



**HAL**  
open science

# Déterminants moléculaires de la résistance au puceron vert (*Myzus persicae*) chez le pêcher (*Prunus persica*): étude multi-omique des réponses à l'infestation

Pauline Le Boulch

► **To cite this version:**

Pauline Le Boulch. Déterminants moléculaires de la résistance au puceron vert (*Myzus persicae*) chez le pêcher (*Prunus persica*): étude multi-omique des réponses à l'infestation. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2022. Français. NNT : 2022AVIG0371 . tel-04055663

**HAL Id: tel-04055663**

**<https://theses.hal.science/tel-04055663>**

Submitted on 3 Apr 2023

**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 DOCTORANT D'AVIGNON UNIVERSITE**

Ecole Doctorale n°536 Agrosciences & Sciences

**Spécialité/ Discipline de Doctorat : BIOLOGIE**

Unité de Recherche Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL)  
INRAE PACA

Unité Mixte de Recherche Qualisud Avignon Université

---

**Déterminants moléculaires de la résistance à *Myzus persicae*  
chez *Prunus persica* : Etude multi-omique des réponses à  
l'infestation**

---

Présentée par **Pauline LE BOULCH**

Soutenue publiquement le **30 août 2022** devant le jury composé de :

**Dr. Bruno Favery**

*UMR Institut Sophia Agrobiotech – INRAE Sophia Antipolis*

Rapporteur

**Dr. Annick MOING**

*UMR1332 BFP – INRAE Bordeaux Nouvelle-Aquitaine*

Rapporteuse

**Dr. Nathalie Boissot**

*UR GAFL – INRAE PACA*

Examinatrice

**Dr. Yvan RAHBE**

*UMR5240 CNRS MAP - INRAE Lyon*

Examineur

**Dr. Raphaël LUGAN**

*UMR Qualisud – Avignon Université*

Directeur de thèse

**Dr. Jean-Luc POESSEL**

*UR GAFL – INRAE PACA*

Co-encadrant de thèse



## Résumé

Parmi les nombreux ravageurs auxquels les plantes sont confrontées, les pucerons sont certainement ceux qui causent le plus de dommages aux cultures en raison de leur multiplication rapide, des dégâts directs qu'ils occasionnent et des virus phytopathogènes qu'ils transmettent. Le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*, Sulzer) est un ravageur généraliste qui s'attaque à un large panel de plantes incluant le pêcher, son hôte primaire, mais également de nombreux hôtes secondaires de familles botaniques diverses dont différentes espèces cultivées. Des travaux antérieurs ont mis en évidence des accessions de pêcher présentant une résistance à *M. persicae* conférée par le locus *Rm* et caractérisée par un phénomène d'antixénose qui provoque rapidement le départ des pucerons. L'objectif de notre travail était d'identifier par une approche intégrée de transcriptomique et de métabolomique les facteurs impliqués dans l'expression de la résistance du pêcher à *M. persicae* afin d'aboutir à une description quasi exhaustive des fonctions biologiques activées ou réprimées par l'infestation. Notre démarche a consisté à comparer les réponses à l'infestation de deux génotypes de pêcher, GF305 sensible à *M. persicae* et Rubira porteur du gène de résistance *Rm2*. Nous avons concentré principalement notre étude sur le temps de 48 h après infestation qui correspond à la mise en place effective d'une résistance induite par *Rm2*.

L'analyse transcriptomique et métabolomique comparative des deux variétés de pêcher a mis en évidence une réponse très limitée de GF305 à l'infestation alors que nous avons observé une reconfiguration profonde du transcriptome chez Rubira. Une tendance similaire a été observée dans les profils métaboliques. Cette reconfiguration transcriptionnelle s'est traduite par une répression de gènes intervenant dans des fonctions de croissance et développement et par une surexpression des gènes de défense ce qui témoigne d'une réorientation du fonctionnement cellulaire au profit de la défense. Cette observation a été confortée par la réduction importante de pools métaboliques de carbone, d'azote et de soufre et par l'accumulation de conjugués d'acide caféique ayant des propriétés anti-appétentes ou toxiques vis à vis des pucerons. Parmi les gènes de défense, la surexpression des récepteurs PRR et NLR suggère une activation conjointe des deux branches du système immunitaire des plantes, PTI et ETI. De plus, l'enrichissement des gènes liés au stress oxydatif, couplé à l'activation de voies métaboliques génératrices de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> telles que la synthèse photorespiratoire de glyoxylate et l'activation du cycle futile P5C/proline, souligne l'implication probable de la synthèse des ROS dans la résistance de Rubira à *M. persicae*. L'apparition de lésions nécrotiques révélatrices d'une réaction hypersensible pourrait également être imputée à un burst oxydatif en réponse à l'infestation. Le déclenchement d'une réponse systémique acquise a également été suggéré par l'activation du métabolisme des acides salicylique et pipécolique. Enfin, l'implication de l'acide pipécolique dans la résistance des plantes aux pucerons étant très peu documentée, nous avons cherché à déterminer le rôle de ce composé dans la résistance du pêcher. Nous avons étudié l'effet d'un apport exogène en acide pipécolique d'une part sur le comportement de fuite de *M. persicae* et sur le développement des colonies aphidiennes et d'autre part sur le profil métabolique des apex. Bien que cette expérimentation n'ait pas montré la capacité de l'acide pipécolique à induire la résistance, elle a apporté de nouveaux éléments concernant les marqueurs métaboliques inductibles par cette molécule.

En conclusion, ce travail illustre l'ampleur et la complexité de l'expression de la résistance à *M. persicae* conférée par *Rm2* et souligne l'intérêt de l'intégration de données transcriptomiques et métabolomiques pour l'analyse de l'interaction plante/pucerons. Ces connaissances fonctionnelles seront cruciales pour exploiter les sources de résistance naturelles et contrôler durablement les populations aphidiennes.

## Abstract

Of the many pests that plants face, aphids are certainly the most damaging to crops due to their rapid multiplication, the direct damage they cause and the plant pathogenic viruses they transmit. The green peach aphid (*Myzus persicae*, Sulzer) is a generalist pest that attacks a wide range of plants including peach, its primary host, but also numerous secondary hosts from various botanical families including different cultivated species. Previous work has highlighted peach accessions with resistance to *M. persicae* conferred by the *Rm* locus that was characterised by an antixenosis phenomenon that rapidly causing the aphids to leave.

The objective of our study was to identify, using an integrated transcriptomics and metabolomics approach, the factors involved in the expression of resistance to *M. persicae* in peach trees in order to obtain a quasi-exhaustive description of the biological functions activated or repressed by the infestation. We compared the responses to infestation of two peach genotypes, GF305 susceptible to *M. persicae* and Rubira carrying the *Rm2* resistance gene, 48 h post-infestation, a period corresponding to the effective establishment of *Rm2*-induced resistance.

Comparative transcriptomic and metabolomic analysis of the two peach varieties revealed a very limited response of GF305 to infestation while profound reconfigurations in Rubira were observed. The transcriptional reconfiguration resulted in a repression of genes involved in growth and development functions and an overexpression of defence genes, indicating a reorientation of cell function towards defence. This observation was confirmed by the significant reduction in metabolic pools of carbon, nitrogen and sulphur and by the accumulation of caffeic acid conjugates with anti-appetent or toxic properties towards aphids. Among the defence genes, the overexpression of PRR and NLR receptors suggested a joint activation of both branches of the plant immune system, PTI and ETI. Furthermore, the enrichment of oxidative stress-related genes, coupled with the activation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating metabolic pathways such as photorespiratory glyoxylate synthesis and P5C/proline futile cycle activation, underlined the probable involvement of ROS synthesis in Rubira resistance to *M. persicae*. The appearance of necrotic lesions indicative of a hypersensitive reaction could also be attributed to an oxidative burst in response to infestation. The triggering of an acquired systemic response was also suggested by the activation of salicylic and pipercolic acid metabolism. Finally, as the involvement of pipercolic acid in plant resistance to aphids is poorly documented and in order to determine the role of this compound in peach resistance, the effect of an exogenous supply of pipercolic acid on the escape behaviour of *M. persicae* and on the development of aphid colonies, as well as on the metabolic profile of the apices was investigated. Although this experiment did not show the capacity of pipercolic acid to induce resistance, it provided new informations concerning the metabolic markers inducible by this molecule.

To conclude, this work illustrates the extent and complexity of the expression of resistance to *M. persicae* conferred by *Rm2* and underlines the interest of integrating transcriptomic and metabolomic data for the analysis of the plant/aphid interaction. This functional knowledge will be crucial in order to exploit natural sources of resistance and sustainably control aphid populations.

## Remerciements

A travers ces quelques mots je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce projet et celles qui m'ont soutenue pendant ces 4 années.

Je commence évidemment par mes deux principaux responsables de thèse **Raphaël Lugan**, mon directeur, et **Jean-Luc Poëssel**, mon encadrant. Merci de m'avoir fait confiance pour la réalisation de ce projet et de m'avoir aiguillée et conseillée durant tout ce temps. Merci à **Raphaël** de m'avoir formée aux analyses métabolomiques et permis de développer mon autonomie. Merci aussi de m'avoir poussée toujours plus loin dans mes retranchements et de m'avoir montrée que j'étais capable de faire les choses, même si je n'étais pas toujours contente ! Merci enfin pour l'accueil chaleureux et tous les bons moments passés. Rassure-toi le chat noir s'en va bientôt, les machines vont mieux fonctionner désormais. Mes plus sincères remerciements à **Jean-Luc** également, pour la patience que tu as eu et tout ce que tu m'as appris durant ces années. Les connaissances que tu m'as transmises sont inestimables, merci d'avoir pris le temps de m'apprendre les secrets de la résistance du pêcher, même si pour cela j'ai dû tuer des milliers de pucerons... Rendez-vous en Bretagne !

Je tiens également à remercier **David Roux**, mon autre encadrant de thèse qui a été essentiel tant au plan scientifique pour les analyses transcriptomiques et l'apprentissage de R qu'au plan moral, parce que c'est toujours mieux d'être deux pour se plaindre de la distance qui nous sépare de notre terre natale et que finir les soirées sur une tisane à la verveine du jardin c'est coooool.

J'adresse aussi mes remerciements à trois personnes qui m'ont aidée dans la réalisation des expérimentations et l'analyse des données : **Virginie Chareyron** qui m'a appris à gérer l'élevage des pucerons et les semis de pêcher. Tu as été d'une aide très précieuse durant toute cette thèse, toujours à vouloir rendre service et m'aider. Je n'aurais pas pu faire autant sans toi. Merci pour tout et merci aussi pour m'avoir initiée à la langue des signes. **Genetière Conejero** qui m'a formée à l'immunohistochimie et la microscopie confocale. Merci pour le temps que tu as passé à me conseiller, m'orienter et pour tous les essais que tu as réalisés avec et sans moi. **Olivier Chevallier** qui a toujours été présent lorsque j'avais des problèmes sur ces fameuses machines maudites de métabolomique !

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse **Yvan Rahbé**, **Florence Val**, **François Lecompte**, **Jean Charles Martin** et **Joffrey Moiroux** d'avoir répondu présent et de m'avoir conseillée durant ce projet.

Evidemment, je n'oublie pas de remercier **Coline Pons**, ma Jeanine. Aucun mot n'est assez fort pour exprimer l'amitié que j'ai pour toi. Je ne pourrai jamais assez te remercier de tout ce que tu m'as apportée ces dernières années. Tu as su briser ma carapace et me permettre de m'ouvrir aux autres. J'ai énormément appris de toi et sans toi je n'aurais sûrement pas aussi bien supporté la vie de doctorant. Merci d'avoir toujours été à l'écoute, merci pour les sorties, les voyages et les journées passées ensemble (même si mon compte en banque a souvent vu rouge !!). Ce sont des choses que je n'oublierai jamais et la suite va me paraître bien triste sans toi et les potins qu'on aime tant.

Je n'oublie pas non plus **Salah Fgaier**, le premier du clan à obtenir le titre de docteur. Merci pour ton accueil, ton partage et ton amitié. Le crew des « totally spies » demeurera toujours ! Merci aussi pour tous les couscous et la découverte de la cuisine tunisienne. Rendez-vous en Tunisie pour le grand évènement.

Toujours dans le clan des doctorants, je voudrais remercier **Dresch Cédric**, le petit jeune de la bande, mauvais perdant à Just dance (oui ça restera Cédric) et complètement obnubilé par le rythme circadien. Surtout ne change pas, ta personnalité, ton énergie et ton amitié ont été d'un véritable secours lorsque le moral n'y était pas, je te remercie pour tout, tu vas me manquer.

Merci également à **Nathalie Lacrampe** pour le soutien moral lors des pannes machines et pour tous les bons moments passés. Merci aussi à **Thomas Baron**, d'avoir réussi à me supporter dans le bureau et **Louis Ramade**, qui partage depuis quelques mois notre bureau mais qui s'est déjà bien adapté à l'ambiance du groupe !

Je tiens également à remercier les nombreuses personnes de l'Université qui ont rendu les journées plus joyeuses ; **Saad**, **Simon**, **Gilles**, **Dominiq**, **Véronique**, **Sandrine**, **Florence**, **François**, **Silué** et **Fanny**.

Enfin, merci à **Jocelyn** de me soutenir et de rendre ma vie plus belle et à ma famille, en particulier mes parents de m'avoir toujours soutenue et aidée en toute situation. J'espère que vous serez fiers de moi.

# Table des matières

## Chapitre 1 : Introduction générale ..... 1

---

1. L'immunité des plantes .....	3
1.1. Co-évolution plante/bioagresseur.....	3
1.2. Concept de relation gène pour gène.....	4
1.3. Modèle général de l'immunité des plantes face aux bioagresseurs.....	5
2. Application du modèle en Zig Zag à la résistance des plantes aux pucerons	9
2.1. Particularités des insectes phloémophages .....	9
2.2. Mécanismes de résistances des plantes aux insectes phloémophages .....	16
2.3. Approches transcriptomiques et métabolomiques des interactions plantes/pucerons .....	52
3. Le modèle Pêcher - puceron vert.....	56
3.1. Le pêcher : <i>Prunus persica</i> .....	56
3.2. Le puceron vert : <i>Myzus persicae</i> .....	62
4. Objectifs des recherches .....	67

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes..... 69

---

1. Matériel végétal .....	71
2. Matériel animal .....	73
2.1. Condition d'élevage de <i>Myzus persicae</i> .....	73
2.2. Méthode d'infestation .....	73

## Chapitre 3 : Molecular mechanisms of resistance to *Myzus persicae* conferred by the peach *Rm2* gene : a multi-omics view ..... 74

---

1. Introduction .....	76
2. Materials and methods .....	79
2.1. Plant material .....	79
2.2. Aphids.....	79
2.3. Infestation and plant sampling.....	79
2.4. RNA extraction and sequencing .....	80
2.5. RNAseq analysis.....	80
2.6. Metabolites extraction .....	81

2.7. Untargeted GC-EI-TOFMS profiling .....	82
2.8. Untargeted UPLC-ESI-QTOF-MS/MS profiling .....	83
2.9. Targeted UPLC-DAD-ESI-TQMS profiling .....	83
2.10. Data analysis.....	85
<b>3. Results .....</b>	<b>87</b>
3.1. Response to infestation: aphid behavior and plant symptoms.....	87
3.2. Major transcriptomic and metabolomic patterns associated to genotypic differences and infestation .....	87
3.3. Constitutive differences between the susceptible and resistant genotypes.....	89
3.4. Responses to infestation in the susceptible genotype.....	91
3.5. Responses to infestation in the resistant genotype.....	95
<b>4. Discussion .....</b>	<b>107</b>
4.1. GF305 and Rubira showed highly contrasting transcriptomic and metabolomic responses to infestation .....	107
4.2. GF305 weak response to infestation may reflect manipulation by <i>M. persicae</i> , repressing defense and promoting growth .....	108
4.3. The <i>Rm2</i> gene triggered ETI, PTI and SAR upon infestation.....	111
4.4. Infested Rubira displayed multiple hormonal changes involving SA, pipicolate, JA, IAA and ABA .....	114
4.5. Aphid-induced mobilization of Glyoxylate and P5C/Proline metabolisms may have promoted ROS burst in Rubira.....	117
4.6. Response to <i>M. persicae</i> activated protein recycling through autophagy in Rubira .....	121
4.7. Metabolic depletion of key metabolites might have reduced the nutritional value of Rubira for <i>M. persicae</i> .....	121
4.8. Secondary metabolites accumulation may have contributed to antixenosis in Rubira .....	122

## **Chapitre 4 : Conséquences d'un apport exogène de pipécolate sur l'infestation et le métabolisme du pêcher .....125**

---

<b>1. Introduction .....</b>	<b>127</b>
1.1. Les pipécolate et <i>N</i> -hydroxypipécolate, composants mobiles de la SAR.....	127
1.2. Implication du pipécolate dans la résistance des plantes aux pucerons .....	129
<b>2. Hypothèse et objectifs.....</b>	<b>130</b>
<b>3. Matériels et méthodes .....</b>	<b>131</b>
3.1. Matériel végétal .....	131
3.2. Matériel animal .....	132
3.3. Mise au point et validation du protocole expérimental.....	132
3.4. Dispositif expérimental retenu.....	134

3.5. Analyse statistique .....	136
<b>4. Résultats .....</b>	<b>138</b>
4.1. Effets de l'infestation sur les profils métaboliques de GF305 et Rubira .....	138
4.2. Modification du profil métabolique de GF305 en réponse à l'apport exogène de pipécolate .....	140
4.3. Modification du profil métabolique de GF305 en réponse à la combinaison de l'apport exogène de pipécolate et de l'infestation par <i>M. persicae</i> .....	144
<b>5. Discussion .....</b>	<b>148</b>
5.1. L'apport exogène de pipécolate ne permet pas d'induire une résistance vis-à-vis de <i>Myzus persicae</i> .....	148
5.2. L'efficacité du pipécolate serait dépendante du pathosystème étudié.....	150
5.3. L'apport exogène du pipécolate provoque des changements importants dans le métabolome susceptibles de modifier la valeur nutritionnelle du génotype sensible vis-à-vis du puceron.....	153
5.4. Limites du protocole d'expérimentation.....	155

## **Chapitre 5 : Tentative de localisation tissulaire et cellulaire de l'acide 3,5-dicaféoylquinique dans les tissus aériens du pêcher .....**

---

<b>1. Introduction .....</b>	<b>158</b>
1.1. Les composés phénoliques comme phytoalexines .....	158
1.2. L'acide 3,5-dicaféoylquinique comme potentiel facteur de résistance à <i>Myzus persicae</i> ...	160
<b>2. Hypothèse &amp; objectifs .....</b>	<b>163</b>
<b>3. Matériels et méthodes .....</b>	<b>164</b>
3.1. Quantification du 3,5-diCQ et isomères par LC-MS .....	164
3.2. Evaluation de la spécificité des anticorps.....	165
<b>4. Résultats .....</b>	<b>170</b>
4.1. Différences de teneurs en 3,5-diCQ et isomères à l'échelle des organes.....	170
4.2. Spécificité des anticorps produits pour les acides caféoylquiniques .....	172
<b>5. Discussion .....</b>	<b>174</b>
5.1. Accumulation préférentielle du 3,5-diCQ et de ses régio-isomères dans le système vasculaire des jeunes feuilles apicales de Rubira.....	174
5.2. Un transport actif du 3,5-diCQ vers le site de piqûre ?.....	177

## **Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives .....180**

---

1.Intégration des mécanismes de la résistance à *Myzus persicae* conférée par *Rm2* dans le modèle général de l'immunité des plantes .....183

2.La résistance à *Myzus persicae* semble impliquer l'accumulation de ROS issus de différents compartiments cellulaires .....186

3.La résistance de Rubira à *Myzus persicae* a-t-elle un coût en matière de croissance ? .....190

Références .....193

Annexes.....225

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Modèle en zig zag illustrant le système immunitaire des plantes.....	<b>6</b>
<b>Figure 2</b> : Principales phases de l'alimentation des pucerons identifiées par électropénétrographie (EPG).....	<b>8</b>
<b>Figure 3</b> : Implication de BAK1 dans l'antagonisme défense-croissance.....	<b>15</b>
<b>Figure 4</b> : Modèle hypothétique démontrant la possibilité de génération de DAMPS pendant l'infestation par les pucerons... ..	<b>17</b>
<b>Figure 5</b> : Complexes protéiques des NBS-LRR.....	<b>19</b>
<b>Figure 6</b> : Formation du résistosome lors de la perception d'un agent pathogène par le récepteur NLR.....	<b>21</b>
<b>Figure 7</b> : Activation des réponses de défense par les phytohormones selon les stratégies nutritives des bioagresseurs.....	<b>24</b>
<b>Figure 8</b> : Modèle de dialogue moléculaire entre la signalisation JA et SA.....	<b>27</b>
<b>Figure 9</b> : Modèle de fonctionnement des mécanismes possibles dans les voies de signalisation des messagers secondaires.....	<b>29</b>
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de la cascade de phosphorylation des "Mitogen Associated Protein Kinase" (MAPK).....	<b>32</b>
<b>Figure 11</b> : Défenses indirectes mises en place <i>via</i> la libération de composés volatils (VOCs).....	<b>35</b>
<b>Figure 12</b> : Classes de composés volatils émis par les plantes en réponse à l'herbivorie.....	<b>35</b>
<b>Figure 13</b> : Mécanisme d'occlusion du phloème en présence d'un insecte piqueur suceur.....	<b>39</b>
<b>Figure 14</b> : Production des composés toxiques issus des glucosinolates en réponse à l'herbivorie....	<b>41</b>
<b>Figure 15</b> : Représentation simplifiée des principales sous classes de composés phénoliques.....	<b>46</b>
<b>Figure 16</b> : Classification phylogénétique des espèces appartenant au genre <i>Prunus</i> .....	<b>57</b>
<b>Figure 17</b> : Dégâts provoqués par les agents pathogènes et ravageurs de <i>P. persica</i> .....	<b>59</b>
<b>Figure 18</b> : Femelle adulte aptère parthénogénétique de <i>M. persicae</i> .....	<b>61</b>
<b>Figure 19</b> : Localisation du gène <i>Rm2</i> sur le chromosome 1 de <i>P. persica</i> .....	<b>65</b>
<b>Figure 20</b> : Spots nécrotiques apparus sur le porte greffe Rubira après infestation par <i>M. persicae</i> .....	<b>65</b>
<b>Figure 21</b> : Génotype sensible GF305 et génotype résistant Rubira utilisés pour les expérimentations.....	<b>70</b>
<b>Figure 22</b> : Protocole d'élevage de <i>M. persicae</i> sur pêcher.....	<b>72</b>
<b>Figure 23</b> : Aphid behavior and plant symptoms after infestation with <i>M. persicae</i> .....	<b>86</b>
<b>Figure 24</b> : PCA score plots on raw transcription count data and metabolite semi-quantitative levels.....	<b>88</b>
<b>Figure 25</b> : Venn diagram representing the distribution of DEGs between the modalities.....	<b>88</b>
<b>Figure 26</b> : Gene ontology (GO) enrichment analysis for the comparison of constitutive gene expression in the uninfested resistant Rubira compared to the susceptible GF305.....	<b>90</b>
<b>Figure 27</b> : Hierarchical clustering analysis of a subset of metabolites displaying a significant difference.....	<b>92</b>
<b>Figure 28</b> : Gene ontology (GO) enrichment analysis for the comparison of gene expression variations induced by <i>M. persicae</i> infestation of Rubira.....	<b>94</b>
<b>Figure 29</b> : Gene ontology (GO) enrichment analysis for the comparison of gene expression variations induced by <i>M. persicae</i> infestation of Rubira.....	<b>96</b>
<b>Figure 30</b> : Transcriptional regulation of ETI, PTI, HR and SAR in Rubira 48 hours after infestation with <i>M. persicae</i> .....	<b>110</b>
<b>Figure 31</b> : Transcriptional regulation of glyoxylate metabolic pathways in Rubira 48 hours after infestation with <i>M. persicae</i> .....	<b>116</b>

<b>Figure 32</b> : Transcriptional regulation of arginine, proline and lysine metabolic pathways in Rubira 48 hours after infestation with <i>M. persica</i> .....	<b>118</b>
<b>Figure 33</b> : Etapes du catabolisme de la lysine conduisant à la synthèse de pipécolate.....	<b>126</b>
<b>Figure 34</b> : Schéma de l'expérimentation menée pour tester l'effet d'un apport du pipécolate sur le métabolome de GF305 et sur le comportement et la démographie du puceron en comparaison avec la réponse de résistance observée chez Rubira (non traité).....	<b>133</b>
<b>Figure 35</b> : Ratio d'accumulation des métabolites primaires selon les modalités comparées 48h et 7 jours post infestation.....	<b>135</b>
<b>Figure 36</b> : Pools des acides aminés dans les différents génotypes en fonction des traitements.....	<b>137</b>
<b>Figure 37</b> : Plants de GF305 âgés de 6 semaines cultivés sur perlite et sur terreau.....	<b>139</b>
<b>Figure 38</b> : Teneur en pipécolate dans les apex de GF305 et Rubira 48 h et 7 j après l'infestation.	<b>139</b>
<b>Figure 39</b> : Teneur en acides aminés protéinogènes, non protéinogènes et en pipécolate 48 h et 7 jours post infestation.....	<b>141</b>
<b>Figure 40</b> : Analyse en composantes principales des ions discriminants identifiés <i>via</i> LC-MS/QTOF dans les apex de GF305 traités avec H <sub>2</sub> O ou pipécolate puis exposés ou non à <i>M. persicae</i> .....	<b>143</b>
<b>Figure 41</b> : Métabolites discriminants identifiés après 7 jours d'infestation.....	<b>143</b>
<b>Figure 42</b> : Comportement et fécondité de <i>M. persicae</i> après traitement au pipécolate.....	<b>145</b>
<b>Figure 43</b> : Variation de la teneur en dihydrokaempférol-glucoside par l'infestation sur GF305 traité au pipécolate.....	<b>145</b>
<b>Figure 44</b> : Structure du 5-CQ, du 3,5-diCQ, et de leurs isomères respectifs.....	<b>161</b>
<b>Figure 45</b> : Observation en microscopie optique à épifluorescence de l'autofluorescence autour des sites de piqûres des feuilles de Rubira infestées par <i>M. persicae</i> .....	<b>161</b>
<b>Figure 46</b> : Immunomarquage du diCQ de racines de patates douces avec l'anticorps 3,5-diCQ.....	<b>167</b>
<b>Figure 47</b> : Pièges à pinces.....	<b>167</b>
<b>Figure 48</b> : Répartition du pool de 3,5-diCQ, de 5-CQ et leurs isomères respectifs dans les différents organes apicaux en fonction du génotype et de l'infestation par <i>M. persicae</i> .....	<b>169</b>
<b>Figure 49</b> : Evaluation des propriétés répulsives du 3,5-diCQ et du 5-CQ vis-a-vis de <i>M. persicae</i> ....	<b>171</b>
<b>Figure 50</b> : Evaluation de la toxicité du 3,5-diCQ et 5-CQ pour <i>Myzus persicae</i> .....	<b>171</b>
<b>Figure 51</b> : Immunomarquage des feuilles de basilic préalablement infiltrées par une solution de 3,5-diCQ ou de 5-CQ.....	<b>173</b>
<b>Figure 52</b> : Immunomarquage de feuilles de basilic avec les anticorps 3,5-diCQ et 5-CQ.....	<b>173</b>
<b>Figure 53</b> : Immunomarquage des feuilles de pêcher du génotype sensible avec ou sans infestation.....	<b>175</b>
<b>Figure 54</b> : Immunomarquage des feuilles de pêcher du génotype résistant avec ou sans infestation.....	<b>175</b>
<b>Figure 55</b> : Sources de production de ROS dans les différents compartiments cellulaires chez Rubira infesté .....	<b>187</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Classification, propriétés et caractéristiques des « Pathogenesis Related proteins ».....	<b>37</b>
<b>Tableau 2</b> : Méthodes d'apport et effets de traitements exogènes de pipécolate ou de NHP mentionnés dans la littérature sur différents pathosystèmes.....	<b>147</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>5-CQ</b> : Acide chlorogénique	<b>CC (GO)</b> : Cellular compartment Gene ontology	<b>FAD</b> : Flavin adenine dinucleotide
<b>4-CQ</b> : Acide cryptochlorogénique	<b>cDNA</b> : Complementary Desoxyribonucleic acid	<b>FDR</b> : False discovery rate
<b>3-CQ</b> : Acide néochlorogénique	<b>CDPK</b> : Calcium-dependent protein kinase	<b>Flg22</b> : Flagelline bactérienne 22
<b>5-<i>p</i>-CoQA</b> : Acide 5- <i>p</i> - coumaroylquinique	<b>CE-MS</b> : Electrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse	<b>GABA</b> : $\gamma$ -aminobutyric acid
<b>4-<i>p</i>-CoQA</b> : Acide 4- <i>p</i> - coumaroylquinique	<b>CIPK</b> : CBL-interacting serine/threonine protein kinase	<b>GC</b> : GF305 contrôle
<b>AA</b> : Acides aminés	<b>CNL</b> : Coiled-Coil-Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeats	<b>GC-MS</b> : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>AABA</b> : $\alpha$ -aminobutyric acid	<b>CML</b> : Calmoduline like protein	<b>GDR</b> : Genome Database for Rosaceae
<b>AASADH</b> : $\alpha$ -aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	<b>CMV</b> : Cucumber Mosaic Virus	<b>GI</b> : GF305 infesté
<b>ABA</b> : Acide abscissique	<b>C/N</b> : Ratio Carbone sur Azote	<b>Gln</b> : Glutamine
<b>ADP</b> : Adénosine diphosphate	<b>CO<sub>2</sub></b> : Dioxyde de carbone	<b>Glu</b> : Glutamate
<b>Ap</b> : <i>Acyrtosiphon pisum</i>	<b>COVs</b> : Composés organiques volatiles	<b>Gly</b> : Glycine
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>CPK</b> : Calcium-dependant protein kinase	<b>G3P</b> : Glycérol-3-phosphate
<b>Asn</b> : Asparagine	<b>CWME</b> : Cell Wall-modifying enzymes	<b>GS</b> : Glutamine synthase
<b>Asp</b> : Aspartate	<b>DAD</b> : Diode array detector	<b>GSA</b> : Glutamic- $\gamma$ -semialdehyde
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>DAMPS</b> : Damage-Associated Molecular Patterns	<b>GSH</b> : Glutathion réduit
<b>Avr</b> : Avirulence	<b>DEG</b> : Differential expressed gene	<b>GSNO</b> : S-nitrosoglutathione
<b>BAC</b> : Bacterial Artificial Chromosome	<b>DHBA</b> : Acide dihydroxybenzoïque	<b>GST</b> : Glutathion S-transférase
<b>BAIBA</b> : $\beta$ -aminoisobutyric acid	<b>DIMBOA</b> : 2,4-dihydroxy-7- méthoxy-2H-1,4-benzoxazin- 3(4H)-one	<b>GO</b> : Gene ontology
<b>BCAAs</b> : Branched-chain amino acids	<b>DP</b> : Déhydropipécoliques	<b>HAMPS</b> : Herbivore-Associated Molecular Patterns
<b>BCMV</b> : Bean Common Mosaic Virus	<b>Dpi</b> : Days post infestation	<b>HCAAs</b> : Hydroxycinnamic acids
<b>BCMNV</b> : Bean Common Mosaic Necrosis Virus	<b>EPG</b> : Electropénétrographie	<b>HCAA</b> : Hydroxycinnamic acid amides
<b>BP</b> : Biological process	<b>ESI</b> : Electrospray Ionization	<b>HG</b> : Homogalacturonanes
<b>BR</b> : Brassinostéroïdes	<b>ET</b> : Ethylène	<b>HIPVs</b> : Volatils végétaux induits par les herbivores
<b>BSA</b> : Bovine Serum Albumin	<b>ETI</b> : Effector Triggered Immunity	<b>HIR</b> : Hypersensitive-induced reaction
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : Calcium	<b>ETS</b> : Effector-Triggered Susceptibility	<b>HO<sub>2</sub></b> : Radical hydroperoxyde
<b>CaM</b> : Calmoduline		<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : Peroxyde d'hydrogène
<b>CBL</b> : Calcineurin B-like protein		<b>Hpi</b> : Hours post infestation
<b>CC</b> : Coiled-Coil		

