier, feu bactérien, résistance

Résumé : Comprendre le mode d'action des stimulateurs de défense des plantes (SDP) reste un enjeu pour fiabiliser leur utilisation en protection des cultures. Ce travail de thèse s'intéresse à deux aspects peu explorés : la caractérisation biologique d'effecteurs de résistance induits par les SDP et l'effet de stress abiotiques sur leur efficacité. Le modèle d'étude concerne le pommier et l'ASM (ou acibenzolar-S-methyl), SDP efficace contre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, en conditions contrôlées. Une première partie des travaux ont mis en évidence une forte corrélation entre le niveau de résistance induite vis-à-vis de la bactérie et le comportement transcriptionnel et protéique d'une famille de lectines, dénommée agglutinines (MdAGGs) et figurant parmi les défenses ASM-dépendantes les plus induites. La capacité d'*E. amylovora* à réprimer leur transcription dans des plantes non traitées a par ailleurs été observée. La production d'une protéine recombinante à partir d'un représentant de cette famille a permis de démontrer ses propriétés agglutinantes sur *E. amylovora in vitro*,

dans des conditions compatibles avec celles rencontrées par la bactérie *in planta*, ce qui suggère l'implication des MdAGGs dans le ralentissement du processus infectieux quand le pommier est pré-traité à l'ASM. Dans une seconde partie des travaux, nous avons mis en évidence une perte d'efficacité de l'ASM par un stress de chaleur simulant des conditions stressantes rencontrées en verger sous nos latitudes. Une analyse transcriptomique a pu montrer que le déséquilibre défenses/croissance provoqué par l'ASM est moins fort lorsque les plantes subissent le stress abiotique. Une sélection de 25 gènes a pu être validée par RT-qPCR pour avoir des marqueurs susceptibles d'expliquer la perte d'efficacité de l'ASM. L'ensemble de ce travail fournit un effecteur de résistance original du pommier, des candidats effecteurs autres qui pourraient mériter des caractérisations biologiques ultérieures et une connaissance utile pour améliorer le positionnement des SDP en verger par rapport à la température.

Title : Characterization of an effector of resistance to *Erwinia amylovora* in apple induced by a plant resistance inducer (ASM), and study of the impact of heat on treatment efficiency

Keywords : acibenzolar-s-methyl, agglutinins, heat, apple, fire blight, resistance

Abstract : Understanding the mode of action of plant resistance inducers (PRI) remains a challenge in order to make their use in crop protection more reliable. This thesis focuses on two barely explored aspects: the functional characterization of resistance effectors induced by PRI and the effect of abiotic stresses on PRI efficacy. Our studies rely on the apple/ASM (or acibenzolar-S-methyl) model, ASM being an effective PRI capable of controlling the fire blight agent *Erwinia amylovora* under controlled conditions. A first chapter presents results which demonstrate a strong correlation between the level of resistance induced against the bacterium and the production of a family of lectins, named agglutinins (MdAGGs). MdAGGs stand out from other defence markers insofar they belong to genes that are among the most induced upon ASM treatment. The ability of *E. amylovora* to repress their transcription in apple plants was also observed. The production of a recombinant protein from a representative member of this family allowed us to demonstrate *in vitro* its agglutinating properties on *E. amylovora*.

Interestingly, these properties were observed under electrochemical conditions similar to those encountered *in planta* by the bacterium. Altogether, these results suggest that MdAGGs, produced by apple upon ASM treatment, contribute to a process slowing down the bacterial infection. The following chapter highlights the impact of heat stress on ASM efficiency, lowered when plants are subjected to temperature regimens encountered in orchards during typical heat waves recently recorded in our latitudes. A transcriptomic analysis showed that the defence/growth imbalance caused by ASM is less pronounced when plants are subjected to heat stress. A selection of 25 genes were validated by RT-qPCR as potential markers for loss of ASM efficiency. Taken together, this work provides the community with an original apple resistance effector, other effector candidates that need to be explored further, and useful knowledge to improve the timing of PRI application in the orchard regarding thermal conditions.