<b>HPLC</b> : High Performance Liquid Chromatography	<b>N</b> : Azote	<b>QTOF</b> : Quadrupole time-of-flight
<b>HR</b> : Hypersensitive response	<b>NADP</b> : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	<b>RBOH</b> : Respiratory burst oxidase homolog
<b>IAA</b> : Indole-3-acetic acid	<b>NBS</b> : Nucleotide Binding Site	<b>RC</b> : Rubira contrôle
<b>Ile</b> : Isoleucine	<b>NHP</b> : <i>N</i> -hydroxypipécolate	<b>RI</b> : Rubira infesté
<b>JA</b> : Acide jasmonique	<b>NLR</b> : nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing	<b>RIPK</b> : RPM1-induced protein kinase
<b>JA-Ile</b> : Jasmonate-Isoleucine	<b>NO</b> : Oxyde nitrique	<b>RLK</b> : Receptor-like kinases
<b>K</b> : Potassium	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> : Oxygène singulet	<b>RLP</b> : Receptor-like proteins
<b>KEGG</b> : Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes	<b>NTPase</b> : Nucleoside-triphosphatase	<b>Rm</b> : Resistance to Myzus
<b>LC-MS</b> : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> : Anion superoxyde	<b>RMN</b> : Résonance magnétique nucléaire
<b>Leu</b> : Leucine	<b>OGs</b> : Oligogalacturonides	<b>RNAseq</b> : RNA-sequencing
<b>LRR</b> : Leucine-rich repeats	<b>OH·</b> : Radical hydroxyle	<b>ROS</b> : Reactive oxygen species
<b>LysM</b> : Lysine motifs	<b>OPDA</b> : Acide 12-Oxophytodienoïque	<b>RPW8</b> : Resistance to Powdery mildew8
<b>MACFP</b> : Membrane attack complex component/perforin	<b>P</b> : Phosphate	<b>RT</b> : Retention time
<b>MALDI-MS</b> : Ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse	<b>PAMPS</b> : Pathogen-Associated Molecular Patterns	<b>SA</b> : Acide salicylique
<b>MAMPS</b> : Microbe-Associated Molecular Patterns	<b>PBS</b> : Tampon phosphate salin	<b>SAR</b> : Systemic acquired resistance
<b>MAPK</b> : Mitogen-Activated Protein Kinases	<b>PCA</b> : Principal component analysis	<b>SAG</b> : Salicylic acid glucoside
<b>Mb</b> : Mégabase	<b>P2C</b> : $\delta$ 1-pipéridine-2-carboxylic acid	<b>SGE</b> : Salicylic acid glucose ester
<b>MCM</b> : Mini-chromosome maintenance	<b>P5C</b> : $\Delta$ 1-Pyrroline-5-Carboxylic acid	<b>TAIR</b> : Arabidopsis Information Resource
<b>Mg</b> : Magnésium	<b>PCD</b> : Programmed Cell death	<b>TIR</b> : Toll-Interleukin-Receptor
<b>MeJA</b> : Methyl-jasmonate	<b>PG</b> : Polygalacturonases	<b>TNL</b> : TIR-NBS-LRR
<b>MeSA</b> : Methyl-salicylate	<b>Phe</b> : Phénylalanine	<b>TQ</b> : Triple quadrupole
<b>MF</b> : Molecular Function	<b>PID</b> : Proliferation, Ion and Death	<b>Trp</b> : Tryptophane
<b>MKK</b> : Mitogen-Activated Protein Kinase kinase	<b>Pip</b> : Pipécolate	<b>Tyr</b> : Tyrosine
<b>MKKK</b> : Mitogen-Activated Protein Kinase kinase kinase	<b>PL</b> : Pectate lyase	<b>UniProt</b> : Universal Protein Resource
<b>Mp</b> : <i>Myzus persicae</i>	<b>PME</b> : Pectine méthylesterase	<b>UPLC</b> : Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>MRM</b> : Multiple reactions monitoring	<b>PR protein</b> : Pathogenesis related protein	<b>Val</b> : Valine
<b>MT</b> : Milliard de tonnes	<b>PRR</b> : Pattern Recognition Receptor	<b>VIGS</b> : Virus Induced Gene Silencing
	<b>PTI</b> : Pattern-Triggered-Immunity	<b>WFP</b> : Weeping Flower Peach
	<b>QTL</b> : Quantitative Trait Loci	<b>XIC</b> : extracted ion chromatogram

# Chapitre 1

---

Introduction générale

Les plantes font face à un large éventail de menaces engendrées par divers ravageurs et agents pathogènes. Chez les espèces cultivées, on estime que ces facteurs biotiques sont responsables de 10 à 40% de perte de rendement chaque année malgré l'utilisation de traitements pesticides (Oerke, 2006). Parmi eux, les pucerons, grâce à leurs capacités de multiplication et de dispersion rapides, sont l'un des principaux groupes d'insectes ravageurs des cultures. Ces insectes piqueurs-suceurs phloémophages appartiennent à l'ordre des hémiptères et regroupent environ 4700 espèces dont 350 sont considérées comme ravageurs (Hullé *et al.*, 2020). La majorité de ces espèces ne s'installe que sur un nombre restreint d'espèces végétales mais certaines d'entre elles, dites généralistes, comme le puceron vert du pêcher *Myzus persicae*, peuvent coloniser jusqu'à 40 familles botaniques différentes (Capinera, 2018). De surcroît, les pucerons sont vecteurs, au stade de larves ou d'adultes, d'un nombre important de virus pathogènes des plantes qui causent à leur tour des dégâts considérables et des pertes économiques énormes. Cette contamination entraîne dans de nombreux cas la nécessité de détruire par mesure prophylactique les plants contaminés, voire des plants environnants afin de limiter la propagation du virus (Emden et Harrington, 2017 - Chap. 14). Bien que le recours à l'utilisation de pesticides reste à ce jour la méthode de lutte la plus efficace, le développement fréquent de résistances multiples des pucerons à ces traitements ainsi que l'abandon progressif de l'usage des molécules chimiques du fait de leur toxicité pour les pollinisateurs et les humains dirigent les nouvelles recherches vers des méthodes alternatives respectueuses de l'environnement (Dedryver *et al.*, 2010). Les recours au biocontrôle ou à l'exploitation de sources naturelles de résistantes aux pucerons telles que les gènes majeurs de résistance (R gènes) sont donc des pistes très largement étudiées à ce jour (Emden et Harrington, 2017 - Chap. 20).

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ayant un caractère fortement exploratoire et visant à caractériser les réponses immunitaires du pêcher *Prunus persica* au puceron vert *M. persicae*, la synthèse bibliographique qui suit présente tout d'abord les bases conceptuelles de l'immunité végétale et ses mécanismes, de la perception du danger à la mise en place des réponses de défense. Une attention particulière est portée aux mécanismes liés à la réponse des plantes aux pucerons et aux outils développés pour étudier cette interaction. Le ravageur et son hôte sont ensuite présentés, ainsi que leurs interactions spécifiques avant de détailler les objectifs de la thèse.

## 1. L'immunité des plantes

### 1.1. Co-évolution plante/bioagresseur

La diversification soudaine et rapide des plantes à fleurs a été décrite comme un « mystère abominable » par Charles Darwin dans son travail sur l'origine des espèces (Darwin, 1859). Il avait alors estimé que l'interaction évolutive entre les espèces pouvait en être la cause. Plus tard, le terme de coévolution est introduit dans les travaux de Ehrlich et Raven, (1964) pour décrire l'influence réciproque qui existe entre les plantes et certains insectes. En examinant les relations évolutives de certains papillons phytophages et de leur plantes hôtes, ils ont déterminé que les pressions de sélection exercées par des papillons phytophages sur les plantes ont entraîné le développement de certains mécanismes de défense provoquant en retour, chez les insectes, l'émergence de caractères leur permettant de contrer ces mécanismes. Les composés secondaires produits par la plante, généralement impliqués dans l'adaptation de la plante à son environnement biotique et abiotique, seraient les facteurs dominants dans cette coévolution puisqu'ils jouent notamment un rôle essentiel dans le choix alimentaire des insectes (Ehrlich et Raven, 1964). Par le biais de recombinaisons ou mutations ponctuelles, les plantes vont synthétiser de nouveaux composés chimiques non essentiels à leur croissance et développement mais qui vont avoir un effet délétère sur les agresseurs ou réduire l'appétence de la plante. Les plantes ainsi protégées entrent dans une nouvelle zone adaptative et, à travers la radiation évolutive, ces changements provoquent l'apparition d'une nouvelle famille botanique (Hembry *et al.*, 2015). C'est de cette manière que des composés chimiques de fonction physiologique non déterminée, comme les alcaloïdes, les composés phénoliques, les terpénoïdes, les composés cyanogéniques et les glucosinolates, auraient fait leur apparition et auraient été conservés au cours de l'évolution pour leur intérêt dans la résistance des plantes. Chez le panais *Pastinaca sativa* par exemple, la production de furanocoumarines défensives est sensible à la sélection par les herbivores et un degré de correspondance très élevé a été relevé entre les fréquences des phénotypes de ces plantes et la fréquence des phénotypes de la pyrale du panais *Depressaria pastinacella* qui varient dans la capacité à métaboliser les furanocoumarines (Berenbaum et Zangerl, 1998). Ainsi, l'interaction entre ces deux organismes est caractérisée par une variation héréditaire continue de ces traits de résistance et de virulence.

La sélection d'une multitude de caractères a finalement abouti à la diversité et à la richesse de l'arsenal de défenses connues à ce jour dans le règne végétal. Néanmoins, la synthèse constitutive de composés de défense communément appelés « phytoanticipines » a un coût métabolique important (Boots et Best, 2018). C'est la raison pour laquelle certaines plantes ont développé des mécanismes permettant l'accumulation accrue de composés initialement présents en faibles quantités ou la synthèse de nouveaux composés de défense chez la plante après la reconnaissance de l'agresseur : c'est la notion de « phytoanticipines ». La mise en place de ces mécanismes est dépendante des capacités des plantes à percevoir les bioagresseurs, sur lesquels a également porté la sélection naturelle.

## 1.2. Concept de relation gène pour gène

Le concept de relation gène pour gène a été mis en évidence par Flor (1971) sur le modèle *Linum usitatissimum* - *Melampsora lini*, la rouille du lin et constitue une avancée importante dans la compréhension de la résistance qualitative des plantes aux maladies. Il exprime le lien étroit qui existe entre des paires de gènes correspondants ; l'un étant le gène d'avirulence de l'agent pathogène (*Avr*) et l'autre le gène de résistance correspondant de la plante hôte (*R*). Ainsi, dans le cas d'une interaction incompatible, une plante hôte exprimant un produit spécifique du gène *R* va reconnaître spécifiquement l'agent pathogène qui exprime le produit du gène *Avr* correspondant ce qui déclenche une forte réponse immunitaire. A l'inverse, lors d'une interaction compatible, les gènes *R* ou *Avr* sont absents ce qui empêche la plante de reconnaître l'agent pathogène et de mettre en place une résistance forte.

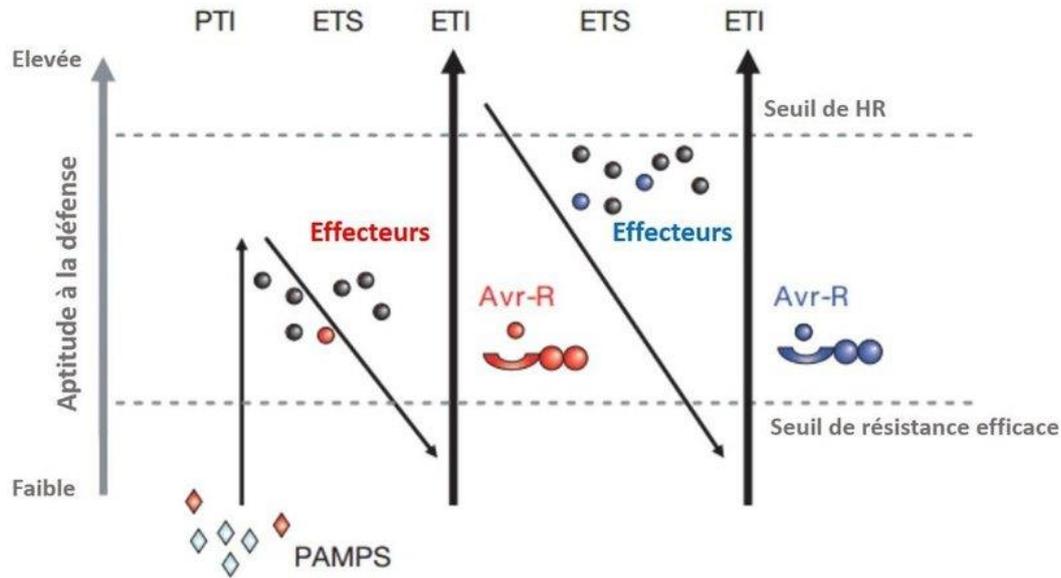
Chez l'hôte, la résistance est majoritairement dominante et les gènes de résistance (*R*) se présentent sous forme d'allèles multiples. Mais, les agents pathogènes ont la capacité de répondre rapidement à la pression sélective exercée par les plantes grâce notamment à la récessivité du caractère de virulence. Ainsi, l'allèle récessif codant la virulence a moins de chance d'être exprimé et donc l'agent pathogène d'être détecté. Ces caractéristiques permettent de maintenir l'équilibre des populations entre l'hôte et le parasite.

Par comparaison au modèle de co-évolution établie par Ehrlich et Raven (1964), qui associe la synthèse constitutive de métabolites secondaires chez l'hôte et le développement de système de détoxification/séquestration chez les herbivores, le concept décrit par Flor implique quant à lui des systèmes de reconnaissance des gènes d'avirulences des agents pathogènes chez l'hôte pour déclencher une résistance induite et l'échappement à la reconnaissance chez les agents pathogènes, notamment par des évènements de mutations.

Le concept de relation « gène pour gène », basé sur des études génétiques menées en parallèle chez l'hôte et le parasite est donc applicable à la plupart des interactions hôtes-bioagresseurs biotrophes (virus, bactéries, champignons, insectes phloémophages) quand la résistance est contrôlée par un gène majeur de résistance. Ces travaux ont donc permis de comprendre les mécanismes de résistance observés chez certaines espèces végétales et d'identifier l'impact de mutation, d'hybridation ou de délétion sur la variation du pouvoir pathogène des parasites. L'exemple du gène d'avirulence *NIP1* du champignon *Rhynchosporium secalis*, qui provoque la mise en place de la résistance chez les lignées d'orge possédant le gène *Rrs1* illustre clairement les mécanismes employés par les agents pathogènes pour échapper à la reconnaissance de la plante. Ainsi, Schürch *et al.*, (2004) ont montré que la virulence à *Rrs1* n'est obtenue que chez des populations de *R. secalis* ayant subi une délétion ou des mutations ponctuelles de *NIP1*.

### 1.3. Modèle général de l'immunité des plantes face aux bioagresseurs

La course à l'armement, induite par la co-évolution entre le parasite et sa plante hôte a ensuite été conceptualisée par le modèle en zig zag de Jones et Dangl, (2006) intégrant les résistances partielles (PTI) quantitatives polygéniques et les résistances fortes (ETI) qualitatives monogéniques, l'ensemble constituant une part essentielle de l'immunité des plantes. Ce concept s'est largement basé sur l'acquisition progressive de connaissances sur les récepteurs PRR et NLR obtenues notamment par des outils de séquençage de génomes, de génomique fonctionnelle et *via* l'utilisation de mutants *Arabidopsis* (Ngou *et al.*, 2022a).

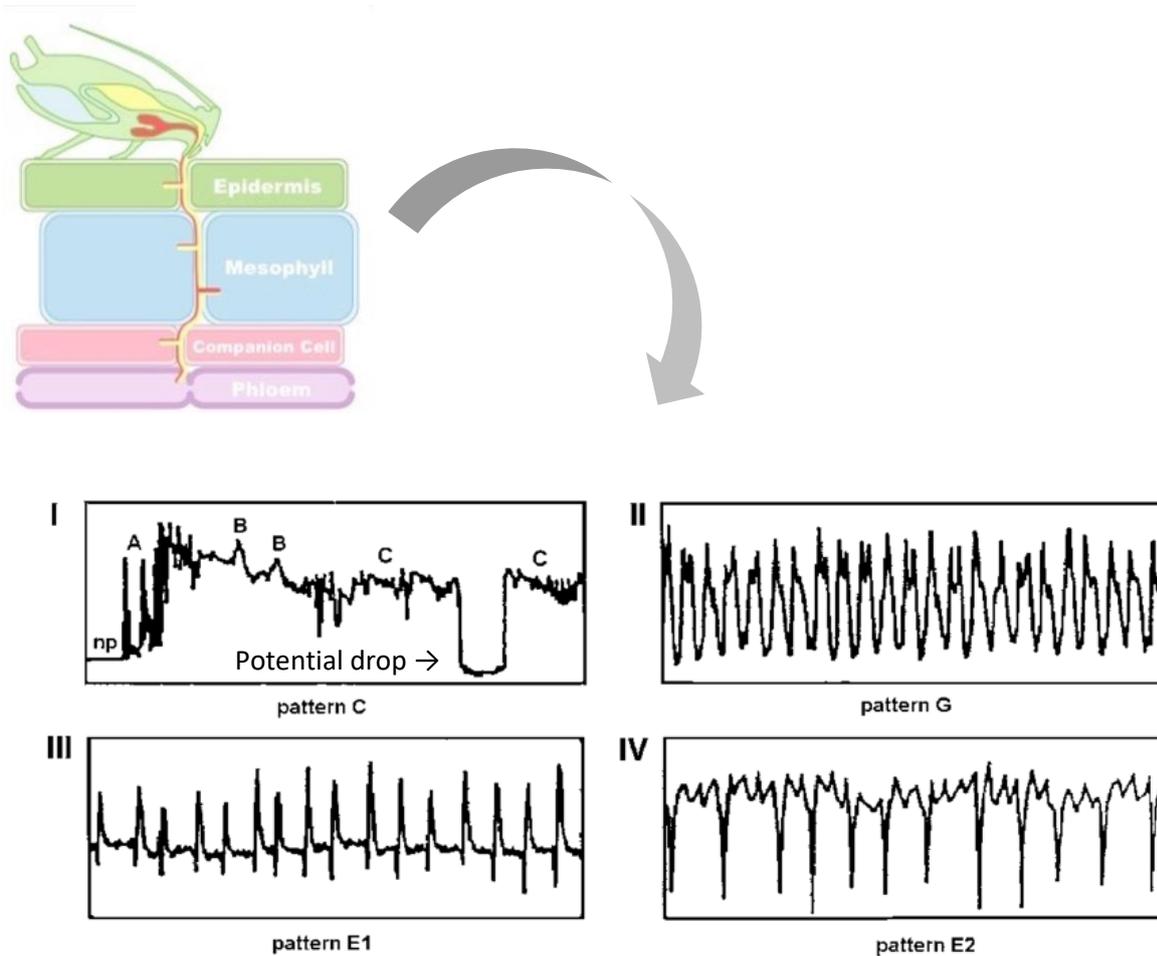


**Figure 1 : Modèle en zig zag illustrant le système immunitaire des plantes (Jones and Dangl, 2006).** Le premier niveau de résistance basale PTI (Pattern Triggered Immunity) est activé lorsque la plante perçoit des PAMPs (Pathogenesis Associated Molecular Patterns) par des récepteurs PRR. Pour contourner ces défenses, le pathogène libère des effecteurs pour réprimer la PTI ; c'est la phase ETS (Effector Triggered Susceptibility). Au cours de l'évolution, les plantes ont sélectionné des récepteurs codés par un gène de résistance (R) capable de reconnaître spécifiquement des effecteurs de l'agent pathogène. Cette reconnaissance déclenche des mécanismes de défense plus intenses aboutissant à une résistance forte de la plante ; c'est la phase ETI (Effector Triggered Immunity). Enfin, les agents pathogènes peuvent contourner la reconnaissance via les récepteurs R par la modification de leurs effecteurs qui ne seront plus reconnus, une nouvelle phase ETS est alors déclenchée.

Ce modèle peut être décomposé en 3 étapes majeures (Figure 1). La « Pattern-Triggered-Immunity » (PTI) est déclenchée *via* la reconnaissance par des récepteurs transmembranaires de la plante ou « Pattern Recognition Receptor » (PRR) (Zipfel, 2009; Macho et Zipfel, 2014) de motifs moléculaires propres au bioagresseur, appelés PAMPs « Pathogen-Associated Molecular Patterns », MAMPs « Microbe-Associated Molecular Patterns », HAMPS « Herbivore-Associated Molecular Patterns » ou encore de molécules dérivées de l'hôte libérées par des cellules ou parois endommagées DAMPS « Damage-Associated Molecular Patterns » (Choi et Klessig, 2016). Cette reconnaissance déclenche la mise en place de défenses générales comme la fermeture des stomates (Melotto *et al.*, 2008), le renforcement des parois *via* le dépôt de lignine, l'obturation des plasmodesmes et tubes criblés par l'accumulation de callose ou l'induction d'une bouffée oxydative par la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Torres *et al.*, 2006). La PTI permet surtout d'éviter ou de ralentir la propagation du bioagresseur et non de l'éliminer (Boller et Felix, 2009). La pression de sélection exercée par ces défenses entraîne dans les populations de bioagresseurs la sélection d'individus porteurs d'effecteurs neutralisant les mécanismes de résistance mis en place par la plante ce qui permet de rétablir la virulence, c'est l'état de « Effector-Triggered Susceptibility » (ETS).

Mais cette nouvelle pression de sélection subie par les plantes aboutit à la sélection d'individus porteurs de récepteurs généralement codés par des NLRs ou « Nucleotide Binding – Leucine Rich Repeat » (NBS-LRR) et capables de reconnaître spécifiquement les effecteurs du parasite. Ce type de mécanisme fait référence à la relation « gène pour gène » décrite par Flor (1971). Ces récepteurs intracellulaires déclenchent une cascade de signalisation aboutissant à l'« Effector Triggered Immunity » (ETI). Elle est décrite comme une réponse de PTI amplifiée plus spécifique de l'agresseur ciblé qui s'accompagne généralement d'une réponse hypersensible (HR) associée à une mort cellulaire programmée au niveau des sites d'infection (Tsuda et Katagiri, 2010).

Cependant, bien que la PTI et l'ETI soient initiées par des mécanismes d'activation distincts et impliquent des cascades de signalisation différentes, des études récentes ont démontré que la coopération de ces deux mécanismes est nécessaire à l'établissement d'une résistance efficace (Ngou *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021).



**Figure 2 : Principales phases de l'alimentation des pucerons identifiées par Electropénétrographie (EPG) (Sprawka et Goławska, 2010).** Le schéma indique le trajet emprunté par le puceron pour atteindre le phloème. Les courbes indiquent l'activité du stylet mesurée au fil du temps. I. Phase d'exploration et phase extracellulaire avec ABC correspondant à la pénétration dans des tissus non phloémien ; II. Phase d'ingestion dans le xylème; III et IV. Phase de succion avec E1 salivation dans les éléments criblés et E2 ingestion de sève phloémienne.

Une version révisée du modèle est proposée par Ngou *et al.*, (2022a) dans laquelle (i) la production d'espèces réactives de l'oxygène serait un signal critique reliant l'immunité médiée par les récepteurs PRR et NLR et (ii) l'induction de la PTI par les récepteurs intracellulaires NLR serait un élément indispensable et inhérent à l'ETI. De manière intéressante, ces travaux se sont basés sur l'interaction *Arabidopsis thaliana/Pseudomonas syringae* et se réfèrent également à d'autres interactions plante/bactérie, plante/champignon et même plante/nématode. En revanche, les insectes phloémophages ne semblent pas intégrés au modèle à ce jour.

## 2. Application du modèle en Zig-Zag à la résistance des plantes aux pucerons

### 2.1. Particularités des insectes phloémophages

#### 2.1.1. Stratégie de nutrition des pucerons

Les pucerons se nourrissent principalement de la sève phloémienne et ingèrent occasionnellement de la sève du xylème afin de maintenir l'équilibre osmotique au sein de l'hémolymphe (Pompon *et al.*, 2010). Le comportement de nutrition peut être décomposé en 3 étapes principales, qui peuvent être mises en évidence par les signaux électriques spécifiques obtenus par électropénétrographie (EPG) (Figure 2) (Tjallingii et Hogen Esch, 1993; Sauge *et al.*, 1998a). La phase extracellulaire correspond au trajet du stylet jusqu'au phloème par les espaces intercellulaires. Durant cette étape, le puceron injecte une salive gélifiante qui forme une gaine autour du stylet pour faciliter le passage du stylet dans l'apoplasme et limiter le contact de la chitine du stylet, éliciteur potentiel des réponses immunitaires de la plante, avec les tissus végétaux. De cette façon, le puceron réduit au maximum les dégâts sur les tissus végétaux ce qui limite le déclenchement de réponses de défense, d'où sa désignation d'insecte furtif (Züst et Agrawal, 2016). La phase d'exploration, caractérisée par une chute du potentiel électrique, correspond à une ponction du contenu intracellulaire par les stylets. Cette étape est nécessaire au puceron pour évaluer la qualité nutritionnelle de l'hôte et est plus ou moins longue en fonction du niveau de résistance de la plante et de l'adaptation du puceron à son hôte (Will *et al.*, 2012; van Bel et Will, 2016).

Enfin, la phase de succion débute lorsque le stylet atteint le phloème et s'accompagne d'une libération régulière d'une seconde salive de consistance aqueuse (Tjallingii et Esch, 1993; Tjallingii, 2006) qui facilite l'absorption de la sève, minimise l'occlusion du phloème et peut même supprimer complètement les mécanismes de défense de la plante grâce à la délivrance de molécules effectrices qui peuvent interagir avec certaines protéines de l'hôte (Mondal, 2017).

### 2.1.2. Ressources nutritionnelles exploitées par les pucerons

Les pucerons se nourrissent essentiellement dans la sève phloémienne des acides aminés contenant la matière azotée et du saccharose pour les ressources carbonées (Dadd et Krieger, 1968). Les acides aminés aromatiques sont particulièrement importants puisqu'ils sont nécessaires à la synthèse de la cuticule des pucerons (Bernays et Woodhead, 1984). D'autres en revanche comme l'asparagine ou la serine ainsi que les sucres (glucose, fructose) sont ingérés en excès et directement excrétés sous forme de gouttelettes de miellat (Shaaban *et al.*, 2020). Le miellat de *Brevicoryne brassicae* contient par exemple 88 % de sucres, principalement du glucose et fructose et 7 % de composés azotés (glutamine, asparagine) (Lamb, 1959).

Néanmoins, les ressources contenues dans la sève phloémienne sont déséquilibrées d'un point de vue nutritionnel du fait de la très forte teneur en sucre et du rapport élevé entre les acides aminés non essentiels et essentiels (Douglas, 2006). C'est pourquoi, pour répondre à ce stress nutritionnel et satisfaire leur besoin en acides aminés essentiels, ces insectes ont développé des symbioses avec des micro-organismes. Ainsi, la bactérie endosymbiotique *Buchnera aphidicola*, symbiote obligatoire des pucerons, installée dans des cellules spécialisées nommées bactériocytes et transmises verticalement d'une génération de puceron à l'autre (Brinza *et al.*, 2009; Shigenobu et Wilson, 2011), est nécessaire aux pucerons pour compléter leur régime alimentaire et leur assurer une croissance optimale (Munson *et al.*, 1991). Douglas *et al.*, (2001) ont démontré que *Buchnera* produisait de la méthionine ce qui permettait à plusieurs générations de clones de *Myzus* de survivre avec un régime alimentaire dépourvu de méthionine. Des résultats similaires ont été mis en évidence pour le tryptophane chez *Acyrtosiphon pisum* (Douglas et Prosser, 1992).

Enfin, Febvay *et al.*, (1995) ont établi un modèle d'interconversion entre acides aminés auxquels participe *B. aphidicola*. Le glutamate serait le principal voire l'unique acide aminé fourni par le puceron à *B. aphidicola*. La bactérie l'utiliserait comme intermédiaire pour la synthèse d'aspartate et de nombreux acides aminés essentiels comme la lysine, la thréonine ainsi que l'isoleucine et la méthionine. De plus, Rahbé *et al.*, (2002) ont mis en évidence l'échange de précurseurs et produits terminaux des voies de biosynthèse des 2 acides aminés aromatiques tyrosine et phénylalanine entre *A. pisum* et *B. aphidicola*. L'endosymbionte est capable de fournir le phénylpyruvate au puceron, qui pourrait alors synthétiser de la phénylalanine (Phe) à partir de ce précurseur puis de la tyrosine (Tyr) et en fournir en retour à la bactérie qui est dépourvu d'enzymes de biosynthèse terminales de ces composés. Dans cette même idée, Colella *et al.* (2018) ont démontré qu'une privation en Phe et Tyr induit une reprogrammation transcriptionnelle des cellules bactériocytes contenant les endosymbiontes qui aboutit à une augmentation de leur taille et de leur prolifération. Ainsi, ces changements confirment l'implication des bactéries symbiotiques dans la réponse du puceron à un stress nutritionnel et suggèrent une régulation précise de la physiologie des bactériocytes par le puceron afin notamment d'accueillir un plus grand nombre d'endosymbiontes pour faire face à ce stress. Enfin, d'autres fonctions liées à la nutrition du puceron ont été associées à cette bactérie. Machado-Assefh *et al.*, (2015) ont révélé *via* EPG que des clones de *M. persicae* aposymbiotiques, c'est-à-dire dépourvus de *Buchnera*, atteignaient plus difficilement le phloème et avaient une phase d'ingestion plus courte que des individus en symbiose avec la bactérie. La suppression de *Buchnera* chez *Myzus* s'accompagne également d'une réduction de l'expression de certaines protéines salivaires (Mp61 et Mp63). Ces résultats suggèrent donc que *Buchnera* favorise aussi l'acceptance des plantes hôtes par les pucerons.

### 2.1.3. Effecteurs du puceron

La réussite d'une infection requiert l'instauration du pouvoir pathogène des bioagresseurs, qui s'exerce en partie par l'intermédiaire des effecteurs. Selon l'agent pathogène, ces effecteurs libérés au contact de l'hôte peuvent être (i) des enzymes hydrolytiques qui vont faciliter l'installation du parasite et son accès aux ressources de la plante, (ii) des toxines qui vont interférer avec le métabolisme de l'hôte pour l'affaiblir et (iii) des protéines qui vont cibler des éléments clés des mécanismes de défense de l'hôte et les désamorcer (Elzinga et Jander, 2013).

Dans le cas des pucerons, les effecteurs sont exprimés au niveau des glandes salivaires et délivrés dans la plante lors de la sécrétion salivaire. Ils peuvent induire de multiples réactions chez l'hôte ; une réallocation des nutriments vers le site de piqûre, des changements morphologiques (enroulements des feuilles, galles) ou la suppression des défenses (Giordanengo *et al.*, 2010; Compson *et al.*, 2011).

Parmi le large répertoire d'effecteurs potentiels, seul un nombre limité a été caractérisé dans les interactions plante/puceron et les cibles de ces effecteurs ne sont que partiellement élucidées. Certains effecteurs sont des enzymes de détoxification (oxidoréductases, peroxidases) ou des enzymes de dégradation de la paroi (pectinase, amylase). D'autres, comme les glucose oxydases (GOX) oxydent le glucose pour libérer de l' $H_2O_2$  et ainsi stimuler l'accumulation d'acide salicylique (SA) (Giordanengo *et al.*, 2010). Le SA pourrait agir en antagonisme avec certaines voies de signalisation hormonale nécessaire à la réponse de défense des plantes (Morkunas *et al.*, 2011).

En revanche, certains candidats n'ont pas de fonction connue et sont spécifiques des pucerons. L'effecteur *C002* est l'un des gènes les plus exprimés dans les glandes salivaires. D'abord découvert chez *A. pisum* (Mutti *et al.*, 2008), puis chez *M. persicae* (*MpC002*), *Aphis gossypii*, *Toxoptera citricida* et *Schizaphis graminum* (Rodriguez et Bos, 2013), *C002* facilite l'accessibilité du phloème au puceron. Une mutation de ce gène engendre une incapacité des pucerons à atteindre le phloème, aboutissant à la mort de ces derniers (Mutti *et al.*, 2008). A l'inverse, une surexpression de *C002* chez *Nicotiana benthamiana* ou *A. thaliana* promeut la virulence de *M. persicae* (Bos *et al.*, 2010a; Pitino et Hogenhout, 2012).

Les effecteurs *Mp1* et *Mp2* de *Myzus* contribuent également à la *fitness* de l'insecte en augmentant les performances du puceron. *Mp1* s'associe avec un facteur impliqué dans le trafic vésiculaire ; la protéine « Vacuolar Protein Sorting Associated Protein 52 » (*VPS52*). Cette liaison entraîne une relocalisation de *Mp1* vers des vésicules s'associant aux compartiments pré-vacuolaires, notamment au niveau des cellules compagnes et provoque une réduction des niveaux de *VPS52* favorisant ainsi l'infestation (Rodriguez *et al.*, 2017).

La libération d'un autre effecteur de *M. persicae*, Mp55, au sein de la cellule végétale permet la suppression de certaines réponses de défense incluant l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de glucosinolates comme le 4-méthoxyindol-3-ylméthylglucosinolate chez *Arabidopsis* (Elzinga *et al.*, 2014). Comme Mp55, les « Migration-Inhibition factors » (MIFs), cytokines participant à l'immunité des pucerons, sont capables de supprimer la réponse immunitaire des plantes. L'expression transitoire de *MIF1* (Ap et Mp) dans *N. benthamiana* inhibe l'expression de gènes codant pour les protéines liées à la pathogénèse (PR), de certains gènes liés à la réponse hypersensible et supprime le dépôt de callose. Au contraire, l'inactivation du gène (*knock out*) codant pour *MIF1* chez *M. persicae* impacte négativement sa survie ainsi que son taux de fécondité. Ces résultats démontrent l'importance de ce facteur dans le contrôle de l'hôte par le puceron (Naessens *et al.*, 2015).

Enfin, deux « Angiotension-converting enzymes » (ACE1 et ACE2) identifiées chez le puceron du pois (Ap) permettraient de maintenir une interaction compatible entre le puceron et son hôte. Bien que leur fonction ne soit pas clairement définie, le double *knout out* de ces gènes chez l'insecte provoque l'accroissement de la mortalité des plantes. En parallèle, les pucerons ayant subis cette double mutation atteignent plus rapidement le phloème et ont donc une étape d'ingestion plus longue que les pucerons témoins (Wang *et al.*, 2015b). Ces deux effecteurs fonctionneraient ensemble pour contrôler le comportement nutritif du puceron afin de favoriser la survie de la plante hôte.

#### 2.1.4. Interactions tripartites plante/puceron/virus

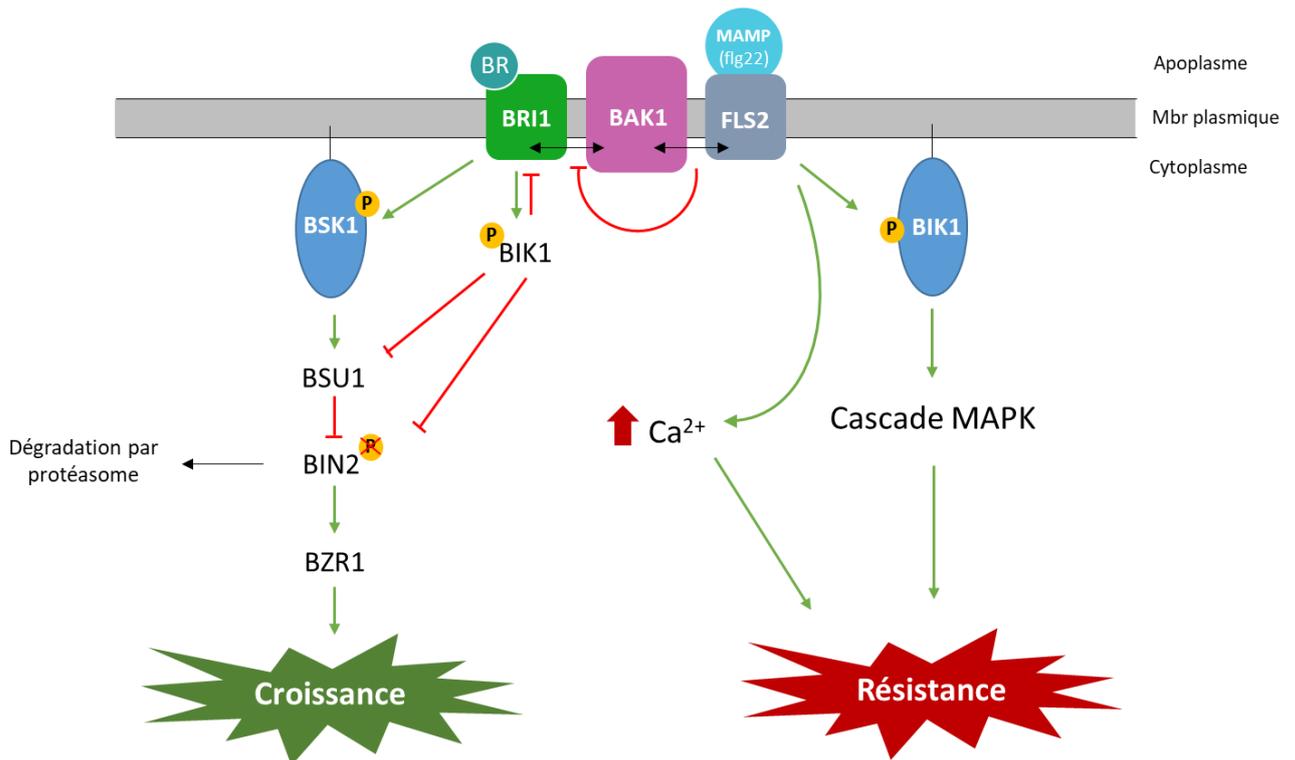
De nombreux insectes herbivores sont des vecteurs d'agents pathogènes des plantes. Les pucerons transmettent des virus à leur plante hôte grâce à leurs pièces buccales perforantes qui facilitent la délivrance des virions dans les cellules (Ng et Perry, 2004).

La polyphagie de certaines espèces de pucerons comme *M. persicae* couplée à leur rapidité de reproduction par parthénogénèse contribuent au succès de la transmission virale dans un grand nombre d'espèces végétales. La transmission se déroule en 3 étapes qui diffèrent en fonction de la persistance du virus dans son hôte. Ainsi, un virus persistant sera absorbé par le puceron se nourrissant sur une plante infectée, les virions circuleront ensuite dans l'hémolymphe de l'insecte puis seront libérés dans les cellules végétales *via* l'émission de salive (Ng et Perry, 2004). En revanche, les virus non persistants seront adsorbés sur le stylet et transmis rapidement par une simple ponctuation aux plantes visitées par le puceron.

Chez le pêcher GF305 par exemple, un seul sondage de *M. persicae* infecté par le *Plum Pox Virus* (Sharka) est suffisant pour inoculer les molécules d'ARN du virus et confère au virus 20% de chance d'aboutir à une infection systémique (Moreno *et al.*, 2009).

Au sein des réseaux trophiques ces différences de transmission induisent une modulation spécifique de la biologie des vecteurs et des plantes par les virus qui influencent cette interaction tripartite. La sélection des plantes hôtes par les pucerons est un processus complexe basé sur l'évaluation de signaux gustatifs et olfactifs. En conséquence, pour favoriser leur dispersion, les virus ont développé la capacité d'agir sur la physiologie de la plante pour la rendre plus ou moins attractive pour ces insectes. Par exemple, les virus non persistants, qui sont localisés uniquement au niveau des pièces buccales sondeuses peuvent réduire la qualité nutritive de la plante hôte et contrôler l'émission de composés volatiles afin de limiter la colonisation au profit de la dispersion rapide des vecteurs (Donnelly *et al.*, 2019). Ainsi, les expériences de choix réalisés par Wamonje *et al.*, (2020) sur *Aphis fabae* et *M. persicae* ont montré que les pucerons s'installaient davantage sur les plantes de *Phaseolus vulgaris* non infectées par le virus de la mosaïque commune du haricot (BCMV), le virus de la nécrose de la mosaïque commune du haricot (BCMNV) ou le virus de la mosaïque du concombre (CMV). Cette préférence est corrélée à l'émission de certains COVs par les plantes infectées comme le méthyl-salicylate, le nonanal ou l'octanal et à la suppression de l'émission de l' $\alpha$ -copaène, un sesquiterpène attractif pour les pucerons.

Au contraire, les virus persistants ont tendance à améliorer la qualité nutritive de l'hôte pour augmenter le temps de nutrition et accroître les chances d'être vectorisés (Bosque-Pérez et Eigenbrode, 2011). Certains virus comme celui de la mosaïque du navet (*Turnip mosaic virus*) sont capables d'augmenter les teneurs en acides aminés libres chez *A. thaliana* et de supprimer le dépôt de callose induit en réponse aux pucerons afin de faciliter l'infestation (Casteel *et al.*, 2014;2015).



**Figure 3 : Implication de BAK1 dans l'antagonisme défense-croissance.** Implication de BAK1 dans la croissance (à gauche): la liaison de brassinostéroïdes avec BRI1 (Brassinosteroid insensitive protein 1) déclenche son association à BAK1 ce qui induit la phosphorylation de BSK1 qui va activer la phosphatase BSU1. BSU1 déphosphoryle la kinase BIN2 ce qui limite la phosphorylation du facteur de transcription BZR1, qui peut favoriser l'expression des gènes régulés par les BR et ainsi promouvoir la croissance végétale. En revanche, la perception des BR par BRI1 peut provoquer la phosphorylation de BIK1 qui va alors supprimer la croissance en régulant négativement BRI1, BSU1 ou BIN2. Implication de BAK1 dans la défense (à droite) : la détection du peptide de flagelline flg22 par le PRR FLS2 (Flagellin-sensitive 2) provoque sa liaison avec BAK1. Cette liaison induit la phosphorylation de la « receptor-like kinase cytoplasmique » BIK1 (Botrytis-induced kinase 1) qui aboutit à une cascade de phosphorylation des « Mitogen-associated protein kinases » MAPK et à l'augmentation du calcium cytosolique déclenchant la défense. La liaison de BAK1 à FLS2 empêche également sa liaison avec BRI1, ce qui inhibe la phosphorylation de BSK1 (brassinosteroid signaling kinase 1) par BRI1 et aboutit à la dégradation de BZR1 (Brassinazole resistant 1) par le protéasome et donc à l'inhibition de la croissance. Les flèches rouges représentent l'inhibition, les flèches vertes l'activation et les doubles flèches une relation d'interaction/liaison.

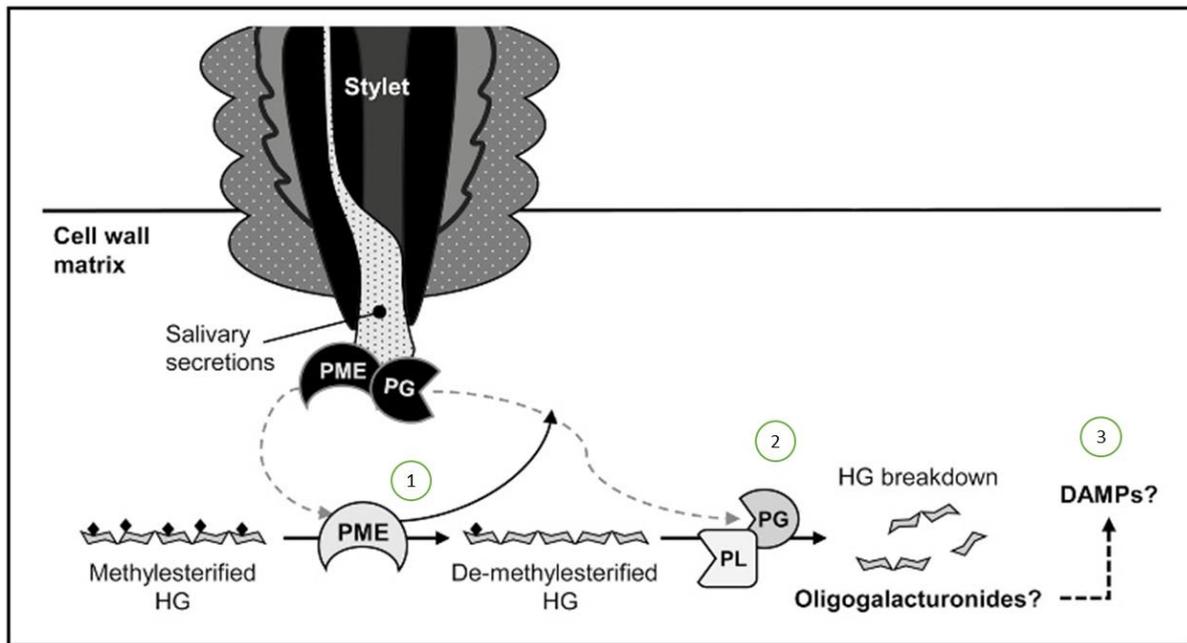
## 2.2. Mécanismes de résistance des plantes aux insectes phloémophages

### 2.2.1. Récepteurs membranaires de la PTI « Pattern Recognition Receptors » (PRR)

Les Pattern Recognition Receptors (PRR) regroupent les Receptor-like kinases (RLK) et les Receptor-like proteins (RLP). Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire variable permettant la reconnaissance de nombreux ligands et d'un domaine transmembranaire. Les récepteurs RLK se distinguent des RLP par la présence d'un domaine kinase cytoplasmique capable de relayer directement l'activation du domaine récepteur jusqu'à la machinerie cellulaire du cytoplasme (Tang *et al.*, 2017). Ces PRR peuvent être classifiés en fonction de la nature de leur ectodomaine, formés de leucine-rich repeats (LRR), de lysine motifs (LysM) ou de type lectin (Couto et Zipfel, 2016).

Parmi les RLK, la kinase réceptrice de type LRR BAK1 (synonyme SERK3) a été identifiée comme corécepteur de plusieurs LRR-RLK et représente donc le nœud de convergence de plusieurs voies de signalisation intervenant dans la croissance et l'immunité. Initialement, BAK1 a été caractérisé pour son interaction avec BRI1, un récepteur des brassinostéroïdes (BR). La liaison des BR au récepteur BRI1 entraîne sa phosphorylation qui déclenche une cascade de signalisation promouvant la croissance (figure 3). Cependant, le plein potentiel de la signalisation BR n'est atteint que lorsque BRI1 active BAK1 par transphosphorylation. En retour BAK1 phosphoryle BRI1 ce qui induit une augmentation de l'activité kinase de BRI1 et donc l'intensification de la signalisation BR (Chinchilla *et al.*, 2009) (Figure 3).

Des fonctions dans l'immunité végétale ont par ailleurs été attribuées à BAK1. Il a été démontré que le premier évènement de signalisation après la perception du peptide de flagelline flg22 (PAMP bactérien) par le récepteur LRR-RLK FLS2 est le recrutement de BAK1 (Sun *et al.*, 2013). L'interaction des domaines kinases de BAK1 et FLS2 induit la phosphorylation de BIK1 (Botrytis-induced kinase 1) qui initie le programme de défense dans le cytoplasme à travers une cascade de phosphorylation des Mitogen associated protein kinases (MAPK) et l'augmentation de calcium cytosolique. En contrepartie, cette liaison empêche l'interaction de BAK1 avec BRI1 ce qui conduit à l'inhibition de la croissance végétale (Chinchilla *et al.*, 2009) (Figure 3). BIK1 peut également former un complexe avec BRI1 qui va être rompu lorsque BRI1 va percevoir les BR et se lier à BAK1.

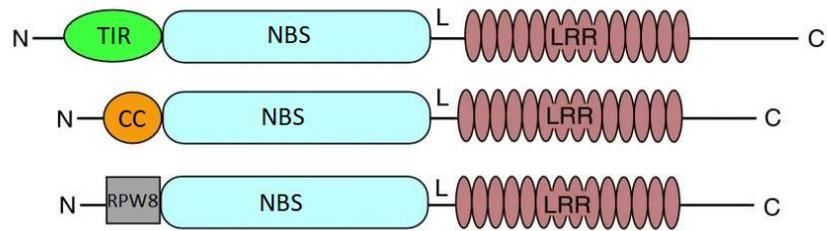


**Figure 4 : Modèle hypothétique démontrant la possibilité de génération de DAMPs pendant l'infestation par les pucerons** (modifié d'après Silva-Sanzana et al., 2020). (1) En raison de l'augmentation de l'activité Pectine méthylesterase (PME) globale (PME végétales et salivaires des pucerons), l'abondance d'homogalacturonanes (HG) déméthylestérifiés augmente pendant l'alimentation des pucerons. (2) L'augmentation de l'activité des enzymes de dégradation des HG, polygalacturonases (PG) et pectate lyases (PL) dans la sécrétion salivaire des pucerons peut entraîner la dépolymérisation des chaînes HG déméthylestérifiées, conduisant à la production d'oligogalacturonides (OGs). (3) Les OGs produits pendant l'alimentation des pucerons pourraient être reconnus comme des signaux DAMPs par la plante hôte, déclenchant des réponses de défense contre l'agresseur.

BRI1 va alors induire la phosphorylation de BIK1 qui va être libéré du complexe et supprimer la croissance en régulant négativement BRI1 et/ou ses composants en aval (Lin *et al.*, 2013). BAK1 a donc un rôle central dans la régulation de plusieurs LRR-RLK et remplit ses différentes fonctions en interagissant avec des récepteurs de liaison au ligand dépendamment du stimulus (Ma *et al.*, 2016).

BAK1 intervient dans la réponse des plantes à l'infestation par des pucerons. Ainsi, chez *Arabidopsis* des extraits de *M. persicae* provoquent l'induction de BAK1 qui conditionne la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène et le dépôt de callose au voisinage des sites de piqûres (Prince *et al.*, 2014). De même, toujours chez *Arabidopsis*, l'induction de gènes marqueurs de la PTI en réponse à la protéine bactérienne GRoEL provenant de *Buchnera* et présente dans la salive des pucerons nécessite l'implication de BAK1 (Chaudhary *et al.*, 2014). En réponse à l'infestation par *M. persicae*, BAK1 conditionne l'influx de  $Ca^{2+}$  extracellulaire par l'activation des récepteurs de glutamate GLR3.3/GLR3.6 (Vincent *et al.*, 2017). Enfin chez la tomate un homologue de BAK1, SISERK1, est nécessaire à la résistance à *Macrosiphum euphorbiae* conférée par le gène *Mi-1.2* (Mantelin *et al.*, 2011). Ils pourraient former un complexe au niveau de la membrane plasmique qui est modifié en présence de la salive du puceron (Pen *et al.*, 2016).

Certains PRR spécifiques peuvent percevoir des « Damaged-Associated Molecular Patterns » (DAMPs) produits lors de l'alimentation des pucerons (Silva-Sanzana *et al.*, 2020). Ces DAMPs incluent des fragments de matrice cellulaire comme les cellodextrines, polymères de glucose avec différents degrés de polymérisation (cellobiose, cellotriose, cellotétraose...) ou des oligogalacturonides (OGs), polysaccharides formés par l'hydrolyse de la pectine, composant majeur de la paroi végétale (Pontiggia *et al.*, 2020). Des molécules intracellulaires libérées lors de la rupture des parois comme l'eATP, l'eNAD(P) ou les protéines « High mobility group box 3 » (HMGB3) peuvent également faire office de DAMPs (Gust *et al.*, 2017). Certains auteurs ont proposé un modèle de reconnaissance des pucerons basés sur ces DAMPs (Silva-Sanzana *et al.*, 2020) (Figure 4). De plus, Will et van Bel, (2008) ont supposé que les enzymes de modification de la paroi (CWME) excrétées par les pucerons pour faciliter la progression du stylet jusqu'au phloème peuvent conduire à la production d'OGs et induire ainsi une défense renforcée autour de la zone de pénétration (Figure 4).



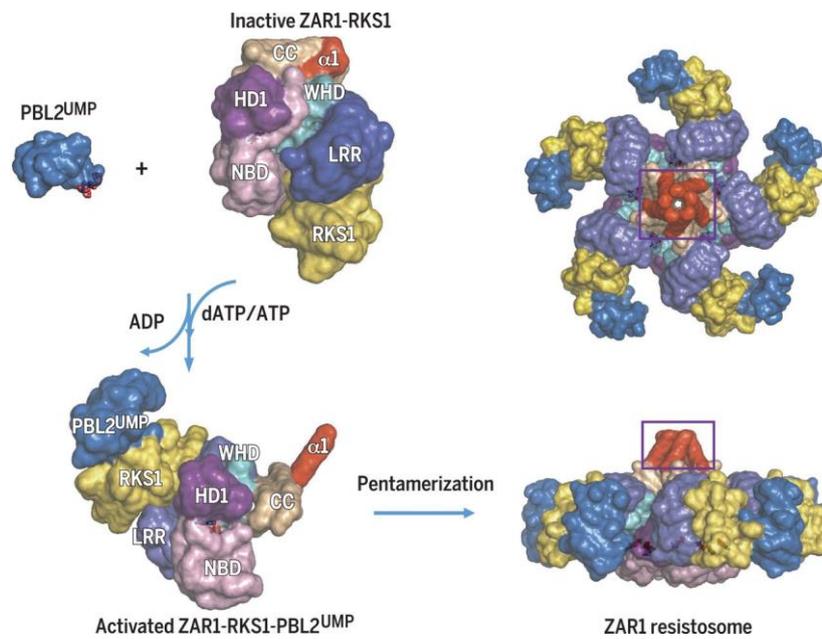
**Figure 5 : Complexes protéiques des NBS-LRR.** N, extrémité aminée ; TIR, domaine N-terminal « Toll/interleukin-receptor » (vert) ; CC, domaine N-terminal « coiled-coil » (orange) ; RPW8, domaine N-terminal « Resistance to Powdery mildew 8 » (gris) ; NBS, « Nucleotide Binding Site » (bleu) ; L, Linker ; LRR, « Leucine Rich Repeat » (pourpre) ; C, extrémité carboxyle.

### 2.2.2. Gènes de résistance aux pucerons (NLR)

Les récepteurs NLR sont des constituants majeurs de l'ETI et sont liés à deux modes de perception ; (i) la reconnaissance directe de quelques facteurs d'avirulence (effecteurs) produits par les bioagresseurs (ii) la reconnaissance indirecte, c'est-à-dire la perception de modification par l'action du bioagresseur de protéines « de garde » (Jones et Dangl, 2006) ou de « leurre ». Cette dernière notion dans laquelle la protéine leurre imite une véritable protéine cible effectrice fait référence au modèle « Decoy » proposé par van der Hoorn et Kamoun (2008) ou « Integrated decoy » lorsqu'il existe une connexion physique entre le NLR et la cible de l'effecteur (Cesari, 2018).

Chaque partie du complexe protéique des NLR joue un rôle essentiel dans la reconnaissance et la transmission du signal d'alerte (Maruta *et al.*, 2022). Le domaine conservé Nucleotide Binding Site (NBS) est une NTPase pouvant fixer et hydrolyser l'ATP/ADP. L'activation de cette fonction lors de la perception d'un agresseur déclenche la modification conformationnelle de la protéine, la faisant passer à un état « actif » qui assure la transduction du signal. Le domaine très variable Leucine-Rich-Repeat (LRR) est impliqué dans l'interaction protéine-protéine et permet la liaison avec un ligand (Kobe et Kajava, 2001). Il pourrait donc être impliqué dans des interactions directes avec les effecteurs. Certaines études soutiennent également l'idée qu'il aurait une fonction de régulation de la transduction du signal *via* son interaction avec le domaine NBS (DeYoung et Innes, 2006). Enfin, les 3 domaines N-terminal existants des NBS-LRR ; Coiled-Coil (CC), Toll-Interleukin-Receptor (TIR) et Resistance to Powdery mildew8 (RPW8) peuvent se dimériser et induire seuls une mort cellulaire spontanée (Bernoux *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2014) (Figure 5).

Plus récemment, l'étude de Wang *et al.*, (2019a) a permis d'élucider avec précision la composition et la structure d'un CC-NBS-LRR appelé ZAR1 chez *A. thaliana*. Ainsi, l'interaction de PLB2<sup>UMP</sup>, forme uridylylée de la RLK cytoplasmique PBL2 après la reconnaissance de l'effecteur AvrAC de *Xanthomonas campestris*, avec le complexe ZAR1-RKS1 provoque un changement conformationnel de ZAR1 couplé à la libération d'ADP. Ce phénomène permet au complexe de se lier à l'ATP ce qui induit une activation complète de ZAR1 et sa modification structurale sous forme de résistosome pentamérique. Le NLR passe alors dans son état « actif ».



**Figure 6 : Formation du résistosome lors de la perception d'un agent pathogène par le récepteur NLR (Wang et al. 2019a).** (1) Interaction de PBL2UMP (PBL2 uridylylé par l'effecteur AvrAC de *X. campestris*) (bleu) avec le complexe ZAR1-RKS1 inactif. (2) L'interaction provoque la libération d'ADP et un changement de conformation de ZAR1. (3) La liaison de l'ATP ou d'ATP avec le complexe induit un remodelage structurel et un nouveau changement de conformation de ZAR1, ce qui entraîne son activation complète et l'exposition de l'hélice  $\alpha 1$  (rouge) aux solvants. (4) Cinq unités du complexe s'associent en pentamère pour la formation du résistosome (représenté dans deux orientations). Les hélices  $\alpha 1$  de ZAR1 forment une structure en forme d'entonnoir dans le résistosome.

Ce résistosome est notamment constitué de cinq hélices  $\alpha$  du domaine CC ( $\alpha 1$ ) qui forment une structure en entonnoir nécessaire pour la liaison de ZAR1 à la membrane plasmique ainsi qu'à l'induction de la mort cellulaire et de la résistance aux agents pathogènes (Figure 6). La découverte de cette nouvelle structure a permis de faire un bond dans la compréhension du fonctionnement des NLR.

Certains NLR conférant une résistance aux pucerons ont été caractérisés au niveau moléculaire; *Mi-1.2* chez la tomate conférant une résistance à *M. euphorbiae* (Rossi *et al.*, 1998) et *Vat* chez le melon contre *A. gossypii* (Dogimont *et al.*, 2014). Le gène dominant *Mi-1.2* code une protéine CC-NBS-LRR, qui est localisé à la fois dans le cytoplasme, sur la membrane plasmique et dans le noyau (Milligan *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2016). Il s'agit du premier gène de résistance à un insecte cloné. De plus, il est le premier exemple de gène de résistance actif contre des organismes éloignés puisqu'il confère à la tomate une résistance à *M. euphorbiae*, aux psylles *Bactericerca cockerelli* (Casteel *et al.*, 2006), aux aleurodes (Nombela *et al.*, 2003) et aux nématodes à galles (Vos *et al.*, 1998). Cette résistance est en partie basée sur le contrôle de la signalisation de SA (de Ilarduya *et al.*, 2003) et nécessite le gène « SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1 » (*SISERK1*), homologue du récepteur PRR BAK1 (Mantelin *et al.*, 2011). De plus, Pallipparambil *et al.*, (2015) ont démontré que *Mi-1.2* avait un impact négatif sur des hémiptères ne se nourrissant pas de sève phloémienne. En effet, les larves d'*Orius insidiosus*, punaises Anthocoridae prédatrices zoophytophages utilisées dans la lutte biologique contre les pucerons avaient un taux de survie plus faible sur les génotypes de tomates possédant le gène *Mi-1.2*, étendant ainsi le spectre d'action de la résistance contrôlée par ce gène.

Le gène *Vat* code également une protéine de type CC-NBS-LRR qui confère une double résistance à *A. gossypii* et à des virus non-persistants comme le CMV (*Cucumber mosaic virus*) lorsqu'ils sont transmis par ce vecteur (Dogimont *et al.*, 2014). Cette résistance, qui implique une réponse hypersensible localisée (Villada *et al.*, 2009) et influence négativement la nutrition du puceron, est efficace vis-à-vis de la plupart des clones d'*A. gossypii* (Boissot *et al.*, 2016a,b). Cependant des biotypes du puceron sont adaptés à la résistance conférée par *Vat*, certains par la modification de leurs éliciteurs qui ne sont plus reconnus par *Vat*, d'autres grâce à leur adaptation aux défenses induites (Boissot *et al.*, 2016b).

La résistance conférée par ces NLR est facilement exploitable en sélection variétale et relativement efficace mais peut être menacée par la capacité des pucerons à surmonter les mécanismes de résistance mis en place ou éviter la détection par les gènes de résistance. D'autres cas de contournement de la résistance ont été notés chez les plantes de soja pourvues des gènes de résistance *Rag1* et *Rag2*. En effet, des individus de l'espèce *Aphis glycines* ont développé la capacité de réprimer une partie de leurs effecteurs putatifs de manière constitutive ou lorsqu'ils se nourrissent sur des plantes possédant les gènes *Rag* (Yates-Stewart *et al.*, 2020). La perte de fonctionnalité de certains effecteurs pourrait être notamment imputée à la surexpression d'éléments transposables pouvant influencer la transcription ou l'expression de certains effecteurs (Yates-Stewart *et al.*, 2020).

Hormis *Vat* et *Mi1.2*, des loci conférant une résistance contre les pucerons ont également été décrits chez le soja *Glycine max* (*Rag* ; Hill *et al.*, 2017), le niébé (*Rac1*, *Rac2* ; Githiri *et al.*, 1996), la luzerne tronquée *Medicago truncatula* (*AIN/AKR*, *RAP1* ; Stewart *et al.*, 2009; Kamphuis *et al.*, 2019), le pêcher (*Rm1*, *Rm2*, *Rm3* ; Monet et Massonié, 1994; Niu *et al.*, 2016 ; Pascal *et al.*, 2011) ou encore le blé (*Dn*, *Gby* ; Boyko *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2007; Berzonsky *et al.*, 2010) mais la nature de ces gènes n'a pas été clairement identifiée. Par exemple, les gènes *AKR* (*Acyrtosiphon kondoi* resistance) et *AIN* (*Acyrtosiphon* induced necrosis) chez *M. truncatula* contrôlent la résistance au puceron bleu-vert (Kamphuis *et al.*, 2019). *AKR* est un gène de résistance dominant qui opère au niveau du phloème en empêchant l'ingestion de la sève par le puceron et en induisant la voie de signalisation de l'acide jasmonique (JA). Quant à *AIN*, il est associé à la réduction de la biomasse des pucerons et à l'apparition de lésions nécrotiques en réponse à l'infestation (Kamphuis *et al.*, 2019). Ces deux gènes ont donc des effets additifs sur le phénotype de résistance de la Luzerne et conditionnent tous deux la production d'espèce réactives de l'oxygène au niveau du site de piqûre. Cependant, la dominance d'*AKR* engendre une suppression de certaines réponses liées à *AIN*, en particulier le phénomène de réponse hypersensible (HR) associé aux lésions nécrotiques. (Kamphuis *et al.*, 2019) Les interactions entre ces deux loci de résistance indiquent donc une interaction complexe entre la signalisation JA et la HR pour potentialiser la résistance aux pucerons chez *M. truncatula*.

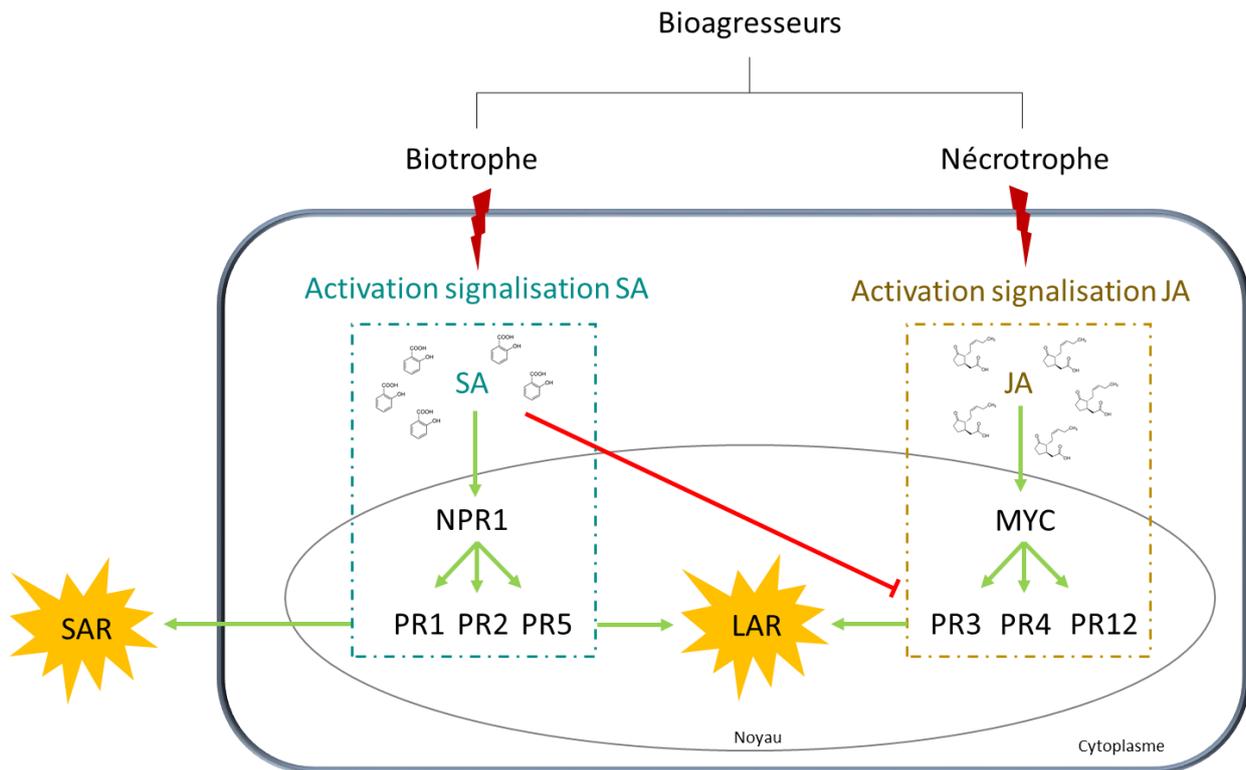


Figure 7 : **Activation des réponses de défense par les phytohormones selon les stratégies nutritives des bioagresseurs** (d'après Ali et al., 2018). L'infection par les bioagresseurs biotrophes entraîne l'activation de la signalisation SA (acide salicylique) contrôlée par NPR1. NPR1 induit à son tour des protéines « Pathogenesis related » (PR) spécifiques ; PR-1, PR-2 et PR-5 ainsi qu'une réponse systémique acquise (SAR). L'infection des agents pathogènes nécrotrophes active la signalisation JA (acide jasmonique) qui induit les protéines PR-3, PR-4 et PR-12. Les deux voies de signalisation SA et JA sont responsables de la mise en place d'une « local acquired resistance » (LAR). Les flèches rouges indiquent une répression et les flèches vertes une activation.

### 2.2.3. Cinétique de mise en place des différents acteurs de signalisation

La perception des signaux de danger par les récepteurs précédemment décrits déclenche une cascade de signalisation aboutissant à l'induction des mécanismes de défense ou résistance. Les changements dynamiques des messagers secondaires, tels que le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'oxyde nitrique (NO), servent de signatures pour la signalisation intracellulaire et les communications intercellulaires (Vincent *et al.*, 2017). Ces molécules ainsi que les phytohormones peuvent elles aussi agir sur différentes cibles comme les MAPK « Mitogen-Activated Protein Kinases » ou les facteurs de transcription pour propager le signal de défense ou agir directement sur l'expression des gènes de défense. Dans ces travaux, Vincent *et al.*, (2017) ont par exemple démontré que la réponse d'*Arabidopsis* à *M. persicae* est dépendante de l'interaction entre le récepteur BAK1, les canaux ioniques de la membrane plasmique GLR3.3 et GLR3.6, le canal ionique vacuolaire TPC1 et pourrait être en partie affectée par la signalisation JA.

#### 2.2.3.1. Antagonisme des signalisations de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique

##### **Acide jasmonique**

Couramment, l'acide jasmonique (JA) est associé à la réponse des plantes contre les agents pathogènes nécrotrophes et les herbivores broyeurs (Howe et Jander, 2008; Campos *et al.*, 2014) (Figure 7). Cette phytohormone et son conjugué JA-isoleucine (JA-Ile) sont issus des lipides et synthétisés *via* la voie des oxylipines. Plusieurs preuves de l'implication de JA dans la défense des plantes contre les pucerons, étant pourtant des insectes biotrophes, ont déjà été avancées. Par exemple, chez *Arabidopsis*, la mutation du gène « Constitutive expressor of vegetative storage protein 1 » (*CEV1*), qui code pour une cellulose synthase faisant le lien entre la signalisation au niveau de la paroi et les réponses régulées par JA et l'éthylène (ET), permet une activation constitutive des défenses en réponse à *M. persicae* et réduit drastiquement son développement (Ellis *et al.*, 2002). Ce mutant accumule non seulement JA, OPDA (précurseur du JA) et ET mais surexprime également des gènes marqueurs de la signalisation JA comme « Vegetative Storage Protein » (*VSP*) et « Plant defense 1.2 » (*PDF1.2*) (Ellis *et al.*, 2002).

Dans les systèmes *Solanum lycopersicum*/*M. euphorbiae* (Fidantsef *et al.*, 1999) ou *Nicotiana attenuata*/*M. persicae nicotianae* (Voelckel *et al.*, 2004), le gène codant pour « Lipoxygénase » (*LOX*) qui catalyse la première étape de la biosynthèse du JA, est fortement induit après infestation, de même que *PDF1.2*, marqueur de la signalisation JA, lors de l'infestation d'*A. thaliana* par *M. persicae* (Moran et Thompson, 2001).

### **Acide salicylique (SA)**

Le SA est une hormone clé dans la mise en place de la PTI, ETI, HR et induction de la résistance systémique acquise (SAR) au sein des plantes (Ding et Ding, 2020). Contrairement au JA, il est davantage associé à la résistance contre les bioagresseurs biotrophes (Glazebrook, 2005) (Figure 7), ce qui est le cas des pucerons. Le système furtif d'alimentation des pucerons, couplé à l'interaction du stylet avec les espaces intercellulaires induisent des modèles d'expression génique caractéristiques de la signalisation de défense SA (Moran et Thompson, 2001). Des recherches ont mis en évidence une variation des niveaux de ROS et  $Ca^{2+}$  provoquant une modification de l'état redox dans le cytosol suite à une accumulation de SA lors d'une attaque (Mou *et al.*, 2003; Morkunas *et al.*, 2011). Cet événement active le gène NON-EXPRESSION OF PR-1 (*NPR1*) (Wu *et al.*, 2012) qui contrôle la signalisation de SA et induit divers acteurs des réponses de défense comme les PATHOGENESIS RELATED PROTEIN (PR-1, PR-2 et PR-5) chez *Arabidopsis* en réponse à *M. persicae* et *B. brassicae* (Zhang *et al.*, 1999; van Loon *et al.*, 2006) ou des facteurs de transcription WRKY (15, WRKY26, WRKY30, WRKY38, WRKY46, WRKY50, WRKY51 et WRKY54) contre *B. brassicae* (Kuśnierczyk *et al.*, 2008).

Enfin, alors que *NPR1* agit en aval de la signalisation SA, les gènes PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (*PAD4*) et ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (*EDS1*) agissent en amont, en stimulant la biosynthèse de SA, et sont régulés entre autre par des gènes R de type TIR-NBS-LRR (Wiermer *et al.*, 2005). En revanche, chez *Arabidopsis*, la défense contre *M. persicae* contrôlée par *PAD4* ne nécessite ni *EDS1* ni la signalisation SA (Louis *et al.*, 2012) mais serait plutôt liée à la capacité de *PAD4* à promouvoir la sénescence et la mort cellulaire *via* l'accumulation de  $H_2O_2$  (Louis et Shah, 2015).

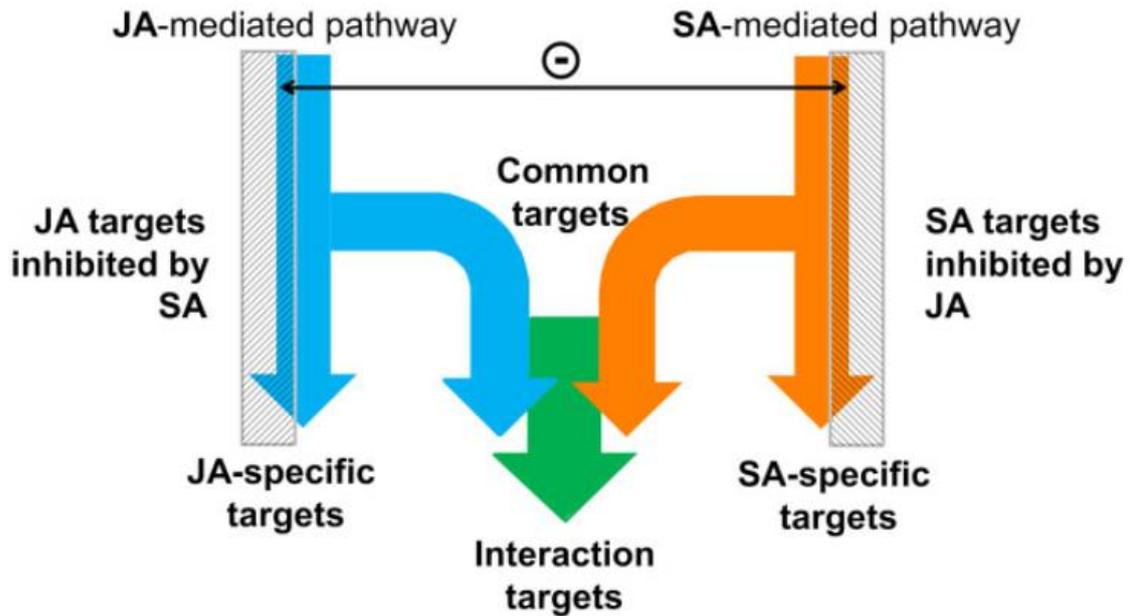
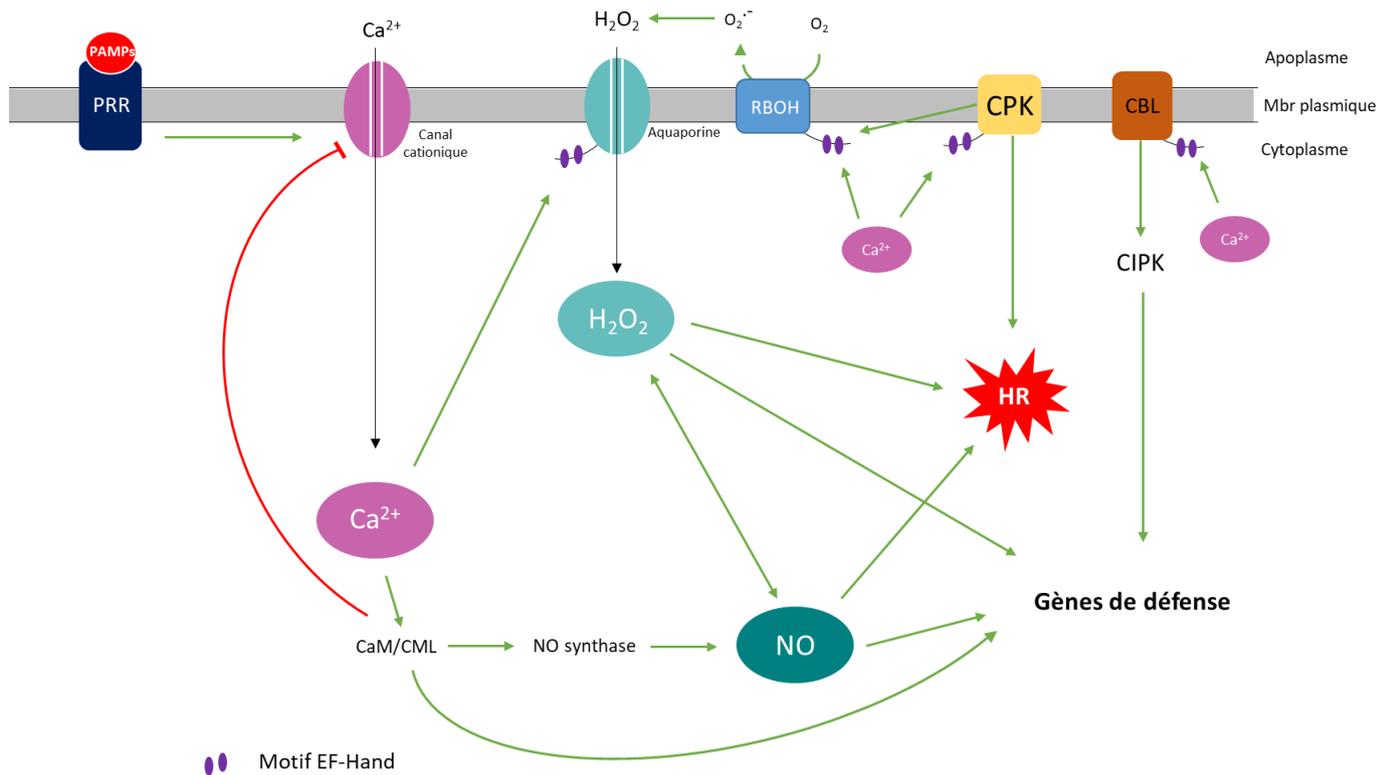


Figure 8 : **Modèle de dialogue moléculaire entre la signalisation JA et SA** (Schweiger et al., 2014). Les flèches larges indiquent les métabolites cibles régulés par une seule des phytohormones (JA : acide jasmonique en bleu ; SA : acide salicylique en orange) ou des cibles communes ne pouvant être induites que par l'une ou l'autre des hormones si elles interviennent séparément. La flèche verte indique les cibles régulées uniquement si les deux hormones sont appliquées simultanément. Les zones hachurées correspondent à droite : aux cibles de SA pouvant être négativement régulées par JA et à gauche : aux cibles de JA pouvant être négativement régulées par SA. L'antagonisme est indiquée au dessus par le signe moins et la flèche étroite pointant vers les zones hachurées.

En effet, bien que la réponse médiée par SA soit parfois observée chez les génotypes sensibles aux pucerons, il semblerait qu'elle soit davantage associée au phénomène d'antibiose et antixénose chez les hôtes résistants. Li *et al.*, (2006) ainsi que de Ilarduya *et al.*, (2003) ont démontré que le SA était essentiel à la résistance à *M. euphorbiae* contrôlée par *Mi-1.2* chez la tomate. De plus, chez *M. truncatula* infesté par *A. kondoi*, l'induction de 3 gènes de réponse à SA était plus précoce chez le génotype Jester résistant aux pucerons. Cependant, Pegadaraju, (2005) a mis en évidence une surexpression du gène « SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2 » (*SID2*), codant pour l'isochorismate synthase 1 qui catalyse la dernière étape de biosynthèse de SA, en réponse à l'infestation de *M. persicae* chez *Arabidopsis*, dépourvu de gènes de résistance aux pucerons.

### **Exploitation de l'antagonisme SA/JA par les pucerons : un désamorçage des réponses de défense ?**

Certains auteurs, en s'appuyant sur des recherches précédentes, ont proposé un modèle dans lequel le puceron pourrait exploiter l'antagonisme entre SA et JA (Figure 8) en se servant de SA pour inhiber la signalisation JA/ET et faciliter l'infestation. Par exemple, Schwartzberg et Tumlinson, (2014) ont rapporté que le miellat de *A. pisum* contenait du SA. L'application exogène de ce miellat sur les feuilles de *Vicia faba* a totalement supprimé l'accumulation de JA, entraînant une suppression des défenses induites chez la plante. De même, chez *Capsicum annuum*, l'infestation de *Myzus persicae* a déclenché une augmentation précoce des teneurs en JA et JA-Ile. Néanmoins, après 96h d'infestation ces niveaux ont diminué en faveur de l'accumulation de SA ce qui suggère un « switch » entre ces deux voies de signalisation au cours de l'infestation (Florencio-Ortiz *et al.*, 2018). Les interconnexions et dialogues moléculaires qui subsistent entre les phytohormones sont donc des éléments clés dans la réponse des plantes aux pucerons.



**Figure 9 : Modèle de fonctionnement des mécanismes possibles dans les voies de signalisation des messagers secondaires.** La reconnaissance du bioagresseur par un récepteur PRR entraîne l'activation du canal cationique et l'élévation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Cette élévation augmente les liaisons de Ca<sup>2+</sup> avec la calmoduline (CaM) (ou à la protéine de type CaM (CML)) qui induit l'expression de gènes de défense et la synthèse d'oxyde nitrique (NO). Le Ca<sup>2+</sup> cytosolique active également plusieurs protéines membranaires en ciblant le motif de liaison au calcium EF-Hand. L'activation des CPK (Calcium-dépendant protein kinase) peut déclencher la réaction hypersensible (HR) et la synthèse de ROS à travers l'induction des RBOH (Respiratory burst oxidase homolog). Sous l'effet de leur interaction avec le Ca<sup>2+</sup> les protéines CBL (Calcineurin B-like protein) induisent également l'expression des gènes de défense via le recrutement des CIPK (CBL-interacting serine/threonine protein kinase). Le Ca<sup>2+</sup> peut également contrôler l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le cytosol via l'induction des RBOH et l'activation des aquaporines. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO jouent également un rôle central dans l'expression des gènes de défense et la mise en place de la HR. Les flèches vertes indiquent une activation, la rouge une répression et les flèches noires une circulation à travers des canaux spécifiques.

### 2.2.3.2. Messagers secondaires

#### **Variations du flux de $Ca^{2+}$**

Le calcium est un messager secondaire qui permet la transduction et l'amplification des signaux d'alerte à travers les cellules (Allan *et al.*, 2022) grâce à la génération d'un schéma de variation spécifique à chaque interaction (Lecourieux *et al.*, 2005; Kosuta *et al.*, 2008). Cette signalisation est induite quelques secondes après une attaque et provoque une inversion des flux de calcium, qui va alors s'accumuler dans le cytoplasme (Figure 9). Chez *A. thaliana*, *M. persicae* déclenche la signalisation  $Ca^{2+}$  via l'induction de 2 gènes codant les « GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE » (*GLR3.3* et *GLR3.6*) (Vincent *et al.*, 2017).

Ces signaux sont ensuite décodés en aval par 2 types de capteurs ; (i) les Calcineurin B-like protein » (CBL) et les calmodulines (CaM) qui ne possèdent pas de domaines fonctionnels et jouent davantage le rôle de relais du signal et (ii) les « Calcium-dependent protein kinase » (CDPK) et les « CBL-interacting serine/threonine-protein kinase » (Ranty *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2020) (Figure 9). Certaines CDPK ont été caractérisées pour leur rôle dans la transduction du signal de défense des plantes en réponse à différents herbivores. Par exemple, Hettenhausen *et al.*, (2016) ont montré que l'infestation du soja par *Aphis glycines*, induit l'expression de 10 CDPKs (GmCPDK5, 6, 9, 10, 12, 19, 24, 29, 36 et 41) après 8 h de contact. Ces réseaux protéiques peuvent agir de façon synergique avec les MAPK (Boudsocq *et al.*, 2010) ou avec les ROS pour propager le signal de défense (Marcec *et al.*, 2019).

#### **Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et oxyde nitrique (NO)**

La signalisation calcique est essentielle à la signalisation liée aux ROS puisqu'elle permet l'activation des enzymes générant les ROS comme les NADPH-oxydases qui présentent un motif EF-Hand de liaison au  $Ca^{2+}$  (Kobayashi *et al.*, 2007; Seybold *et al.*, 2014) (Figure 9). Les espèces réactives de l'oxygène ainsi formées se présentent sous différentes formes : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH\cdot$ ) et le radical hydroperoxyde ( $HO_2\cdot$ ) (Apel et Hirt, 2004). La signalisation des ROS s'appuie principalement sur l'oxydation des groupes thiols des résidus cystéines des protéines cibles dont l'état redox conditionne la structure protéique et ses fonctionnalités.

Ils vont par exemple pouvoir oxyder l'ectodomaine de certaines RLK ce qui déclenche l'activation de la signalisation en aval dans le cytoplasme (Kimura *et al.*, 2017). Plusieurs études confirment l'implication de ces composés dans la réponse des plantes aux pucerons (Goggin et Fischer, 2022). Jaouannet *et al.*, (2015) ont montré que des mutants *rboh*d et *rboh*f d'*Arabidopsis*, incapables d'accumuler les ROS, présentaient une défense réduite face à *Myzus persicae* par rapport aux plantes témoins. De plus, une accumulation massive et précoce d' $H_2O_2$  est observée dans des lignées de *Triticum aestivum* résistantes à *Diuraphis noxia* (puceron russe du blé), contrairement aux lignées sensibles, associant ainsi les ROS au caractère de résistance (Moloi et van der Westhuizen, 2014). Finalement, les travaux de Kerchev, (2011) ont démontré que les premiers évènements survenant chez la pomme de terre lors de l'attaque de *Myzus persicae* concernent la régulation spatiale et temporelle de la production de ROS, essentielle pour leur fonction de signalisation. Des changements d'expression des gènes conduisant à l'accumulation de  $H_2O_2$ , au piégage des ROS ou à leur détoxification ont été observés.

De surcroît, la signalisation des ROS est fortement connectée aux processus liés à l'oxyde nitrique, qui est un radical libre gazeux impliqué dans les réponses biotiques et abiotiques des plantes à l'environnement (Domingos *et al.*, 2015). NO s'accumule dans les premières heures suivant la mise en contact de plantes avec divers bioagresseurs et peut intervenir dans le déclenchement de la réponse hypersensible (Zhao, 2007; Yoshioka *et al.*, 2011). Il tient d'ailleurs une part importante dans les mécanismes de résistance du blé au puceron russe du blé (Moloi et van der Westhuizen, 2014). Ce composé peut également se lier de façon covalente au GSH pour former du S-nitrosoglutathione (GSNO), molécule dont l'application sur le pois a permis de réduire l'expansion et la fécondité d'*A. pisum* (Woźniak *et al.*, 2017). Enfin, une accumulation de preuves suggère que les voies de signalisation des ROS sont étroitement liées aux voies de signalisation des hormones dans les interactions plantes-insectes (Kerchev, 2011).

## Developmental cues / environmental stress

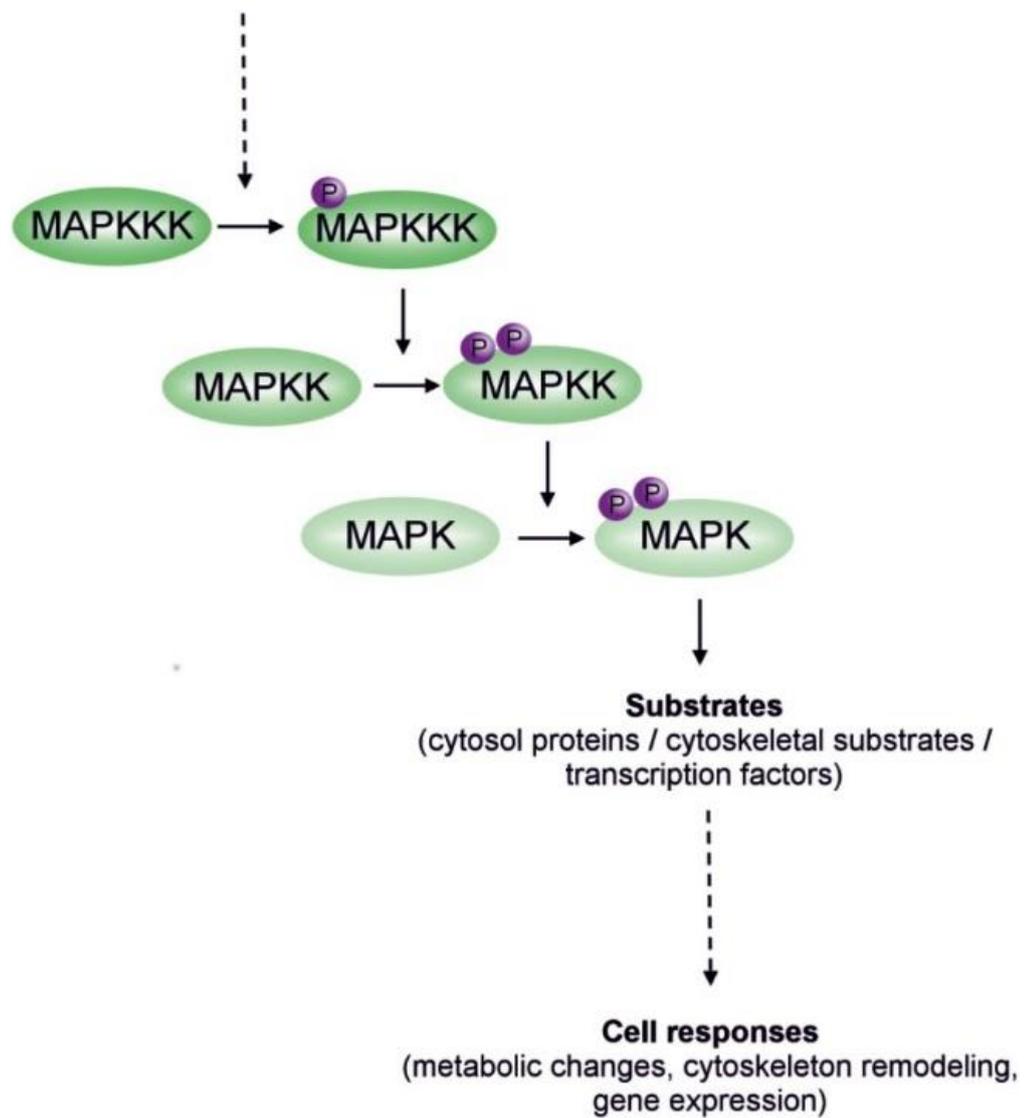


Figure 10 : Représentation schématique de la cascade de phosphorylation des "Mitogen associated Protein kinase" (MAPK) (Jagodzik et al., 2018). P : phosphorylation

### 2.2.3.3. Cascades signalétiques par les « Mitogen Activated Protein Kinases » (MAPK)

La reconnaissance d'un bioagresseur par un récepteur RLK, la variation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ou l'accumulation de ROS sont autant de facteurs conduisant à l'induction des protéines kinases, transférases très conservées chez les eucaryotes qui catalysent la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine de protéines cibles (Thulasi Devendrakumar *et al.*, 2018). Cette induction se traduit par une phosphorylation en cascade des MAP-kinase kinase kinase, qui vont elle-même activer les MAP-kinase kinase qui ensuite pourront activer les MAP-kinase et enfin phosphoryler les substrats ciblés, dont la plupart sont des facteurs de transcription ou des enzymes liées au stress (Hettenhausen *et al.*, 2015) (Figure 10).

Dans l'interaction plante/puceron, Li *et al.*, (2006) ont dévoilé l'importance des cascades de MAPK en aval du gène de résistance *Mi-1.2* chez la tomate en réponse à *M. euphorbiae*. Ainsi, l'extinction transitoire par VIGS de *LeMCK2* et de 3 autres MAPK pouvant être phosphorylées par *LeMCK2* (*LeMPK3*, *LeMPK1* et *LeMPK2s*) atténue la résistance du génotype de tomate porteur de *Mi-1.2*. Précédemment, d'autres études avaient mis en évidence l'implication de *MPK3* dans la réponse de défense au puceron chez *Arabidopsis* (Moran *et al.*, 2002). De plus, des teneurs variables en  $\text{CO}_2$  peuvent affecter certaines MAPK. Chez *N. attenuata* notamment, des teneurs élevées en  $\text{CO}_2$  induisent la surexpression de *MPK4*, provoquant ainsi une ouverture plus grande des stomates, la diminution des teneurs en eau dans la plante, l'induction de la signalisation jasmonique et, de ce fait, une réduction de la population de *Myzus persicae* sur la plante (Guo *et al.*, 2017).

Les MAPK sont donc impliquées à la fois dans la résistance contrôlée par un gène NBS-LRR et dans des réponses plus générales correspondant à la PTI. Elles peuvent aussi intégrer des signaux environnementaux pour réguler les interactions plante/puceron.

### 2.2.3.4. Cible des messagers de signalisation : les facteurs de transcription

Pour aboutir à la mise en place de la résistance, les voies de signalisation précédemment mentionnées vont cibler et induire des facteurs de transcription spécifiques. D'une manière générale, les facteurs de transcription WRKY interviennent dans des processus divers de croissance, développement et de stress biotique ou abiotique (Rushton *et al.*, 2010). Cependant, certains sont des composants essentiels de la résistance des plantes aux pucerons.

Par exemple, le facteur de transcription WRKY70 est associé à la résistance à *M. euphorbiae* contrôlée par *Mi-1.2* chez la tomate. Atamian *et al.*, (2012) ont démontré que les plantes *wrky70* étaient plus sensibles aux pucerons de la pomme de terre et aux nématodes. En parallèle, l'infestation des plants par *M. euphorbiae* a prouvé l'inductibilité de ce facteur en réponse aux pucerons.

De même, chez le Chrysanthème hôte de *Macrosiphoniella sanbourni*, l'infestation, ainsi que des traitements à l'acide abscissique (ABA) et au Méthyl-jasmonate (MeJA), provoquent la surexpression des facteurs CmWRKY42 et CmWRKY48. En outre, une expression constitutive de *CmWRKY48* dans cette plante accroît ses réponses de défense puisqu'elle inhibe la croissance des colonies de *M. sanbourni* (Li *et al.*, 2015a). Dans ce même modèle, deux autres facteurs de transcription, *CmMYB15* et *CmMYB19*, sont induits en réponse aux pucerons. Contrairement aux WRKY, les MYB ne sont pas uniques aux plantes et sont très largement distribués chez les eucaryotes. Ils participent au contrôle du cycle cellulaire (Ambawat *et al.*, 2013) mais sont également impliqués dans des processus spécifiques des plantes comme le métabolisme des phénylpropanoïdes (Hichri *et al.*, 2011). Chez le Chrysanthème, la surexpression de ces 2 facteurs provoque l'induction des gènes *CmPAL1*, *CmC4H*, *Cm4CL*, *CmHCT*, *CmC3H*, *CmCCoAOMT* et *CmCCR* responsable de la biosynthèse de la lignine ce qui entraîne une réduction du taux de multiplication de *M. sanbourni* (Wang *et al.*, 2017; An *et al.*, 2019).

Pourtant, certains facteurs de transcription sont au contraire des régulateurs négatifs de la défense contre les pucerons. En effet, WRKY22, bien qu'associé à la PTI contre les agents pathogènes, est un facteur de sensibilité à *M. persicae* que certains auteurs soupçonnent d'être utilisé par Myzus pour altérer les réponses de signalisation SA/JA (Kloth *et al.*, 2016). De même, chez *A. thaliana* la surexpression du facteur *MYB102* en présence de *M. persicae* induit l'expression de la « 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase » (ACS), qui contrôle positivement certaines enzymes de biosynthèse de l'ET. Ainsi, l'augmentation des teneurs en ET dans les plantes infestées a conduit à l'accroissement de leur sensibilité à *M. persicae* (Zhu *et al.*, 2018). Ces exemples illustrent la finesse mais aussi la fragilité de la signalisation mise en place par la plante pour répondre aux agresseurs.

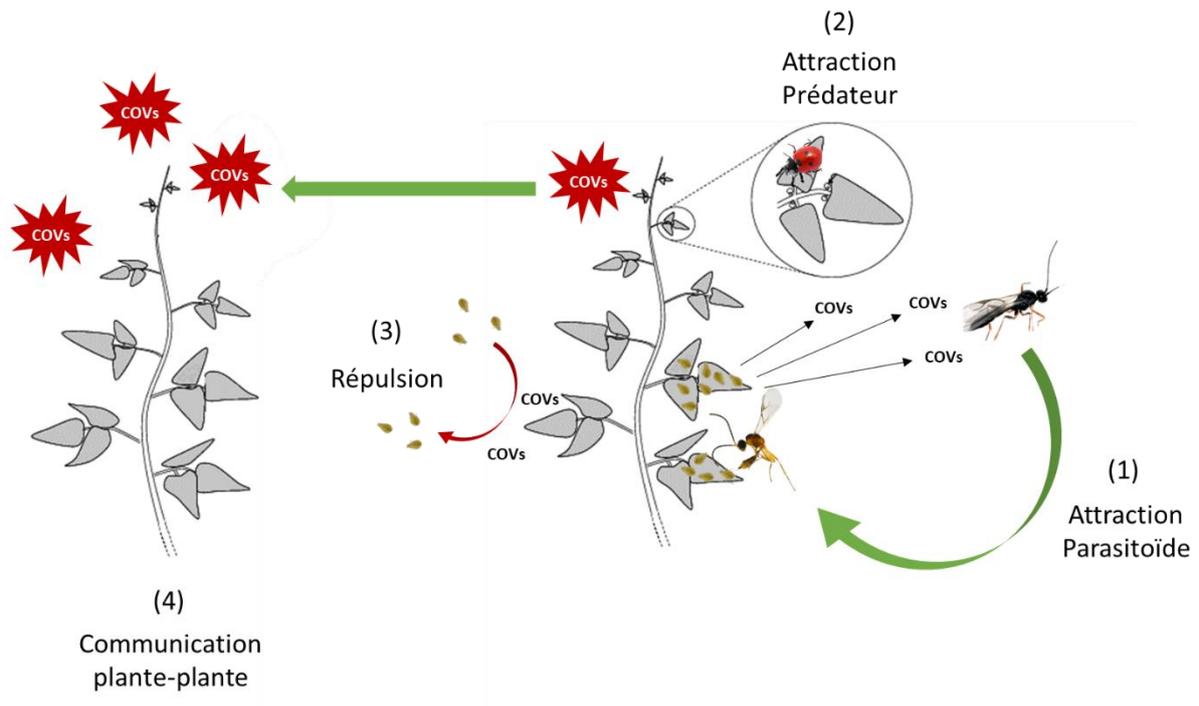


Figure 11 : **Défenses indirectes mises en place via la libération de composés volatils (COVs)** (adapté de Ballhorn et al., 2011). En réponse aux dommages causés par les herbivores les plantes libèrent des composés organiques volatils (COVs) qui permettent (1) aux parasitoïdes de localiser leur hôte sur la plante (2) d'attirer des prédateurs, (3) de repousser les ravageurs et donc de limiter la colonisation via leur propriété répulsive et enfin (4) de transmettre un signal d'alerte aux plantes voisines afin de stimuler leurs défenses avant l'arrivée de l'herbivore.

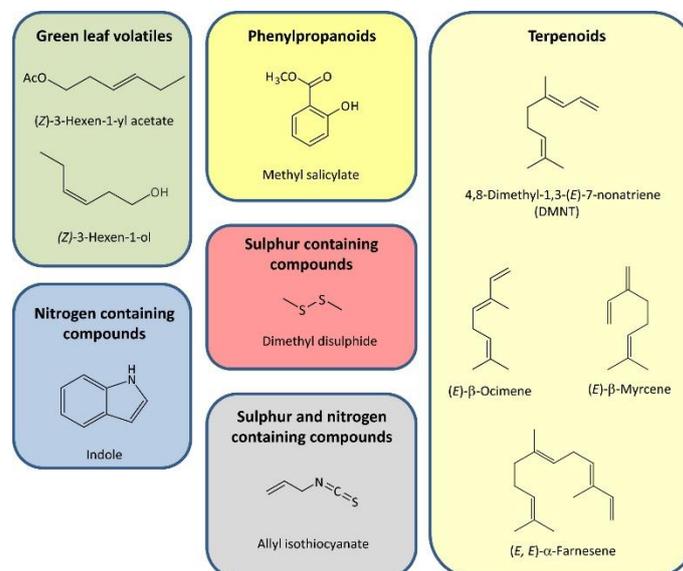


Figure 12 : **Classes de composés volatils émis par les plantes en réponse à l'herbivorie**

## 2.2.4. Mise en place d'un arsenal de défense diversifié

### 2.2.4.1. Défenses indirectes : composés volatils et attraction des parasitoïdes

Les plantes, dès la détection d'un agresseur, peuvent émettre un ensemble de composés volatils appelés " volatils végétaux induits par les herbivores " (HIPV). Ces composés confèrent une protection aux plantes en agissant comme composés de signalisation longue distance. Ainsi, un mélange de composés diversifiés est émis dans l'environnement et agit à différents niveaux, soit en induisant la défense dans des tissus non attaqués de la plante soit en alertant les plantes voisines de la présence d'un agresseur ou encore en attirant des ennemis naturels des ravageurs comme les coccinelles ou les guêpes parasitoïdes des pucerons (Heil et Silva Bueno, 2007; de Vos et Jander, 2010; Turlings et Erb, 2018; Paudel Timilsena *et al.*, 2020) (Figure 11). Au sein de la plante, ils permettent donc un dialogue rapide entre deux organes n'ayant pas de connexion vasculaire directe. Ils contrôlent donc un large éventail d'interactions multitrophiques et sont eux-même régulés par le réseau complexe des phytohormones comprenant le SA et JA (Dudareva *et al.*, 2013).

Les composés volatils intervenant dans les réponses de défense incluent des molécules de nature différentes ; terpénoïdes, dérivés volatils d'acides gras, des benzénoïdes, des phénylpropanoïdes ou des dérivés d'acides aminés volatils (Figure 12). Par exemple, le MeSA ou des monoterpènes tels que le pinène ou camphène participent à l'activation de la réponse systémique acquise (SAR) en réponse à l'infestation de *M. euphorbiae* sur la tomate (Digilio *et al.*, 2012). Un traitement au cis-jasmonate a par ailleurs affecté la croissance et la reproduction de *M. euphorbiae* sur pomme de terre (Sobhy *et al.*, 2020). Chez le chou infesté par *M. persicae*, plus de 27 COVs ont été détectés, incluant l'hexenal, l'(E)- $\beta$ -farnésène, le 1,8-cineole, l' $\gamma$ -terpinène ou encore l' $\alpha$ -caryophyllène (Ahmed *et al.*, 2019). Ce dernier est d'ailleurs un composé chimique important qui peut, en fonction de ses niveaux d'émission, repousser ou attirer les herbivores et améliorer le recrutement de prédateur pour la lutte biologique (Kos *et al.*, 2013).

Dans le cas de l'attraction des parasitoïdes, des études ont démontré que certains d'entre eux pouvaient détecter leur hôte sur les plantes *via* la reconnaissance de cocktails d'HIPV spécifiques émis par la plante.

Ainsi, le parasitoïde *Aphidius rhopalosiphi* peut reconnaître des odeurs de cultivar de blé sur lequel ses pucerons hôtes *Metopolophium dirhodum* se sont nourris et développés (Van Emden *et al.*, 1996). De même, Du *et al.* (1998) ont montré qu'en fonction de l'espèce de puceron colonisateur (*A. pisum* et *A. fabae*), *V. faba* émet un cocktail d'HIPV de composition différente. Ainsi, l'analyse GC a montré que l'alimentation d'*A. pisum* sur *V. faba*, contrairement à celle de *A. fabae* induit l'émission de 6-méthyl-5-heptène-2-one et d'acide gérannique, particulièrement attractif pour le parasitoïde *Aphidius ervi*.

Cependant, ces mécanismes de défenses indirectes basés sur la communication de la plante avec son environnement par les COVs suffisent rarement à éradiquer l'ensemble des colonies de pucerons et ont généralement un périmètre d'action restreint. En parallèle les plantes possèdent d'autres mécanismes basés sur la synthèse de composés aphicides endogènes ou sur des variations de la valeur nutritionnelle de la sève élaborée.

#### 2.2.4.2. Défenses directes

##### 2.2.4.2.1. Changement de la qualité nutritionnelle de l'hôte

#### **Equilibre des acides aminés**

Les acides aminés sont des nutriments majeurs et une source d'azote importante pour les pucerons. Chez la plante, des modifications de la composition en acides aminés et le changement de ratio C/N peuvent contribuer à la résistance aux pucerons en réduisant à la fois la qualité nutritionnelle de l'hôte et son appétence (Febvay *et al.*, 1988; Rahbé *et al.*, 1988; Sandström et Pettersson, 1994; Ponder *et al.*, 2000; Karley *et al.*, 2002).

Chez un génotype de *Pisum sativum* sensible à *A. fabae*, la concentration de 10 acides aminés, incluant l'asparagine (Asn) et l'aspartate (Asp) est significativement plus élevée par rapport aux génotypes résistants (Holt et Wratten, 2011). Dans le cas de la résistance du soja à *Aphis glycines* contrôlée par *Rag1*, des niveaux inférieurs d'Asn pourraient contribuer aux mécanismes de résistance (Chiozza *et al.*, 2010). De plus, les performances de *A. glycines* sont limitées sur un milieu contenant des concentrations d'Asn, d'Asp, glutamate (Glu), glutamine (Gln), glycine (Gly) et Valine (Val) réduites démontrant l'importance de ces acides aminés dans le développement des colonies de pucerons (Wille et Hartman, 2008).

Toutefois, certaines espèces végétales sont capables de modifier l'équilibre en acides aminés en fonction de l'intensité de l'infestation. Florencio-Ortiz *et al.*, (2018) ont détecté une accumulation d'un seul acide aminé, Gln, chez le poivron *C. annuum* en présence d'une faible densité de pucerons (20 individus *M. persicae*). Ce composé ainsi que l'activité de la Gln synthase (GS) sont également induits par l'infestation chez la pomme de terre (Karley *et al.*, 2002). La Gln étant un composé majeur de transport de l'azote, cette variation serait le résultat d'une remobilisation des pools d'azote hors de la zone infestée. En revanche, en présence d'une population de pucerons 10 fois supérieure, une augmentation importante de la teneur en acides aminés libres a été mesurée, en particulier les acides aminés aromatiques ; Phe, Tyr, Trp, principaux précurseurs de métabolites secondaires de défense (glucosinolates, camalexine, composés phénoliques) et les acides aminés à chaîne ramifiée ; Val, Ile et Leu. Parmi eux, Ile a été associé aux réponses de défense d'*Arabidopsis* et d'autres espèces horticoles contre *B. cinerea* en induisant la signalisation liée au jasmonate (Li *et al.*, 2021b).

Plusieurs études admettent la possibilité que la variation des teneurs en acides aminés observée dans les plantes infestées peut être le résultat d'une manipulation adaptative par les pucerons, afin d'augmenter la qualité nutritionnelle de l'hôte (Giordanengo *et al.*, 2010). Néanmoins, la possibilité qu'il s'agisse d'une réponse liée au stress de l'infestation n'est pas à exclure puisque les acides aminés sont des précurseurs d'un panel important de métabolites ayant un rôle clé dans la défense ou la signalisation.

### ***Variation de la pression osmotique au sein du phloème***

La stratégie nutritionnelle des pucerons est caractérisée par une ingestion d'importants volumes de sève qui est régulée afin d'alléger la pression osmotique induite par la succion. Certaines plantes sont capables d'exploiter cette contrainte subie par le puceron en accumulant des teneurs élevées en saccharose dans le phloème, provoquant ainsi une forte osmolarité de la sève phloémienne. En ce sens, l'infestation par *M. persicae* entraîne une augmentation des teneurs en saccharose dans les premières heures suivant l'infestation qui s'accompagne d'une surexpression des gènes impliqués dans la signalisation des sucres et la répartition des ressources (Singh *et al.*, 2011).

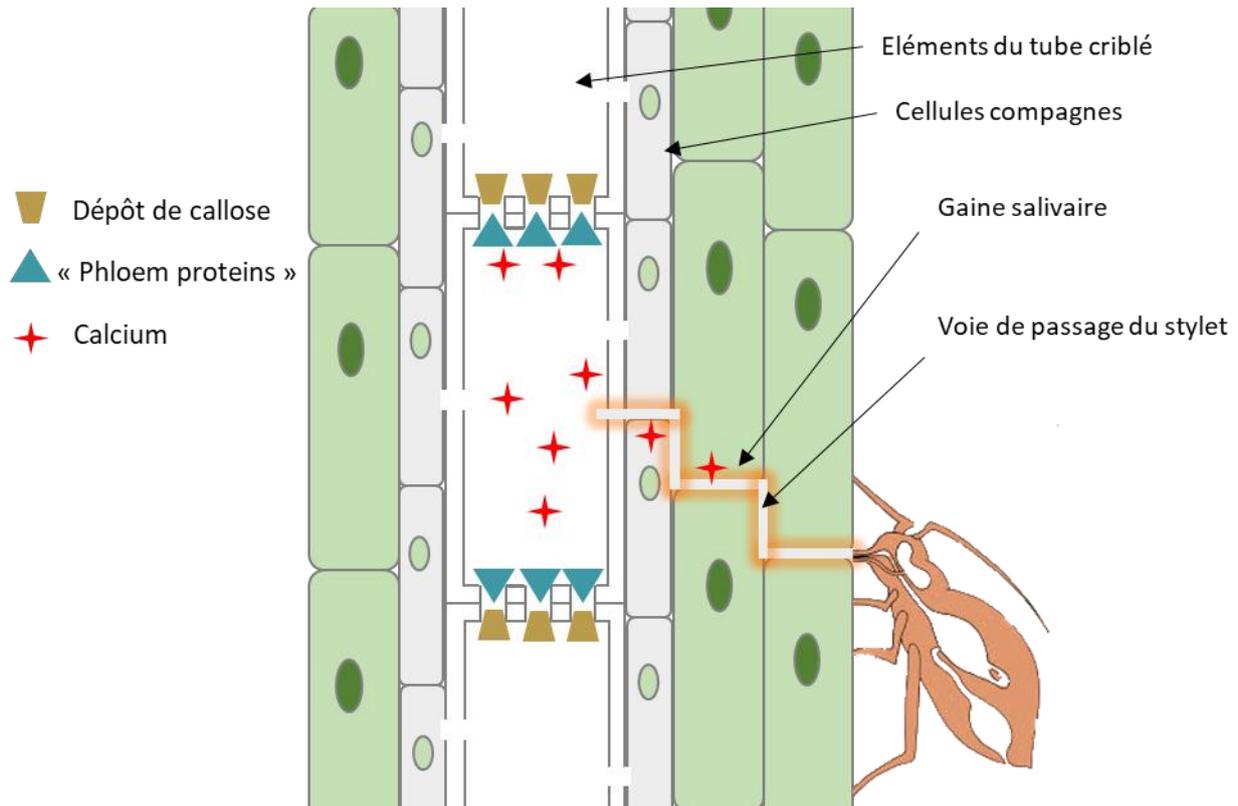


Figure 13 : **Mécanisme d'occlusion du phloème en présence d'un insecte piqueur suceur** (schéma adapté de Jiang et al., 2019). L'insecte piqueur suceur est représenté avec son stylet perçant le tissu végétal afin d'atteindre une cellule criblée du phloème par les espaces intercellulaires (apoplaste). Lors de son trajet l'insecte sécrète une salive gélifiante qui forme une gaine autour du stylet et facilite l'accès au phloème. Le passage du stylet et la pénétration dans la cellule criblée induit des variations au niveau du calcium qui déclenche le dépôt de callose et la formation de bouchon de protéines via les agrégats formés par les « Phloem protein » pour obstruer les vaisseaux phloémiens.

En réponse, les pucerons dépensent de l'énergie pour excréter des sucrares capables de dégrader le saccharose en glucose et fructose puis pourrait polymériser le glucose en oligosaccharides de faible pression osmotique par unité d'hexose (Karley *et al.*, 2005). Pourtant, Douglas *et al.*, (2006) ont décrit le saccharose comme le principal stimulant alimentaire du phloème pour le puceron et l'extinction du transporteur de saccharose StSUT1 chez la pomme de terre réduit la performance des pucerons sur les plants transformés (Pescod *et al.*, 2007). De même, Morkunas *et al.*, (2016) a indiqué que les réactions de défense de *P. sativum* vis-à-vis de *A. pisum* s'accompagnent d'une diminution du taux de saccharose dans les quelques heures suivant l'infestation au profit d'une accumulation de flavonoïdes et d'une surexpression de la Chalcone synthase (CHS) et Isoflavone synthase (IFS).

De surcroît, la teneur en saccharose dans le phloème est influencée par l'expression de *TPS11* qui code pour une protéine catalysant la synthèse de tréhalose. Bien que le tréhalose ait un rôle majeur dans le stockage du carbone et l'osmorégulation chez le puceron (Moriwaki *et al.*, 2003), son accumulation dans la plante peut favoriser le flux de carbone du saccharose vers l'amidon et ainsi réduire la stimulation alimentaire médiée par le saccharose et l'accès à une source de carbone pour l'insecte (Singh *et al.*, 2011). Il semblerait donc qu'un niveau optimal de saccharose soit nécessaire aux pucerons pour faciliter leur nutrition et que certaines plantes utilisent cette particularité comme mécanisme de défense (Auclair, 1967; Singh *et al.*, 2011).

#### 2.2.4.2.2. Occlusion du phloème

Les nutriments contenus dans la sève élaborée sont la principale cible des insectes piqueurs suceurs, qui ont développé des pièces buccales adaptées pour atteindre le phloème et prélever son contenu. Pour limiter la perte de nutriments, les plantes mettent en place certaines défenses physiques basées principalement sur le dépôt de callose pour déclencher une constriction locale des tubes criblés (Will *et al.*, 2013). Cet évènement est induit par les variations du niveau de  $Ca^{2+}$  lors de la piqûre (Furch *et al.*, 2007) et est généralement couplé à un colmatage protéique faisant intervenir les « Phloem proteins » (P-proteins). Lorsque le tube criblé est endommagé, ces protéines s'accumulent dans le cytoplasme sous forme de corps protéiques et se dispersent progressivement en formant des agrégats qui bouchent les pores de la paroi criblée (Kehr, 2006; Medina-Ortega et Walker, 2015) (Figure 13).

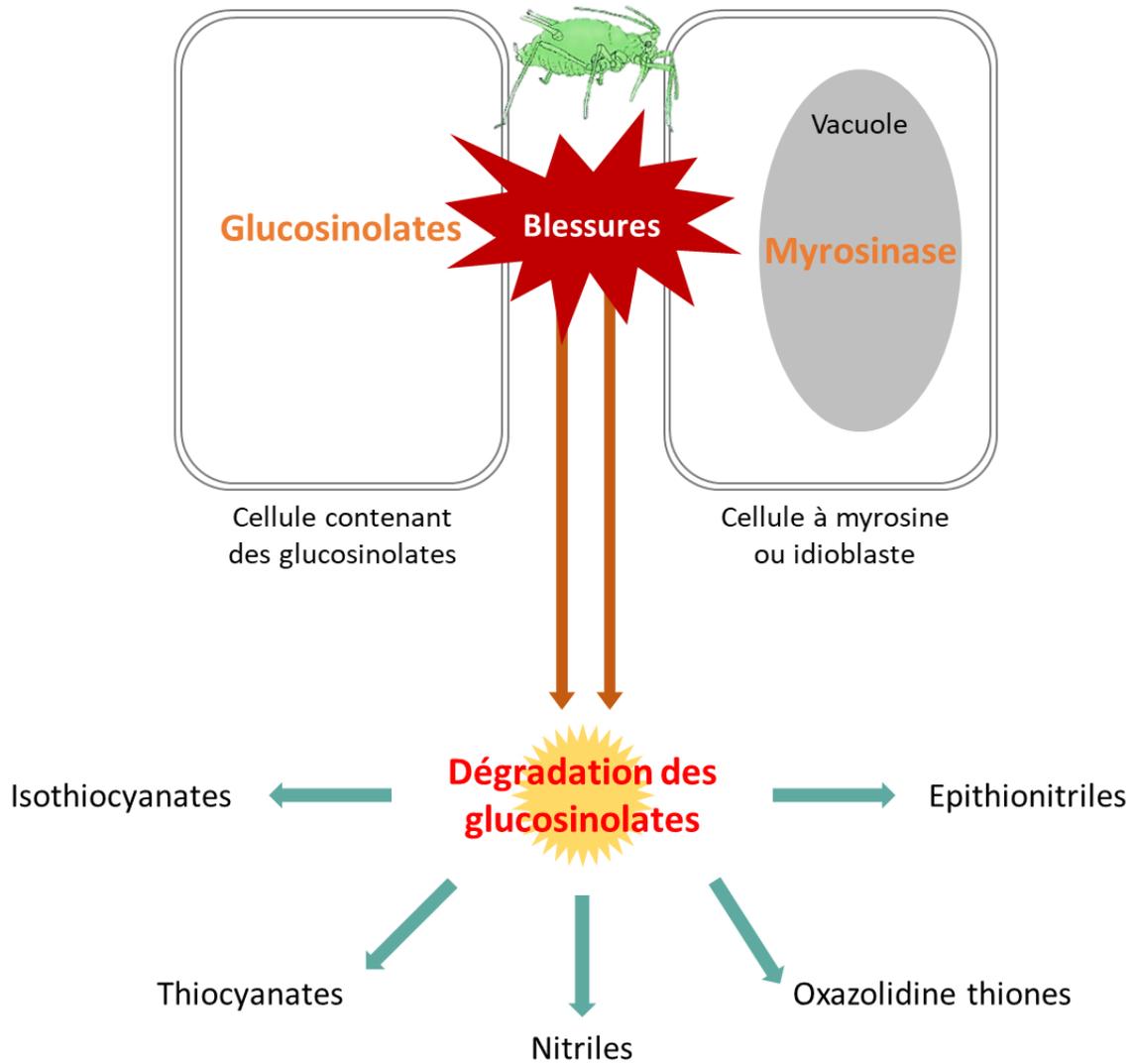


Figure 14 : **Production des composés toxiques issus des glucosinolates en réponse à l'herbivorie** (adapté de Ahuja et al., 2010). La blessure liée à la piqûre du puceron provoque une rupture des tissus végétaux. Les cellules endommagées vont se vider de leur contenu cellulaire et permettre aux glucosinolates et leur enzyme de dégradation ; la myrosinase, de rentrer en contact. La myrosinase va hydrolyser les glucosinolates ce qui conduit à la production des composés toxiques ; isothiocyanates, thiocyanates, nitriles, oxazolidine thiones, epithionitriles.

Plusieurs études ont relaté la mise en place de ce phénomène en réponse à l'infestation par les pucerons. Ainsi, chez *Arabidopsis*, *B. brassicae* (puceron cendré du chou) induit la surexpression du gène codant la « CALLOSE SYNTHASE » (*CALS1*) 24h et 48h après le premier contact (Kuśnierczyk *et al.*, 2008). De même, chez un cultivar d'orge, hôte de *Diuraphis noxia*, Saheed *et al.*, (2009) ont mesuré une accumulation de callose dans les 24h suivant l'infestation qui progresse jusqu'à 14 jours. Au contraire, des lignées d'orge ayant des niveaux plus élevés de transcrits de  $\beta$ -1,3-glucanases, l'enzyme de dégradation de la callose, sont plus sensibles à *Rhopalosiphum padi* (Mehrabi, 2016). Enfin, dans le modèle melon/*A. gossypii*, Peng et Walker, (2020) ont prouvé que l'occlusion des tubes criblés était un mécanisme de résistance. L'examen par microscopie confocale à balayage laser des tubes criblés a démontré que 96% des cellules du phloème perforées par *A. gossypii* étaient occluses chez le génotype résistant contre seulement 28% chez le sensible. De plus, un traitement au lanthane de la plante résistante, qui inhibe l'occlusion provoquée par l'agrégation des « Phloem proteins » rétablit la faculté des pucerons à se nourrir (Peng et Walker, 2020). Ces éléments prouvent donc que les mécanismes responsables de l'occlusion du phloème sont des facteurs de défense intrinsèques de l'interaction plante/pucerons.

#### 2.2.4.2.3. Défenses constitutives (phytoanticipines) et défenses induites (phytoalexines)

L'une des stratégies des plantes pour répondre efficacement à une agression est de synthétiser des composés de défense de manière constitutive en prévision d'une menace ; les phytoanticipines (VanEtten *et al.*, 1994). Afin de contourner le problème de toxicité liée à l'accumulation de ces composés, certaines phytoanticipines se trouvent dans des compartiments cellulaires différents de leur enzyme d'activation et sont sous formes inactives. Les glucosinolates sont la meilleure illustration de ce mécanisme (Singh, 2017). Ces composés, caractéristiques des brassicacées, s'accumulent dans les cellules spécialisées alors que leur enzyme d'activation ; les myrosinases, sont localisées dans les vacuoles des cellules voisines (Yactayo-Chang *et al.*, 2020). La rupture du tissu végétal lors de l'herbivorie entraîne le clivage des glucosinolates par les myrosinases et conduit à la production de composés toxiques incluant les isothiocyanates, thiocyanates, nitriles et épithionitriles (Singh, 2017) (Figure 14).

Ainsi, lorsque *M. persicae* se nourrit sur *A. thaliana*, la production du glucosinolate 4-méthoxyindol-3-ylméthylglucosinolate est induite (Kim et Jander, 2007), de même que l'expression de *IQD1* qui augmente les niveaux totaux de glucosinolates (Levy *et al.*, 2005). En outre, la prolifération de *M. persicae* et *B. brassicae* sur *Arabidopsis* est négativement corrélée à la teneur en glucosinolates indoliques et à leurs produits de dégradation (Kim et Jander, 2007; Kim *et al.*, 2008).

Les composés cyanogéniques, présents à des concentrations importantes dans les pêchers (Sauge *et al.*, 2010) fonctionnent sur la même base que les glucosinolates et sont activés lors de la destruction des cellules par le contact avec la glycosidase (Zagrobelny *et al.*, 2004). Leur implication dans la défense contre l'herbivorie a été démontré (Zagrobelny *et al.*, 2004) mais aucune étude ne mentionne clairement leur effet contre les pucerons. En revanche, d'autres phytoanticipines, fonctionnant sur le même principe ont été associés à la défense contre les pucerons. C'est le cas de la dhurrin chez le Sorgo contre *S. graminum* (Dreyer *et al.*, 1981) ou des benzoxazinoïdes comme 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) chez le maïs en réponse à *R. padi* (Ahmad *et al.*, 2011).

Par ailleurs, quelques pucerons tirent profit de cette synthèse constitutive en séquestrant les phytoanticipines pour se protéger de leur prédateur. Par exemple, *B. brassicae* est spécialisé dans la séquestration des glucosinolates qu'il utilise contre la syrphie *Episyrphus balteatus* (Kos *et al.*, 2012). Kazana *et al.*, (2007) ont montré qu'ils sont capables de produire la myrosinase afin d'hydrolyser certains glucosinolates comme la sinigrine ou la glucotropaéoline qu'ils prélèvent sur leur plante hôte et stockent dans leur hémolymphe. Ce stockage augmente tout au long du développement des adultes aptères et impacte négativement la survie des prédateurs comme les larves de coccinelles *Adalia bipunctata*.

D'autres mécanismes impliquant les phytoanticipines consistent à les stocker dans des structures particulières ou à les excréter à la surface de la plante. Ainsi, les mélanges complexes de composés toxiques constituant les huiles essentielles sont stockées dans les trichomes glandulaires, structures fragiles pouvant se décrocher et libérer son contenu au moindre contact avec l'insecte (Levin, 1973). Cho *et al.*, (2017) ont montré que les trichomes glandulaires jouent un rôle important dans la résistance de *Solanum tuberosum* à *M. euphorbiae*.

De plus, l'extinction du gène *NtCycB2* chez le tabac, qui régule négativement l'initiation des trichomes glandulaires à longue tige, a favorisé la production d'exsudats de trichomes et contribué à la résistance de la plante aux pucerons (Wang *et al.*, 2022).

Néanmoins, la synthèse constitutive de ces composés de défense et leur stockage est un processus qui occasionne des coûts énergétiques importants lorsque les plantes ne sont pas menacées (Bekaert *et al.*, 2012). Les mécanismes de résistance font donc fréquemment appel à la synthèse induite de composés de défense.

Les phytoalexines constituent un groupe hétérogène de substances appartenant à diverses classes de métabolites secondaires ; composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes (Ahuja *et al.*, 2012) et ne sont donc pas chimiquement différentes des phytoanticipines. La seule distinction réside dans la manière dont ces composés sont produits. Contrairement aux phytoanticipines, les phytoalexines sont synthétisées par la plante suite à la perception d'un stress biotique et s'accumulent généralement près du site d'infection (VanEtten *et al.*, 1994).

Chez le pois (*P. sativum*), un premier exemple de phytoalexine induite en réponse à un insecte a été identifié : la pisatine. L'éliciteur Bruchin B du charançon du pois (*Bruchus pisorum*), insecte xylophage, induit un cytochrome P450 isoflavone synthase (CYP93C18) qui entraîne l'accumulation de ce composé détectable 16 h après l'élicitation (Cooper *et al.*, 2005). De même, la glycéolline est accumulée chez le soja en réponse à plusieurs insectes ; *Diabrotica undecimpunctata*, *Epilachna varivestis* et *Pseudoplusia includens* et affecte négativement leur alimentation (Hart *et al.*, 1983; Fischer *et al.*, 1990). Cependant, il semblerait que son efficacité soit dépendante du stade de développement des insectes, au moins chez *Pseudoplusia includens* pour qui la glycéolline n'a pas eu d'effet sur les larves de 6ème stade (Hart *et al.*, 1983).

Dans le cas des insectes phloémophages, Kettles *et al.*, (2013) ont démontré que l'infestation d'*Arabidopsis* par *M. persicae* et *B. brassicae* induit la surexpression du gène PHYTOALEXIN DEFICIENT 3 (*PAD3*) qui catalyse la dernière étape de biosynthèse de la camalexine, phytoalexine prédominante d'*Arabidopsis* (Kettles *et al.*, 2013). Ce composé, initialement décrit comme composé antimicrobien chez *Arabidopsis*, a également un effet aphicide contre ces pucerons.

Par conséquent, lorsque *M. persicae* est confronté à un régime alimentaire artificiel contenant de la camalexine, son taux de reproduction est significativement réduit (Kettles *et al.*, 2013).

Finalement, grâce aux avancées technologiques de ces dernières années, les recherches sur l'activité biologique et la structure de certaines phytoalexines ont été complétées par l'élucidation de leurs voies de biosynthèse et de leurs mécanismes de régulation ce qui a apporté un engouement nouveau autour de ces composés. Ces progrès ont notamment permis d'exploiter les outils de biologie moléculaire comme la manipulation génétique pour tenter d'augmenter la résistance des plantes à travers, par exemple, l'incorporation de régulateurs transcriptionnelles favorisant l'accumulation de phytoalexines au sein des plantes (Jeandet *et al.*, 2013).

#### 2.2.4.2.4. Différentes classes de métabolites actifs contre les pucerons

##### 2.2.4.2.4.1. Alcaloïdes aphicides

Chez les plantes, les alcaloïdes ont des fonctions diverses en tant que réservoir d'azote, de régulateur de croissance et de composés de défense, en particulier contre les herbivores. Certains alcaloïdes ont des propriétés anti-appétantes, peuvent altérer l'activité des protéines des herbivores après ingestion ou encore perturber le système nerveux des herbivores (Matsuura et Fett-Neto, 2015). Chez le Lupin, il existe une corrélation positive entre la quantité relative d'alcaloïdes totaux et le niveau de résistance de la plante à *Aphis craccivora* (Ridsdill-Smith *et al.*, 2004). De plus, la gramine qui est le principal alcaloïde du lupin et de l'orge est fortement toxique pour *R. padi* (Zuñiga et Corcuera, 1986) et peut être utilisée comme prédicteur de la résistance lors du screening des descendances F2 de lupin issus d'un croisement résistant/sensible (Adhikari *et al.*, 2012). Plus récemment, Yan *et al.*, (2018) ont démontré l'effet aphicide *in vivo* et *in vitro* sur *Aphis spireacola* de 9 alcaloïdes de types isoquinoléiques isolés chez l'*Amaryllis Lycoris radiata*.

Cependant, certains alcaloïdes, lorsqu'ils sont conjugués à un glucoside pour former des glycoalcaloïdes, ont un effet bénéfique sur des pucerons. C'est le cas de la solasonine chez la pomme de terre qui stimule la reproduction de *M. euphorbiae* alors que les aglycones sont répulsifs voire délétères pour l'insecte (Güntner *et al.*, 2000).

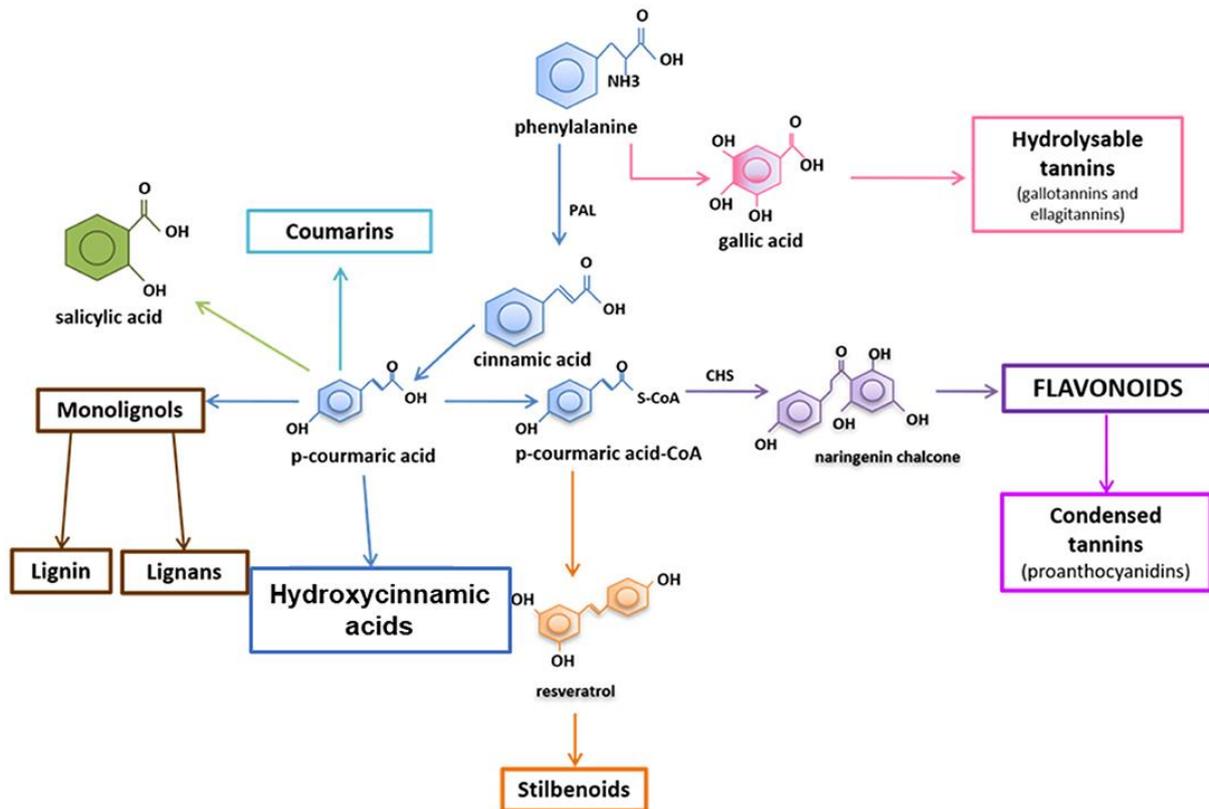


Figure 15 : Représentation simplifiée des principales sous classes de composés phénoliques. (Wallis and Galarnau, 2020)

Cette différence pourrait être induite par le caractère plus ou moins apolaire des aglycones dont l'absorption par les intestins serait inévitable. Ils pourraient néanmoins offrir un avantage défensif contre certains parasites en s'accumulant à de faibles concentrations dans le corps des pucerons. En revanche, les glycoalcaloïdes, plus polaires, sont principalement excrétés dans le miellat (Züst et Agrawal, 2016).

#### 2.2.4.2.4.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent des composés non azotés présentant des cycles aromatiques incluant les flavonoïdes, les coumarines, les acides hydroxycinnamiques ou les lignines (Figure 15). Ils sont régulièrement associés aux mécanismes de résistance en tant que molécules antimicrobiennes, molécules de signalisation de la défense ou barrières physiques (Dixon *et al.*, 2002; Treutter, 2006). De manière intéressante, Wallis et Galarneau, (2020) ont démontré que l'augmentation des niveaux de composés phénoliques était une réponse commune à de nombreux pathosystèmes (bactéries, champignons, insectes). Cependant, les méta-analyses réalisées dans cette étude ont mis en évidence une réponse différente de ces composés dans des cas spécifiques, qui pourrait être imputée au mode de vie fongique (biotrophes/nécrotrophes) ou même à l'alimentation des insectes (broyeurs/piqueurs suceurs).

#### *L'activité de la Phénylalanine ammonia lyase (PAL) comme marqueur de la défense*

La biosynthèse des phénylpropanoïdes puis des flavonoïdes est basée sur la désamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia lyase (PAL) qui conduit à la formation de l'acide *trans*-cinnamique. La PAL est régulièrement décrite comme marqueur de l'activation des défenses en réponse à de nombreux agresseurs ; bactéries, virus, champignons, herbivores et serait liée à la signalisation de SA qui dérive de l'acide *p*-cinnamique (Usha Rani et Jyothsna, 2010 Duan *et al.*, 2014; Kim et Hwang, 2014). Une augmentation significative et croissante de l'activité de la PAL a par exemple été mesurée dans les tissus foliaires du pois confrontés à *A. pisum* (Mai *et al.*, 2014). De plus, cette augmentation était proportionnelle à la taille de la population de puceron et corrélée au niveau de phénols totaux dans les plantes (Mai *et al.*, 2014).

En analysant la réponse à l'infestation de 2 géotypes de blé différant par leur niveau de résistance à *R. padi* L., Xu *et al.*, (2021b) ont mis en évidence des niveaux d'activité de la PAL et de la tyrosine ammonia-lyase (TAL) plus élevés chez le géotype résistant, de même que les teneurs en composés phénoliques totaux. La résistance aux pucerons serait donc directement liée à la capacité du géotype à maintenir une forte activité enzymatique et à synthétiser davantage de polyphénols.

#### *Synthèse de quinones*

Les phénylpropanoïdes apportent également un pouvoir antioxydant supplémentaire à la plante pouvant être déterminant dans le contrôle du stress oxydatif provoqué par une piqûre d'insecte (Leváková et Lacko-Bartosova, 2017). De fait, certains mécanismes de défense de la plante sont basés sur l'oxydation des phénols en quinones catalysée par la polyphénol oxydase (PPO) et génératrice de ROS. En raison de leur toxicité, les quinones formées peuvent agir directement sur les herbivores lorsqu'elles sont absorbées ou réduire la qualité nutritionnelle de la plante en alkylant des acides aminés (Duffey et Stout, 1996). Enfin, cette réaction peut conduire au brunissement des feuilles parfois observé au niveau des sites d'infection. Plusieurs études ont relevé un renforcement significatif de l'activité de la PPO en réponse à l'infestation (He *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2017). La puissance de cette activité semble liée au niveau de résistance de la plante. Par exemple, les cultivars « Keiun » et « Han6 » de Chrysanthème présentaient une activité PPO trois fois plus importante que le cultivar sensible après 24 h d'infestation (He *et al.*, 2011). Une observation similaire a été notée sur des géotypes de blé tendre (Kaur *et al.*, 2017).

#### *Les acides hydroxycinnamiques (HCAs)*

Les HCAs peuvent se lier de manière covalente à la paroi cellulaire et sont donc des composés impliqués dans l'intégrité et la défense de la paroi (Faulds et Williamson, 1999). Par exemple, chez le blé de la lignée résistante quasi isogénique (NIL), les acides hydroxycinnamiques conjugués à des amines (HCAA) tels que la coumaroylputrescine, la feruloylputrescine, la cinnamoyltyramine, la feruloylagmatine ou encore la feruloylsérotonine augmentent l'épaisseur de la paroi cellulaire ce qui limite l'infection de *Fusarium graminearum* (Gunnaiyah *et al.*, 2012).

D'autres HCAs ou HCAAs sont accumulés dans les vacuoles ou cytoplasme et participent aux réponses de défense des plantes (Macoy *et al.*, 2015). L'acide chlorogénique (5-CQ) est probablement l'un des polyphénols les plus étudiés pour son activité défensive au sein des plantes. Lors d'un épisode d'herbivorie, de nombreuses études ont recensé l'accumulation de ce composé (Kundu et Vadassery, 2019). Ainsi, chez *N. attenuata*, les blessures provoquées par le foreur de tige *Tricobaris mucorea* ont augmenté les teneurs en acide chlorogénique dans la tige, principalement au niveau de la moëlle et des faisceaux vasculaires (Lee *et al.*, 2021). Une accumulation de 5-CQ a également été rapportée dans l'interaction pommier/puceron cendré (*Dysaphis plantaginea*) (Berrueta *et al.*, 2018). Cependant, dans ce système, la réaction d'isomérisation et donc les ratios entre acide néochlorogénique (3-CQA)/acide cryptochlorogénique (4-CQA) /acide 5-*p*-coumaroylquinique (5-*p*-CoQA)/ acide 4-*p*-coumaroylquinique (4-*p*-CoQA) semble être une étape métabolique clé dans la mise en place de la résistance. Ainsi, le 4-CQA serait la forme prépondérante chez le cultivar de pommier résistant à *D. plantaginea* (Berrueta *et al.*, 2018).

Enfin, chez le noisetier, des analyses chromatographiques des feuilles ont mis en évidence une corrélation entre la réduction du taux d'infestation de *Myzocallis coryli* Goetzee et l'augmentation significative des concentrations en 5-CQ et d'autres HCAs ; acides gallique, férulique, caféique ainsi que des acides protocatéchique et *p*-hydroxybenzoïque (Gantner *et al.*, 2019).

#### *Les flavonoïdes*

Les flavonoïdes possèdent des activités biologiques leur permettant d'agir en tant qu'agents répulsifs et toxiques alors que d'autres flavonoïdes agissent sur les sensilles gustatives et réponses neuronales de l'insecte pour réduire l'alimentation ou l'oviposition (Simmonds, 2001; Treutter, 2006). Des études basées sur des tests d'alimentation *in vitro* ont rapporté que certains insectes étaient sensibles à des flavonoïdes spécifiques (Simmonds, 2001). Par exemple, les traitements de feuilles de soja par l'apigénine, la daïdzéine et le kaempférol ont réduit la durée des phases d'ingestion de la sève et rendu plus difficile l'accès au phloème pour *A. pisum* (Stec *et al.*, 2021).

De même, l'ajout de lutéoline et génistéine au régime alimentaire d'*A. pisum* à des concentrations élevées ( $\geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  pour la lutéoline et  $\geq 1,000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  pour la génistéine) a provoqué l'arrêt complet de la salivation et ingestion passive (Goławska et Łukasik, 2012). Enfin chez le sorgho, la résistance à *Rhopalosiphum maidis* (puceron des feuilles de maïs) a été associée à la présence d'allèles fonctionnels du facteur de transcription  $\gamma 1$  de type MYB. Ce facteur induit l'accumulation des 3-déoxyflavonoïdes et des 3-déoxyanthocyanidines lors de l'infestation qui se traduit par une colonisation réduite par rapport aux plantes dépourvues de l'allèle fonctionnel  $\gamma 1$  et une mortalité plus importante des pucerons (Kariyat *et al.*, 2019).

Enfin, dans certains cas la teneur en flavonoïdes peut également être associée au caractère de résistance. Chez le niébé, des analyses HPLC ont mis en évidence une quantité de flavonoïdes glycosydés supérieure dans les lignées résistantes à *A. fabae* et *A. craccivora*. Ces flavonoïdes sont principalement représentés par les formes dérivées de l'isorhamnétine et de la quercétine (Lattanzio *et al.*, 2000). Des phytoalexines telles que la rutine ou la taxifoline peuvent inhiber l'activité des glutathion S-transférases qui sont des enzymes capables de métaboliser et détoxifier les pesticides au sein des insectes (Enayati *et al.*, 2005). Ces deux molécules peuvent donc réduire voire supprimer la résistance des insectes aux pesticides.

#### *Les lignines*

La synthèse et accumulation de lignines, polymères de haut poids moléculaire formés à partir d'unités dérivées de l'acide cinnamique, peuvent également influencer l'interaction plante/puceron. De fait, une lignée mutante d'*Arabidopsis* (F5H-OE) altérée dans la teneur et la composition en lignine a montré une sensibilité accrue à *M. persicae* se traduisant par une augmentation significative du nombre de larves par rapport à la lignée sauvage (Gallego-Giraldo *et al.*, 2018). Dans le cas de l'infestation du chrysanthème par *Macrosiphoniella sanborni*, Wang *et al.*, (2017) ont noté une surexpression du facteur de transcription *CmMYB19* dans les feuilles qui s'accompagne d'une réduction de la multiplication des pucerons. Ce facteur de transcription participe à la signalisation conduisant à la surexpression des gènes de biosynthèse de la lignine *PAL*, *C4H*, *4CL* et *CCR*, confirmant ainsi la participation de la lignine aux mécanismes de résistance des plantes.

Tableau 1 : *Classification, propriétés et caractéristiques des « Pathogenesis related proteins »* (Extrait de Ali et al., 2018)

PR-Proteins	Gene Accession No.	Property/function	Source	Reference
PR1	Y00707	Antifungal	Nicotiana. tabacum	Antoniw et al. (1980)
PR2	M59443.1	$\beta$ -1,3-glucanases	N. tabacum	Antoniw et al. (1980)
PR3	X77111.1	Class I, II, IV, V, VI, VII Chitinases	N. tabacum	Van Loon (1982)
PR4	NW_015888419.1	Class I, II Chitinases	N. tabacum	Van Loon (1982)
PR5	NW_015793016	Thaumatococcus-like proteins	N. tabacum	Van Loon (1982)
PR6	NW_004196001.1	Proteinase inhibitor	Solanum lycopersicum	Green and Ryan(1972)
PR7	NC_015445.2	Endoproteinase	S. lycopersicum	Vera and Conejero (1988)
PR8	NC_026660.1	Class III Chitinase	Cucumis sativus	Metraux et al. (1988)
PR9	EC 1.11.1.7	Peroxidase	N. tabacum	Lagrimini et al. (1987)
PR10	NC_026940.1	Ribonuclease-like proteins	Petroselinum crispum	Somssich et al. (1986)
PR11	gi 899342	Class I Chitinase	N. tabacum	Melchers et al. (1994)
PR12	NC_025209.1	Defensin	Raphanus raphanistrum	Terras et al. (1995)
PR13	gi 1181531	Thionin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Epple et al. (1995)
PR14	gi 1045201	Lipid-transfer protein	Hordeum vulgare	Garcia-Olmedo et al. (1995)
PR15	gi 2266668	Oxalate oxidase	Hordeum vulgare	Zhang et al. (1995)
PR16	gi 1070358	Oxidase-like	H. vulgare	Wei et al. (1998)
PR17	-	Antifungal and antiviral	N. tabacum	Okushima et al. (2000)

#### 2.2.4.2.5. Protéines de défense (PR)

En dehors des métabolites secondaires, l'expression des gènes codant les protéines « Pathogenesis-related » (PR) est régulièrement induite par une attaque d'agents pathogènes ou herbivores. Ces protéines possèdent des activités antimicrobiennes *in vitro* par le biais d'activités hydrolytiques sur les parois cellulaires et d'une toxicité de contact et sont classées dans 17 familles, sur la base de leur homologie de séquence et de leur activité biologique (Tableau 1) (Edreva, 2005; van Loon *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2018). Leur induction dépend généralement des voies de signalisation des hormones de défense que sont le SA, le JA ou l'ET. Ainsi, PR-1, PR-2 et PR-5 sont des marqueurs de la voie du SA qui utilise le facteur de transcription NPR1 et cible davantage les agents pathogènes biotrophes. Au contraire, les PR-3, PR-4 et PR-12 (dont la défensine PDF1.2) sont induites par le JA/ET en réponse aux agents pathogènes nécrotrophes (Ali *et al.*, 2018). Dans le modèle *S. tuberosum/M. persicae*, la transcription de *PR-1* augmente progressivement en fonction du niveau d'infestation (Kerchev *et al.*, 2012). De même, sur *M. truncatula*, le puceron du pois *A. pisum* a entraîné une surexpression de *PR-5* dans les 3 premiers jours suivants l'infestation (Gao *et al.*, 2008).

Toutefois, malgré l'opposition qui existe entre les voies de signalisation JA et SA, Moran et Thompson, (2001) ont mis en évidence une forte induction de *PR-1*, *BGL2* (*PR-2*) mais aussi de *PDF1.2* chez *Arabidopsis* entre 72 h et 96 h après infestation de *M. persicae*. Ces résultats démontrent l'implication des 2 voies hormonales dans les réponses d'*Arabidopsis* aux pucerons et partagent des similarités avec les réponses observées lors d'une infection par la bactérie *P. syringae*.

### 2.3. Approches transcriptomiques et métabolomiques des interactions plantes/pucerons

Depuis deux décennies, des travaux utilisent la transcriptomique, métabolomique et protéomique pour étudier sans *a priori* les ARN transcrits, métabolites ou protéines et ainsi comprendre les dynamiques de réponses des plantes à différentes conditions environnementales, biotiques et abiotiques (Hirai *et al.*, 2004; Zogli *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021).

La revue de Zogli *et al.*, 2020 illustre au travers d'un résumé concis l'application de ces techniques omiques et l'apport de ces nouvelles technologies dans la compréhension des interactions entre les plantes et les insectes phloémophages.

Pour étudier le transcriptome, le séquençage de l'ARN (RNA-sequencing) réalisé à partir de fragments (Illumina) ou depuis peu en pleine longueur (Single-cell RNA-sequencing) est l'une des méthodes de séquençage à haut débit les plus puissantes qui permet l'analyse qualitative et quantitative de l'ensemble des gènes exprimés dans un échantillon donné. Cette méthode offre donc une vision globale de la dynamique du transcriptome puisqu'elle permet à la fois d'identifier le catalogue complet des transcrits avec les formes alternatives, de définir avec précision la structure des gènes et de mesurer les niveaux d'expression de ces gènes (Stark *et al.*, 2019).

Concernant le métabolome, plusieurs technologies et méthodologies basées (i) sur la séparation des composés par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (MS), comme la GC (chromatographie en phase gazeuse)-MS, la LC (chromatographie en phase liquide)-MS, la CE (électrophorèse capillaire)-MS ou (ii) sur la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) sont fréquemment utilisées pour étudier l'impact de stress biotiques et abiotiques sur les processus biochimiques au sein de la plante grâce à la détection et identification des métabolites (David et Rostkowski, 2020). La diversité chimique des molécules (polarité, polymère...) impose l'utilisation de méthodes d'extractions et chromatographiques spécifiques de certaines classes de composés, ce qui exclut la possibilité d'une analyse unique pour appréhender le métabolome. Plusieurs approches sont donc généralement combinées pour réaliser un profilage métabolique détaillé et identifier un maximum de composés dans un échantillon donné. Les analyses non ciblées permettent de mettre en évidence des marqueurs métaboliques associés à des modalités expérimentales choisies, qui sont ensuite identifiés dans la mesure du possible (Segers *et al.*, 2019 ; David et Rostkowski., 2020). Ces approches peuvent être complétées par des analyses ciblées de profilage métabolique sur des familles de composés d'intérêts qui requièrent des procédures analytiques spécifiques, telles que les phytohormones.

Dans le cas des interactions plantes/pucerons, il est prouvé que l'infestation implique une reprogrammation transcriptionnelle au sein de la plante. Ainsi, l'analyse de l'ensemble du transcriptome puis la classification des gènes par familles ou groupes fonctionnels *via* des méthodes d'enrichissement (Gene Ontology, Panther...) permet de dégager de manière exhaustive des grandes fonctions biologiques impliquées dans les réponses de défense et de résistance des plantes aux pucerons (Åhman *et al.*, 2019). Cette approche a par exemple été utilisée par Niu *et al.*, (2018) pour analyser la dynamique transcriptomique associée à la résistance du pêcher à *M. persicae* contrôlée par le gène *Rm3* entre 6 h et 72 h post infestation et a démontré une induction significative de groupes de gènes associés à des processus biologiques cruciaux de réponses aux stress tels que l'oxydoréduction, la phosphorylation des protéines, le catabolisme des composés organo-azotés mais aussi l'induction d'importantes familles de facteurs de transcription comme les WRKY et les facteurs MYB, essentiels aux processus de signalisation.

Sur le modèle d'interaction compatible *S. lycopersicum/M. euphorbiae*, l'analyse RNAseq a permis d'étudier la dynamique d'induction des gènes après 24 h, 48 h et 96 h d'infestation (Coppola *et al.*, 2013). D'une manière générale, ces données ont mis en évidence la surexpression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*RBOHD*, *GST*) ou encore dans la signalisation de SA (*NPR1*, *PR-1*, *PR-5*) alors que les gènes codants pour les enzymes impliquées dans l'activité photosynthétique (chaîne de transport d'électrons photosynthétique, protéines associées au complexe des photosystèmes I et II) étaient majoritairement réprimés. Cependant, les données de protéomiques obtenues en parallèle n'ont trouvé correspondance qu'avec les données transcriptomiques recueillies après 48 h d'infestation ce qui montre l'importance du décalage temporel entre la transcription d'un gène et sa traduction en protéine et l'intérêt de combiner ces deux approches omiques.

Sur *Arabidopsis*, plante modèle dans l'étude des interactions plante/pucerons, l'analyse transcriptomique des réponses à l'infestation des pucerons *M. persicae*, *Myzus cerasi* et *R. padi* a révélé des réponses communes à ces trois espèces, en particulier en ce qui concerne la biosynthèse des glucosinolates ou de certains acides aminés (Jaouannet *et al.*, 2015).

Cependant, cette comparaison a également mis en évidence de nouveaux marqueurs potentiels de la résistance non-hôte d'*Arabidopsis* contre *R. padi* tels que le gène codant pour la NADPH oxydase *AtRbohF* ou le gène *VSP1* (vegetative storage protein 1), qui n'auraient pas été mis en évidence sans une comparaison complète des modifications du transcriptome d'*Arabidopsis* après infestation des trois espèces de pucerons (Jaouannet *et al.*, 2015). De façon similaire, Foyer *et al.*, (2015) ont démontré une distinction dans l'induction des mécanismes de défense liés au métabolisme secondaire chez *Arabidopsis* après l'infestation du puceron généraliste *M. persicae* et du puceron spécialiste *B. brassicae*. Même si tous deux induisent des kinases réceptrices et de nombreux facteurs de transcription WRKY, seul *M. persicae* déclenche la diminution des transcrits codants pour les enzymes et protéines associées au métabolisme des glucosinolates.

De son côté, la métabolomique permet d'avoir une vision des produits finaux façonnés par l'induction des gènes en réponse à un stimulus. Même s'il s'agit d'une méthode non exhaustive, elle permet d'accéder à une autre dimension omique et fournit des informations précieuses sur les voies métaboliques induites dans des conditions d'expérimentations déterminées. Lors d'une infestation, la plante peut déclencher une cascade de signalisation, notamment par l'intermédiaire de phytohormones comme le SA et le JA, qui va induire une modification de son schéma métabolique pouvant affecter le comportement des pucerons (Morkunas *et al.*, 2011). Ces modifications impactent généralement le ratio C/N au sein de la plante et provoquent une réallocation des ressources vers la synthèse de métabolites de défenses (phytoalexines) (Schultz *et al.*, 2013). Tous ces changements métaboliques peuvent être mis en évidence et quantifiés par la combinaison de plusieurs techniques analytiques ciblés sur des familles de composés. Ainsi, par une approche non ciblée, Sanchez-Arcos *et al.*, (2019) ont montré que les variations des teneurs en flavonoïdes, saponines et acides aminés non protéinogènes étaient impliquées dans la spécificité des interactions entre différents clones de *A. pisum* et ses plantes hôtes *P. sativum*, *Medicago sativa* et *Trifolium pratense*. Il semblerait que seul le clone *A. pisum*, race hôte de *M. sativa*, soit capable de réguler à la baisse une saponine triperpénique putative, molécules régulièrement associées à la résistance des plantes aux herbivores.

De même, un flavonoïde glycosylé très abondant chez *M. sativa* a été induit uniquement par les races de *A. pisum* initialement collectées sur leur plante hôte native ce qui prouve que la spécificité de la performance des pucerons sur différentes plantes hôtes peut être liée à des différences chimiques au sein des plantes hôtes, induites après l'infestation.

Finalement, d'autres travaux ont choisi de combiner les approches transcriptomique et métabolomique pour étudier les réponses des plantes à l'infestation par les pucerons. C'est le cas de Gao *et al.*, (2021) qui ont utilisé le RNAseq et la LC-MS pour caractériser les gènes et métabolites impliqués dans la défense du rosier *Rosa longicuspis* contre *Macrosiphum rosivorum*. Ces méthodes analytiques couplées ont ainsi démontré l'implication de la voie métabolique du glutathion, de la synthèse de terpénoïdes, d'acides phénoliques et du métabolisme de l'amidon dans les réponses de défense du rosier, en plus des facteurs généralement induits par un stress biotique ; MAP kinases, facteurs de transcription MYB et ERF et gènes liés à la résistance (*RPM1*, *RbohA*, *RPP8*...).

Le développement de ces méthodes analytiques et des outils de bioinformatique a donc ouvert la porte au concept de biologie intégrative qui permet non seulement d'étudier l'expression de l'ensemble des gènes dans un échantillon donné mais également d'analyser les métabolites qui découlent de cette expression. Ceci offre de nouvelles perspectives dans la compréhension des réponses des plantes à leur environnement et dans la découverte de nouveaux marqueurs liés à ses réponses.

### 3. Le modèle Pêcher - puceron vert

#### 3.1. Le pêcher : *Prunus persica*

##### 3.1.1. Espèce modèle génomique des Rosacées

Les Rosacées regroupent diverses espèces végétales d'intérêts agronomique et ornemental. Le séquençage du génome de nombre de ces espèces a été effectué par diverses équipes et leur génome annoté est disponible sur la plateforme «Genome Database for Rosaceae» (GDR) (Jung *et al.*, 2019). Au sein du genre *Prunus*, qui regroupe de nombreuses espèces fruitières à noyau comme le pêcher, l'abricotier, l'amandier, les pruniers, les cerisiers, le génome du pêcher est le premier à avoir été séquençé à partir d'un haploïde doublé entièrement homozygote du cultivar «Lovell» (Verde *et al.*, 2013).

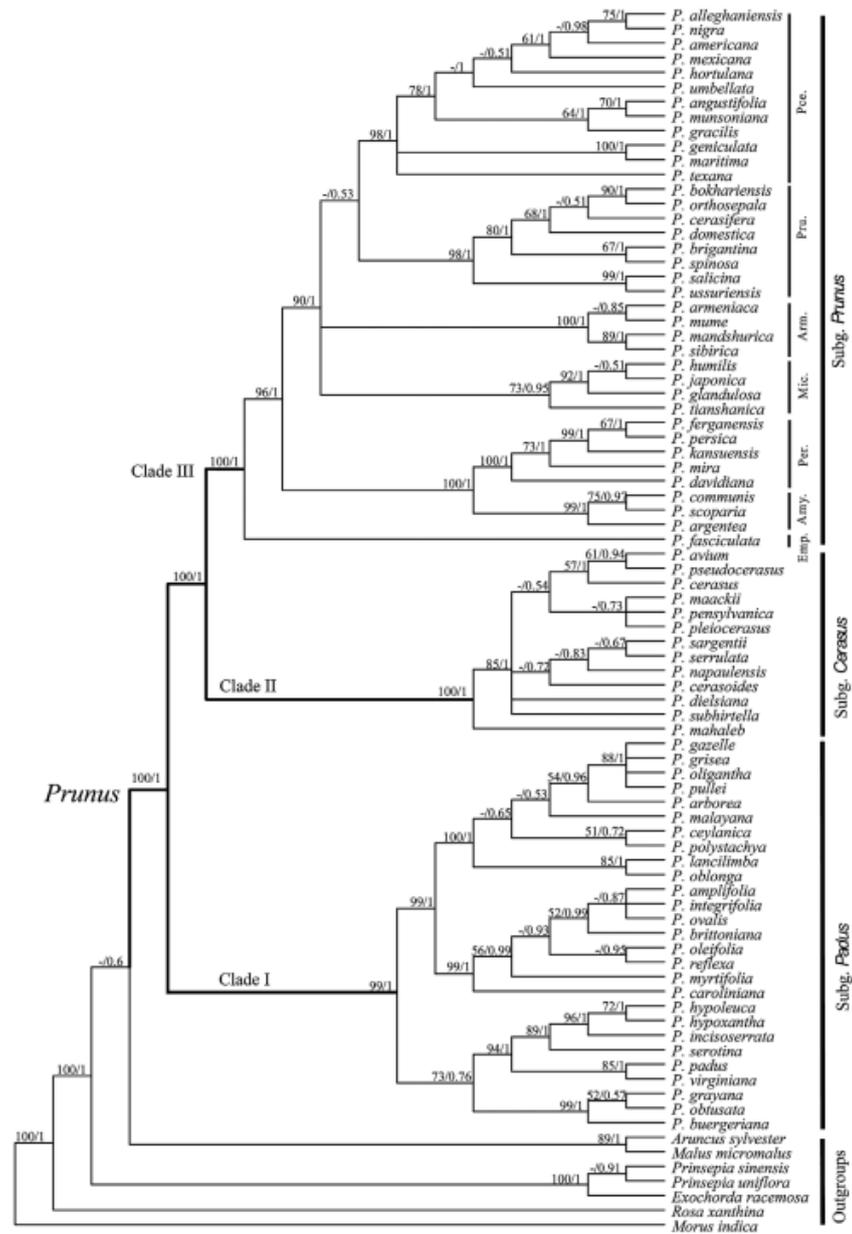


Figure 16 : Classification phylogénétique des espèces appartenant au genre *Prunus* (Shi et al., 2013)

La qualité de la séquence et de l'annotation de ce génome de référence a ensuite été améliorée (peach genome V2.0) et 26873 gènes codant pour des protéines ont été prédits (Verde *et al.*, 2017). Le pêcher est donc devenu un génome de référence pour les rosacées. De plus, aucune trace de duplication récente n'a été rapportée chez *P. persica* qui dispose donc d'un petit génome d'environ 265 Mb, ce qui fait de lui un modèle important pour les études évolutives.

### 3.1.2. Aspects agronomiques

Le pêcher compte parmi les espèces fruitières les plus importantes économiquement puisqu'il se place au 2ème rang mondial en termes de volume de production parmi les Rosacées fruitières (pommes, prunes, amandes, abricots, cerises...) avec 25 millions de tonnes (MT) de pêches et nectarines produites en 2017 derrière les 83 MT de pommes. La Chine est le 1<sup>er</sup> producteur mondial de pêche avec 14 MT/an alors que la France se place au 14<sup>ème</sup> rang mondial avec 0,207 MT derrière ses voisins européens l'Italie et l'Espagne (<https://www.fao.org/faostat/fr>). En France, cette culture est localisée principalement dans le bassin méditerranéen et occupe environ 9000 ha soit 5% de la surface totale des vergers français (<https://www.fao.org/faostat/fr>).

#### 3.1.2.1. Classification et cycle de développement

Le pêcher appartient au genre monophylétique *Prunus* regroupant plus de 200 espèces dont certaines sont cultivées pour leurs fruits. La classification phylogénétique selon Shi *et al.*, (2013) divise le genre *Prunus* en 3 clades majeurs: le sous-genre « *Amygdalus-Prunus* » incluant le pêcher, l'amandier, les pruniers, l'abricotier, le sous-genre « *Cerasus* » comprenant les cerisiers et le sous-genre « *Padus* » regroupant les espèces appartenant aux groupes *Laurocerasus* et *Padus* comme le merisier à grappes (*Prunus padus*) ou le laurier-palme (*Prunus laurocerasus*) (Figure 16).

*P. persica* est un arbre fruitier à croissance rapide pouvant atteindre jusqu'à 6 m de hauteur. Cet arbre a une durée de vie d'environ 20 ans avec une période juvénile de 2 à 3 ans. Dans les premières années, l'arbuste va former des rameaux et des feuilles en développant des bourgeons à bois.



Figure 17 : Dégâts provoqués par les agents pathogènes et ravageurs de *P. persica*

Au bout de 2 à 3 ans, le pêcher va initier son cycle de floraison qui débute par l'apparition des bourgeons floraux hivernaux qui vont s'épanouir au début du printemps, avant même l'apparition des feuilles. Le pêcher étant préférentiellement autogame, les fleurs vont aboutir à la formation de fruit de type drupe, les pêches, sans le concours de pollens étrangers. (Guihéneuf, 1998; Hilaire et Giaque, 2003).

### 3.1.2.2. Impact des stress biotiques sur la culture de pêcher

Cette culture est menacée par un large panel de bioagresseurs (Figure 17) ; *Taphrina deformans*, champignon responsable de la cloque du pêcher qui attaque les feuilles et réduit la photosynthèse ; *Cydia molesta*, lépidoptère aussi nommé tordeuse orientale qui détruit jeunes pousses et fruits ; *Monilia laxa* et *Monilia fructicola* qui peuvent faire chuter jusqu'à 90% des fleurs entraînant une perte de rendement importante et faire pourrir les fruits avant et après récolte (pourriture brune des fruits (brown rot)) (Society, 1995; Oliveira Lino *et al.*, 2016); ou encore le virus de la Sharka, *Plum Pox Potyvirus* provoquant des nécroses ou déformations des fruits et conduisant généralement à la destruction du verger contaminé (García *et al.*, 2014). Ce dernier est principalement véhiculé par des espèces différentes de pucerons qui visitent les vergers. Parmi celles-ci, *M. persicae* et *Myzus varians* sont les espèces les plus répandues chez le pêcher. En provoquant des dégâts directs par l'infestation et indirects par la transmission des virus, elles nécessitent un protocole de traitement phytosanitaire adapté (Kumar, 2019). Le pêcher est d'ailleurs un facteur essentiel dans le maintien des populations de *M. persicae* puisqu'il est son hôte primaire, c'est-à-dire l'hôte sur lequel elle effectue sa reproduction sexuée et dépose son œuf d'hiver.

La diversité de pression des ravageurs et maladies sur cette culture la place d'ailleurs en seconde position des cultures fruitières les plus traitées en France avec 21 traitements par saison contre seulement 13 sur les abricots (Penvern *et al.*, 2010). Les fongicides et bactéricides représentent 60% des traitements réalisés, les 40% restants étant répartis entre les herbicides, acaricides et insecticides (Cretin et Triquenot, 2018).



Figure 18 : *Femelle adulte aptère parthénogénétique de M. persicae*. Photo@Le Boulch

## 3.2. Le puceron vert : *Myzus persicae*

### 3.2.1. Caractéristiques générales de l'espèce *Myzus persicae*

*M. persicae*, contrairement à d'autres espèces de pucerons, est un ravageur « généraliste » qui se nourrit sur une quarantaine de familles botaniques. Ses populations s'étendent dans le monde entier et ravagent de nombreuses cultures d'intérêt agronomique majeur comme les cultures légumières ; solanacées (poivron, pomme de terre, tomate), brassicacées (choux, chou-fleur, brocoli), cucurbitacées (courge, pastèque) et les arbres fruitiers, principalement du genre *Prunus* (pêcher, abricotier, prunier) (Capinera, 2018).

Ses dégâts se traduisent généralement par des déformations de feuilles, un flétrissement de la plante et une réduction de son taux de croissance lorsque les colonies de pucerons atteignent des densités élevées. *M. persicae* se reproduit essentiellement par parthénogénèse, ce qui donne lieu à des augmentations massives et rapides de la population, constituée d'individus génétiquement identiques (Figure 18). La reproduction sexuée n'intervient qu'une fois par an, à l'arrivée de l'hiver lorsque les plantes hôtes se raréfient et lorsque les pucerons reviennent sur leur hôte primaire sous forme de morphes sexuées. Les pucerons vont alors passer l'hiver sous forme d'œufs sur l'hôte primaire ; *P. persica* ([www.cabi.org/isc/](http://www.cabi.org/isc/) ; Emden et Harrington, 2017).

### 3.2.2. Résistance aux insecticides

Pour contrôler les populations de pucerons les agriculteurs ont recours à un usage intensif d'insecticides. Ces molécules toxiques, organophosphates, carbamates, pyréthriinoïdes, cyclodiènes et néonicotinoïdes, sont pour la plupart des agents neurotoxiques qui agissent sur le système nerveux central au niveau des synapses cholinergiques des insectes et provoquent leur désorientation ou leur mort (Testud et Grillet, 2007). Cependant, leur spectre d'action n'est pas spécifique des ravageurs, c'est pourquoi des pollinisateurs comme les abeilles domestiques sont fortement impactés par ces traitements, de même que la faune auxiliaire comprenant des insectes parasitoïdes des pucerons (Cresswell *et al.*, 2012). De plus, l'utilisation massive des pesticides a permis à certaines espèces, en particulier *M. persicae*, de développer des mécanismes de résistance, rendant ces molécules inefficaces contre leur principale cible.

En effet, *M. persicae* dispose d'une capacité d'évolution extrêmement efficace lui permettant de supporter les traitements insecticides qui se succèdent, faisant de lui l'une des espèces les plus résistantes (Silva *et al.*, 2012; Bass *et al.*, 2014). Différents mécanismes de résistance ont été mis en évidence. Bass *et al.*, (2011) ont indiqué qu'une mutation ponctuelle d'un acide aminé au niveau de la sous unité  $\beta 1$  du récepteur nicotinique de l'acétylcholine, cible des néonicotinoïdes, provoque une sensibilité réduite des pucerons à cet insecticide. De plus, des événements de duplication de gènes provoquent chez *M. persicae* une synthèse accrue d'enzymes capables de dégrader les molécules toxiques.

Les carboxyestérases confèrent par exemple une résistance vis-à-vis de plusieurs insecticides (Field *et al.*, 1993) alors que le cytochrome P450 CYP6CY3 cible plutôt les néonicotinoïdes (Puinean *et al.*, 2010). Ainsi *M. persicae* peut agir directement en dégradant les substances actives ou indirectement en modifiant la cible des insecticides afin d'accroître sa résistance à ces traitements.

Dans ce contexte de résistance généralisée des pucerons aux insecticides et d'interdiction des néonicotinoïdes (Alim'agri, agriculture.gouv.fr, 2018), l'application de solutions de biocontrôle fondée sur la gestion des stress et équilibres naturels des populations d'agresseurs prend de l'importance. Sur certaines cultures, particulièrement en serre, des lâchés de prédateurs ou parasitoïdes (agents de lutte biologique), comme la coccinelle contre les pucerons, sont effectués. De même, certaines pratiques culturales comme la mise en place de bandes enherbées et plantes de service ou l'assolement se sont montrées efficaces dans des systèmes spécifiques (Ben-Issa *et al.*, 2017). Cependant, pour une gestion sur le long terme, l'étude de résistances conférées par des gènes majeurs de résistance ou par des QTL de résistance (résistance polygénique) a un intérêt certain pour la sélection variétale à la fois sur le plan écologique et économique.

### 3.2.3. Source naturelle de résistance à *Myzus persicae*

#### 3.2.3.1. Mise en évidence d'une résistance polygénique chez *Prunus davidiana*

Les résistances polygéniques sont gouvernées par un ensemble de gènes à effet quantitatif, localisés dans le génome dans des « Quantitative trait loci » (QTL). Elles confèrent généralement une résistance partielle c'est-à-dire qu'elles ne bloquent pas le cycle de l'agresseur mais réduisent son expansion ou sa multiplication au sein de la plante.

Pour la résistance aux pucerons, les résistances polygéniques se traduisent généralement par une antibiose, mécanisme qui va interférer avec la croissance, la survie et la fécondité des pucerons, contrairement à l'antixénose qui influence le comportement des pucerons, en particulier le choix des plantes et l'alimentation au niveau du phloème (Nalam *et al.*, 2019). Dans le genre *Prunus*, des QTL de résistance à *M. persicae* ont été identifiés par les équipes de l'INRAE Avignon chez l'accession P1908 de *Prunus davidiana*, espèce sauvage étroitement apparentée au pêcher. Sauge *et al.*, (1998a) ont observé chez P1908 une faible fécondité et un taux réduit de croissance des populations aphidiennes, caractéristiques d'une antibiose. Une étude du comportement alimentaire du puceron par électropénétrographie a mis en évidence une phase de salivation prolongée dans le phloème qui suggère une difficulté pour le puceron à s'alimenter dans les tubes criblés (Sauge *et al.* 1998b). Une cartographie génétique comparée a ensuite mis en évidence une co-localisation entre les composantes de cette résistance et le comportement alimentaire du puceron (Sauge *et al.*, 2011). En particulier un QTL majeur de résistance est associé à une réduction drastique de l'ingestion de la sève phloémienne, ce qui confirme l'existence d'un mécanisme de résistance localisé dans le phloème. Par ailleurs, une étude récente chez *P. davidiana* combinant métabolomique et transcriptomique a montré que l'expression des gènes de biosynthèse de la bétuline, triterpénoïde toxique pour *M. persicae*, était très nettement induite en réponse à l'infestation, ce qui suggère le rôle de ce composé dans le mécanisme de résistance à ce puceron chez cette espèce (Wang *et al.*, 2021a).

Néanmoins, bien que les résistances quantitatives associées à des QTL soient intéressantes en raison de leur potentielle durabilité, un grand intérêt est également porté aux résistances monogéniques aux pucerons, potentiellement moins durables dans le temps mais aux effets plus marqués sur les bioagresseurs et plus facilement exploitables en sélection.

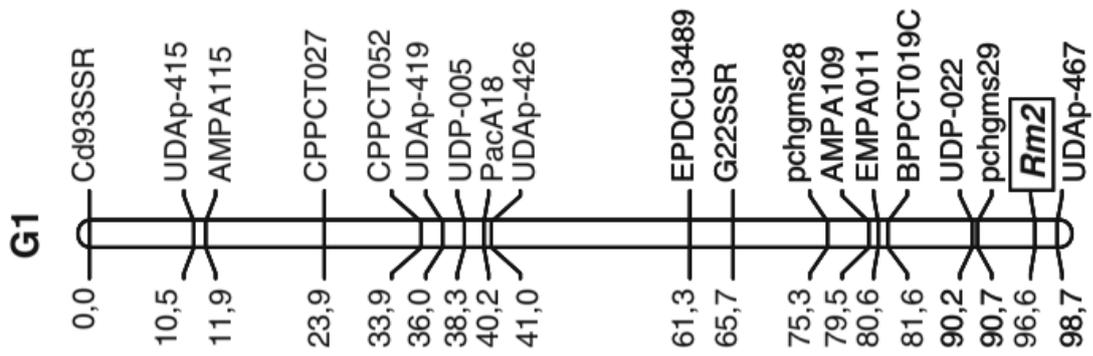


Figure 19 : Localisation du gène Rm2 sur le chromosome 1 de *P. persica* (Lambert et Pascal, 2011)



Figure 20 : Spots nécrotiques apparus sur le porte greffe Rubra après infestation par *M. persicae*.  
Photo@Poëssel Jean Luc

### 3.2.3.2. Résistances monogéniques contrôlées par le gène *Rm* chez *Prunus persica*

Trois sources de résistance à *M. persicae* par antixénose ont été découvertes chez le pêcher (Massonié *et al.*, 1982), chez Weeping Flower Peach (WFP) (S2678) un pêcher ornemental à port pleureur et à fleurs doubles, chez Rubira (S2605), un porte greffe à feuillage rouge et chez « Fen Shouxing ». Dans le cadre d'un programme de création de variétés de pêchers résistantes au puceron vert, l'étude de l'hérédité de la résistance à *Myzus* chez WFP a mis en évidence son contrôle par un gène unique dominant dénommé *Rm1* pour « Resistance to *Myzus* 1» (Monet et Massonié, 1994). Chez le porte greffe Rubira, la résistance est également monogénique dominante et a été dénommée *Rm2* (Lambert et Pascal, 2011). Enfin plus récemment, les travaux de Niu *et al.*, (2016) ont permis de caractériser la résistance de « Fen Shouxing », conférée par le gène dominant *Rm3*. Ces 3 gènes sont localisés au bas du chromosome 1 du pêcher (Lambert et Pascal, 2011; Niu *et al.*, 2016; Pascal *et al.*, 2017b) et pourraient être des allèles d'un même gène (Figure 19). Grâce à la construction d'une bibliothèque de chromosomes artificiels bactériens (BAC) pour un génotype portant *Rm3* et le séquençage du BAC couvrant l'ensemble du locus de résistance, un gène de type TIR-NBS LRR a été identifié comme candidat pour *Rm3* et dénommé *NLR1*. Ce gène est uniquement exprimé chez le génotype résistant (Pan *et al.*, 2022). Enfin, les travaux de clonage positionnel en cours menés au GAFL (INRAE Avignon) par l'équipe de Jean-Luc Poëssel montrent que les gènes *Rm1* et *Rm2* se situent au même emplacement que *Rm3* sur le génome du pêcher et que les régions délimitées contiennent des gènes TIR-NBS-LRR (TNL) candidats qui seraient identiques à *NLR1* ou seraient des allèles.

*Rm1* et *Rm2* confèrent une forte résistance à *M. persicae* qui s'accompagne d'une réaction hypersensible provoquant des nécroses localisées autour des zones de piqûres (Figure 20) (Sauge *et al.*, 1998, Lambert et Pascal, 2011). Pour *Rm3*, la réaction hypersensible peut s'avérer excessive et entraîner des dégâts sérieux sur les jeunes pousses (Wang, communication personnelle). La résistance de Rubira est accompagnée par une émission d'un mélange de COVs principalement constitué de MeSA, farnésènes, (E)- $\beta$ -ocimène et (E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène (Staudt *et al.*, 2010) et par une accumulation de composés phénoliques incluant un dérivé du 5-CQ, l'acide 3,5-dicaféoylquinique (Poëssel *et al.*, 2002) dont l'action aphicide a été brevetée (Poëssel *et al.*, 2009) pour le développement de son utilisation comme biopesticide.

De plus, Sauge *et al.*, (2011) ont démontré qu'une résistance induite se met en place chez Rubira après infestation : les pucerons déposés sur des plants de pêcher préalablement infestés fuient plus vite que lorsqu'ils sont déposés sur des plantes contrôles. Cette résistance induite se manifeste lorsque la préinfestation a lieu au minimum 48 h avant l'infestation, indiquant un délai dans la mise en place de la résistance. Cependant Sauge *et al.* (2011) montrent qu'un seul puceron présent pendant 3 h suffit à l'induction, la résistance ne s'exprimant qu'après un temps de latence complémentaire de 45 h. Ces résultats montrent que Rubira répond à un stimulus très faible et bref par une résistance accrue qui demande un délai pour sa mise en place.

#### 4. Objectifs des recherches

Ce projet a pour objectif d'analyser les réponses du pêcher à l'infestation par *M. persicae* et de dégager les éléments essentiels à la mise en place d'une résistance efficace. Il s'agit plus précisément de comparer aux niveaux transcriptomique et métabolomique les phénotypes moléculaires de 2 génotypes de pêchers, GF305 sensible à *M. persicae* et Rubira porteur du gène de résistance *Rm2*, 48 h après infestation lorsque se met en place la résistance induite décrite par Sauge *et al.* (2011).

Les objectifs sont :

- d'une part au niveau du transcriptome, (i) d'obtenir des données sans *a priori* sur l'expression des gènes du pêcher par séquençage haut-débit (RNA-sequencing) afin d'identifier les voies de signalisation et mécanismes de défenses déclenchés et différenciellement exprimés chez les deux génotypes, (ii) de mettre en évidence les grandes fonctions biologiques permettant de caractériser l'état physiologique des plantes infestées par une annotation globale des gènes *via* Gene Ontology (GO) et (iii) d'étudier plus précisément certains ensembles de gènes exprimés pour dégager de nouvelles pistes sur la régulation des voies métaboliques impliquées dans la mise en place de la résistance à *M. persicae*.

- d'autre part, au niveau du métabolome, d'analyser les variations des composés primaires et secondaires potentiellement impliqués dans la nutrition du puceron (sucres et acides aminés) dans la défense (métabolites secondaires) et dans la régulation des mécanismes de défense (phytohormones) et de les intégrer avec les informations transcriptomiques pour mettre en évidence les processus métaboliques participant à la défense.

Les données obtenues ont été interprétées dans le cadre des modèles de défenses présentés au chapitre 1.1 afin d'obtenir une vue intégrée de la réponse du pêcher à *M. persicae* en situation compatible ou incompatible. Ces résultats sont présentés au chapitre 3 et une partie d'entre eux a fait l'objet d'un article accepté dans le journal « Frontiers in Plant Science ».

Des travaux ont ensuite été effectués pour tenter d'élucider les modes d'action de deux marqueurs importants révélés par cette étude : le pipécolate et l'acide 3,5-dicaféoylquinique qui s'accumulent chez le génotype résistant Rubira après infestation. Ces résultats sont présentés dans les chapitres 4 et 5.

# Chapitre 2

---

Matériels et méthodes



*Figure 21: Génotype sensible GF305 (gauche) et génotype résistant Rubira (droite) utilisés pour les expérimentations*

Les expériences conduites dans cette étude ont pour objectif l'analyse comparative des profils transcriptomiques et métabolomiques de deux génotypes de pêcher (*P. persica*) qui diffèrent par leur niveau de résistance à *M. persicae*. Ce chapitre décrit le matériel biologique et les méthodes d'infestation communs à toutes les expérimentations de l'étude. Une description des expérimentations au cas par cas ainsi que les modalités d'analyse sont présentées dans les chapitres suivants.

## 1. Matériel végétal

Le matériel végétal de cette étude comprend 2 génotypes de porte-greffe de pêcher (*P. persica*) (Figure 21) qui diffèrent par leur niveau de résistance à *M. persicae*. Le porte-greffe GF305 sélectionné par l'INRAE à Bordeaux (Domaine de «la Grande Ferrade») en 1948 est sensible à *M. persicae*. Il a été utilisé pour l'élevage du puceron et comme témoin sensible dans les expérimentations. Le porte-greffe Rubira (S2605) au feuillage de couleur pourpre, également sélectionné par l'INRAE, porte le gène dominant *Rm2* qui confère la résistance à *M. persicae* et *M. varians* (Massonié et al., 1979; Massonié et al., 1982). Les deux porte-greffes présentent un haut degré d'homozygotie et sont produits par semis qui présentent en pépinière une grande homogénéité phénotypique. Les semences commerciales ont été produites par les pépinières Lafond (Valréas, Vaucluse France) par autofécondation naturelle en vergers isolés.

Les expériences ont été réalisées sur des pêchers de 6 à 8 semaines. Les graines de chaque génotype extraites de leur endocarpe lignifié ont été désinfectées puis stratifiées pendant environ 3 mois dans des boîtes de Pétri contenant de la perlite humide placées à 4°C à l'obscurité dans une chambre froide. Après l'émergence de la radicule, les graines ont été semées dans du compost Klasmann-Deilmann Seedling Substrate en godet, cultivées en serre puis les jeunes plants ont été repotés après 2 semaines. Les plantes ont été fertilisées en continu avec l'engrais N/P/K/Mg 3,2/1,7/5,2/0,8 Plantin® (PLANTIN SARL, France) et irriguées avec une conductivité de l'eau de 1,1-1,3 après le semis et de 1,3-1,5 après le repotage.

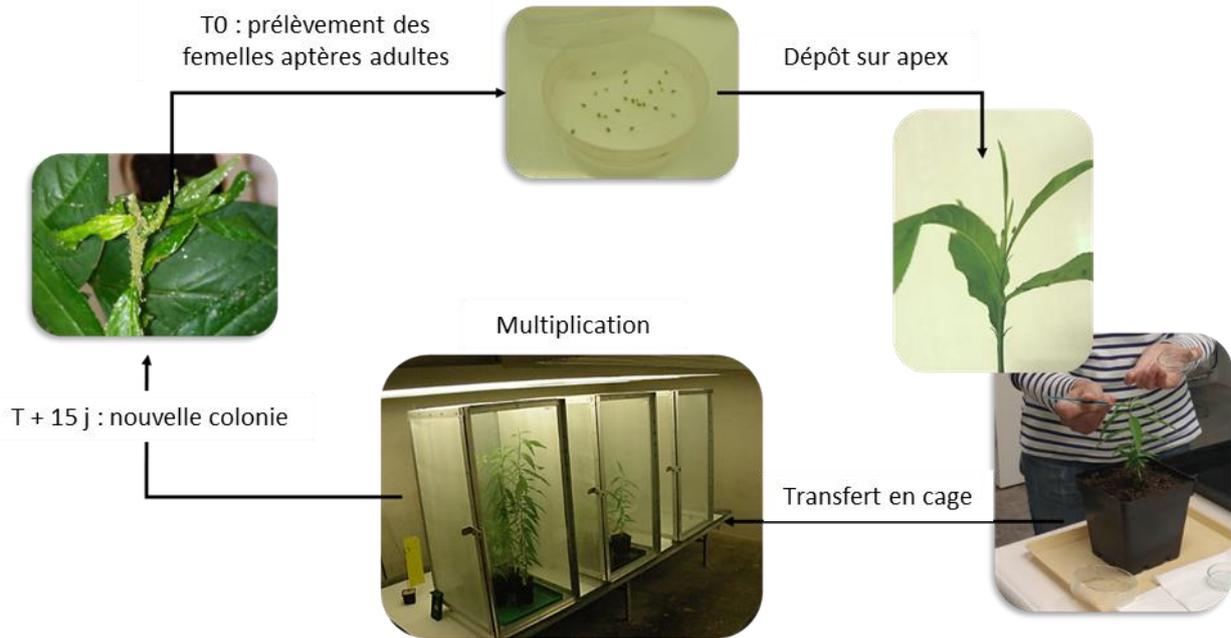


Figure 22 : Protocole d'élevage de *M. persicae* sur pêcher

Les pousses axillaires ont été enlevées pour ne conserver que l'apex de la tige principale. Après 6 semaines, les plantes des deux génotypes ont été acclimatées une semaine dans une pièce climatisée à 22°C, avec une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit.

## 2. Matériel animal

### 2.1. Condition d'élevage de *Myzus persicae*

La colonie de pucerons *M. persicae* utilisée est la lignée clonale *Mp06* obtenue à partir d'un œuf collecté en 2013 dans un verger de pêchers (Avignon, France). Depuis la population a été cultivée uniquement sur des jeunes plants du génotype sensible GF305 dans une pièce climatisée à 22 °C avec une photopériode Jour/Nuit de 16 h / 8 h. Les plants d'élevage, obtenus comme décrit ci-dessus étaient placés dans des cages «insect-proof» pour isoler les pucerons et éviter une contamination par d'autres insectes. L'élevage a été maintenu en conditions contrôlées par transfert de femelles aptères virginipares (parthénogénèse) tous les 15 jours sur de jeunes plants de GF305 en croissance (Figure 22).

### 2.2. Méthode d'infestation

Avant chaque expérience, une synchronisation des individus de l'élevage de *M. persicae* a été effectuée pour obtenir des jeunes adultes de même âge. Une semaine avant l'infestation des femelles ont été installées sur GF305 pour pondre et retirées après 48 h. Les larves nées sont maintenues sur le plant et subissent quatre mues successives jusqu'à atteindre le stade adulte en une semaine. Le jour de l'expérimentation, les pucerons synchronisés ont été prélevés sur la plante d'élevage et placés pendant 4 h à 22 °C dans des boîtes de pétri en verre pour subir une période de jeûne. Puis, les plantes de GF305 et Rubira ont été infestées en déposant soigneusement 10 pucerons adultes sur leur apex à l'aide d'un pinceau. Les plantes témoins sont également stimulées à l'aide du pinceau.

# Chapitre 3

---

Molecular mechanisms of resistance to  
*Myzus persicae* conferred by the peach  
*Rm2* gene: a multi-omics view

## Molecular mechanisms of resistance to *Myzus persicae* conferred by the peach *Rm2* gene: a multi-omics view.

Le Boulch Pauline, Poessel Jean-Luc, Roux David, Lugan Raphaël

Accepted on 8 september 2022 – doi : 10.3389/fpls.2022.992544

### **Abstract**

We studied the transcriptomic and metabolomic responses to *M. persicae* infestation of a peach variety carrying the major aphid resistance gene *Rm2*, encoding a probable nucleotide-binding leucine-rich repeat receptor (NLR).

Comparative RNAseq analysis of the resistant variety Rubira with the susceptible variety GF305 48 hours after infestation showed very limited changes in GF305 and on the contrary a massive reconfiguration in Rubira. A similar trend was observed with regard to metabolites.

The immune system was massively stimulated with simultaneous activation of genes encoding cell surface receptors involved in pattern-triggered immunity and cytoplasmic NLRs involved in effector-triggered immunity. The onset of necrotic leaf lesions was indicative of a hypersensitive reaction, supported by the overexpression of cell death stimulating NLRs/helpers couples as well as the activation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating metabolic pathways: photorespiratory glyoxylate synthesis and activation of the futile P5C/proline cycle. The triggering of an acquired systemic response was suggested by the activation of pipecolate metabolism. Important reduction in carbon, nitrogen and sulphur metabolic pools and the repression of many genes related to cell division and growth, consistent with reduced apices elongation, suggested a decline in the nutritional value of apices. Finally, the accumulation of caffeic acid conjugates pointed to the establishment of antixenotic defences.

### **Key word and Abbreviations**

Antixenosis; Effector-triggered immunity; Green peach aphid; hypersensitive response; *Prunus persica*; metabolomics; nucleotide binding-leucine rich repeat proteins; pattern-triggered immunity; pipecolic acid; systemic acquired resistance; transcriptomics.

ETI, PTI, TNL, CNL, DEG, hpi, dpi, PCD, ROS, PAMPS, DAMPS, JA, SA, ABA, BR, NHP

## 1. Introduction

The green peach aphid, *M. persicae*, is a polyphagous pest found throughout the world, attacking many crop species and whose harmful nature is largely due to its ability to transmit plant viruses. The primary host of this aphid is the peach (*P. persica*), on which it overwinters in the egg stage. Among the peach genetic resources only a few accessions resistant to *M. persicae* have been characterized, carrying a loci located at the bottom of chromosome 1: "Weeping Flower Peach", an ornamental genotype carrying the *Rm1* (*Resistant to Myzus 1*) gene (Monet and Massonié, 1994; Pascal *et al.*, 2017), Rubira, a red-leaf rootstock carrying *Rm2* (Lambert and Pascal, 2011) and "Fen Shouxing", a semi-wild selection carrying *Rm3* (Niu *et al.*, 2018b). Major aphid resistance loci have also been described in other species: *Mi-1.2* confers resistance to *M. euphorbiae* in tomato (Rossi *et al.*, 1998) and *Vat* against *A. gossypii* in melon (Dogimont *et al.*, 2014). The dominant *Mi-1.2* gene was the first insect-specific resistance gene to be cloned and the first example of a resistance gene active against distant organisms as it confers resistance to *M. euphorbiae*, psyllids, whiteflies and root-knot nematode in tomato (Nombela *et al.*, 2003). Furthermore, Pallipparambil *et al.*, (2015) demonstrated an extended spectrum of resistance controlled by this gene, as *Mi-1.2* negatively impacts non-phloem sap-feeding organisms like larvae of *Oirus insidiosus*, beneficial zoophytophagous predators that prey on aphids. The *Vat* gene was found to confer dual resistance to *A. gossypii* and to viruses it transmits (Dogimont *et al.*, 2014). It involved a localised hypersensitive response (HR), negatively influenced aphid nutrition and was also found to extend to most *A. gossypii* clones (Boissot *et al.*, 2016a; Boissot *et al.*, 2016b).

*Mi-1.2*, *Vat* and *Rm3* have been found to encode effector-triggered Immunity (ETI) receptors, *i.e.* resistance proteins (R) containing remarkable Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat (NLR or NBS-LRR) motifs (see Ngou *et al.*, 2022a and Ngou *et al.*, 2022b for review). These immunity proteins are divided into three classes according to their N-terminal domain: Toll/interleukin-1 receptor (TNLs), coiled coil domain (CNLs) or RPW8-like coiled coil domain (RNLs) (Jones *et al.*, 2016). Both *Mi-1.2* and *Vat* were characterised as CNLs while *Rm3* and *Rm2* encode TNLs (Pan *et al.*, 2022; Poessel personal communication). ETI is based on intracellular NLR sensors acting alone or in pairs (Feehan *et al.*, 2020) and is one of the two major layers of the plant immune system.

The other layer is the pattern-triggered Immunity (PTI), made up of pattern recognition receptors (PRRs), cell surface sensors activated by pathogenesis-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs). PRRs include receptor-like kinases (RLKs) and receptor-like proteins (RLPs), which comprise a variable extracellular domain allowing the recognition of various ligands, a transmembrane domain and a cytoplasmic kinase in the case of RLKs (Tang *et al.*, 2017) which transmits a signal to intracellular proteins once activated. The selection pressure exerted by PTI on pathogen populations has led to the emergence of populations carrying effector proteins that neutralize resistance mechanisms and restore virulence. This, in turn, resulted in the evolution of plant populations that carry cytosolic receptors capable of specifically recognize pathogen effectors and initiating the strong defenses that constitute ETI (Jones and Dangl, 2006).

Aphids are piercing-sucking insects that feed exclusively on phloem sap, which they collect with their specialized mouthpiece, the stylet. Their feeding behavior comprises several phases generating signals capable of triggering plant defense: the stylet and the secreted gel-like saliva can produce PAMPs and DAMPs during intercellular insertion and mesophyll cells probing phases, while the watery saliva secreted when sucking phloem sap from sieve elements contains protein effectors that suppress plant defense, (Will *et al.*, 2007; Bos *et al.*, 2010), contributing to the stealthy nature of aphids, but that may potentially trigger ETI. Indeed, defense against aphids proved to involve both PTI and ETI. The role of PTI in defense against aphid infestation was demonstrated by application of eliciting extracts of *M. persica* (Prince *et al.*, 2014) and by the study of the *Arabidopsis bak1* mutant, unable to synthesise a RLK (Prince *et al.*, 2014, Tungadi *et al.*, 2021). The involvement of ETI has also been shown by expressing salivary proteins of *M. persica* in tobacco (Bos *et al.*, 2010, Elzinga *et al.*, 2014).

Omic studies have uncovered other molecular constituents of plant-aphid interplay. Kerchev *et al.*, (2013), for example, showed the importance of redox control, salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) signalling pathways in *Arabidopsis* after infestation by *M. persicae*. Analysis of transcriptional responses to *M. euphorbiae* in tomato also highlighted the involvement of antioxidant mechanisms and hormonal regulations: SA, jasmonic acid (JA), ethylene and brassinosteroids (BRs) and the activation of callose synthesis genes, dedicated to blocking symplastic connections (Kuśnierczyk *et al.*, 2008; Coppola *et al.*, 2013).

In peach, a transcriptomic study of "Fen Shouxing" after *M. persicae* infestation, conducted by Niu *et al.* (2018), revealed the activation of thousands of genes involved in signalling cascades or resistance mechanisms, such as redox modifications, calcium fluxes, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), phytohormones, transcription factors, pathogenesis-related proteins (PRs) and enzymes of secondary metabolic pathways. Metabolomic studies on plant-aphid interactions are less common but crucial to uncovering metabolites involved in stress signalling and defence (Zogli *et al.*, 2020) as well as reconfigurations of carbon and nitrogen fluxes controlling the growth and nutritional value of infested plants. Gao *et al.* (2021) reported alterations in central and secondary metabolism of rose in response to *M. rosivorum* and Kuśnierczyk *et al.* (2008) confirmed the antibiotic role of secondary metabolites such as glucosinolates and the alkaloid camalexin in Arabidopsis. Antibiosis is manifested by a direct toxic effect of the molecule on the insect, measured by the mass of the aphids or their reproduction rate. Antixenosis, on the other hand, is measured by choice tests and is manifested by the escape of aphids that cannot establish themselves on the plant. Several studies have shown the antixenotic effect of volatile organic compounds (VOCs), in peach, hops and cabbage for example (Staudt *et al.*, 2010, Undas *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2019). Ahmed *et al.* (2019) showed that the volatile signature of the plant gave the aphid information on its nutritional quality, in this case its nitrogen content.

Plant-*M. persicae* relationships have been extensively studied in Arabidopsis, but this species being partially resistant to this aphid, distinct responses to infestation are expected in either susceptible or resistant peach genotypes. In the present study, we establish a detailed picture of signal transduction and metabolic mechanisms triggered by a TNL activation upon aphid infestation in the *M. persicae* primary host. We compared the transcriptomic and metabolomic responses to *M. persicae* of a susceptible peach genotype, GF305, and the resistant genotype Rubira, carrying the *Rm2* resistance locus. After 48 hours of infestation, a duration sufficient to trigger resistance in Rubira (Sauge *et al.*, 2011), we looked for marker genes for PTI, ETI and evidence for the development of hypersensitive reaction (HR) and systemic acquired resistance (SAR). We also analyzed markers of metabolic reconfigurations underlying the production of hormonal signals, but also metabolic pathways reflecting a reorientation of growth fluxes and the activation of oxidative bursts or phytoalexin synthesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Two highly homozygous seedling rootstocks selected by INRAe and contrasting for their resistance to *M. persicae* were used: the susceptible rootstock GF305 and the red-leaf rootstock Rubira, carrying the dominant resistance gene *Rm2* (Lambert & Pascal, 2011). Seeds were produced by natural inbreeding in isolated orchards of a commercial nursery (Pépinières Lafond, Valréas, France). Disinfected seeds were placed in petri dishes containing humidified perlite and were stratified during 3 months in dark cold room at 4°C. After radicle emergence, seeds were sown, grown in a greenhouse and kept free of pests and diseases without spraying or biological control. Axillary shoots were removed to keep only the main stem. 8 weeks after sowing, 10 plants of each genotype were acclimated during one week in the air-conditioned room where experiments took place, at 22°C with a 16 h day/8 h night photoperiod. The pots were placed in large trays filled with water to prevent the movement of aphids from one plant to another during the experiment.

### 2.2. Aphids

The *M. persicae* clonal line used, Mp06, was obtained in 2013 from a single egg collected in a peach orchard (Avignon, France). Since then, parthenogenetic apterous females were continuously reared on GF305 seedlings in an air-conditioned room at 22°C with 16 h/8 h D/N photoperiod.

### 2.3. Infestation and plant sampling

One week before infestation, parthenogenetic females were installed on GF305 seedlings for laying and removed after 48 hours to obtain a nymph population of the same age. The day of infestation, the synchronized adult females obtained were placed for 4 h at 22°C to mimic a fasting period. Ten plants of GF305 and Rubira were infested by placing carefully with a brush 10 aphids on their apex. After 48 h, aphids and nymphs were pulled out with a brush, control plants (10 for each genotype) were equally stimulated with the brush, and the apices of control and infested plants were cut below the second node (approximately 100 mg of fresh material per plant), immediately frozen in liquid nitrogen and then stored

at -80°C until analysis. Each apex was analysed individually and a set of 4 replicates were dedicated to transcriptomic analysis and another 5 to metabolomics.

A second experiment was conducted in the same conditions for a kinetic study of phytohormones with harvest of apex 12, 24 and 48 hours post-infestation (hpi) and for measure of plant elongation 7 days post-infestation (dpi).

## 2.4. RNA extraction and sequencing

Each sample was manually ground in liquid nitrogen with disposable pestles and total ARN was extracted with the RNeasy Plant Mini Kit (QUIAGEN, France) according to the manufacturer's instructions, which comprises a guanidine isothiocyanate lysis and purification with silica membrane. RNA concentration and purity were checked with a Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA), a QuBit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA ) and RNA integrity with a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Next generation sequencing of RNA (RNAseq) was realized by the GeT-PlaGe platform (INRAE, Toulouse, France). Sixteen RNAseq libraries were prepared with the mRNA TruSeq Stranded kit (Illumina, San Diego, USA), according to Illumina's protocols. Briefly, mRNAs were isolated from total RNA using poly-T beads, fragmented and converted to cDNA. Specifics adaptors and multiplexing indexes were ligated before PCR amplification. Libraries quality was checked using a Fragment Analyser (AATI, Ankeny, USA) and they were quantified by qPCR using Quant Studio 6 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Finally, libraries were pooled on a single flowcell line (Illumina HiSeq3000 sequencer) for paired-end sequencing (2 x 150 bp).

## 2.5. RNAseq analysis

Sequencer output raw data files (binary base call format) were converted to Fastq format using the CASAVA (Consensus Assessment of Sequence And VArIation) Illumina software. The global quality of sequences was assessed using FastQ Illumina filter and FastQC software (Babraham Institute, Cambridge, UK). Sequencing adaptors were removed using Cutadapt version 1.14 (Martin, 2011).

Then, the reads were splice-aligned on the peach reference genome version 2.0.a1 (Verde *et al.*, 2017) using STAR version 2.5.1b software (Dobin *et al.*, 2013). Finally, transcript expression was quantified using RSEM version 1.3.0 (Li and Dewey, 2011).

The raw sequencing data, initially counting 26 873 transcripts (*i.e.* 100% of *P. persica* genome V2.0.a1), was filtered by excluding transcripts with a count sum null or less than 8 (which corresponds to at least one count for half of the samples), thus reducing the number of transcripts down to 20 606. To evaluate the statistically significant changes in gene expression, an "Independent hypothesis weighting" test was applied according to the DESeq2 R package protocol, with a max fold change above 2, a p.value threshold set to 0.05 and an adjusted false discovery rate (FDR). To overcome the poor annotation of the peach transcriptome, we performed a blastp of the full peach proteome version 2.0.a1 against *A. thaliana* Araport11 protein sequences. The set of best Arabidopsis homologs obtained for each peach protein was used to conduct overrepresentation tests and enrichment of expression data *via* panther.org (Thomas *et al.*, 2003) and gProfiler (Raudvere *et al.*, 2019) through the Gene Ontology (GO) and KEGG (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) databases. A *P. persica* protein was considered as the "true" ortholog of an Arabidopsis protein when it was also the best match of a reverse blastp (from *Arabidopsis* to *P. persica* proteomes); a total of 13097 Arabidopsis orthologs were found. Detailed gene function was also retrieved from The Universal Protein Resource (UniProt) and The Arabidopsis Information Resource (TAIR) online databases (The UniProt Consortium, 2021; Berardini *et al.*, 2015).

## 2.6. Metabolites extraction

Solvents were purchased from Honeywell (Charlotte, USA) and Thermo Fisher Scientific (Wilmington, USA) and ultra-pure water was obtained from a Milli-Q system (Merck, Darmstadt, Germany). Frozen fresh samples were ground in 2 mL microtubes with ball mills for 1 min at 30 Hz (Mixer mill MM200, Retsch, Eragny, France), then 10 mg of fresh powder was extracted for 15 min at 70°C under stirring (940 rpm) with 1.5 mL of a methanol/water (80:20, v/v) solution containing 50 µM of ribitol as internal standard. Volume was adjusted to keep the same ratio mass to volume in every sample.

Samples were centrifuged 5 min at 26 400 g and the supernatants containing polar metabolites were filtered before analysis (0.22 µm filters Millex-Lg, PTFE hydrophile, 4 mm, Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany).

## 2.7. Untargeted GC-EI-TOFMS profiling

The method was adapted from Roessner *et al.* (2000). Samples were derivatized online before injection with a MultiPurpose Sampler (Gerstel MPS, CTC Analytics AG, Mülheim an der Ruhr, Switzerland): dry extracts were incubated in 50 µL of a pyridine solution containing 20 mg/mL of methoxyamine hydrochloride under constant shaking at 900 rpm and 80°C for 90 min. Then, 80 µL of BSTFA containing a mixture of 9 n-alkanes were added before heating for 30 min at 80°C under constant shaking at 900 rpm. Data acquisition was performed with a gas chromatograph system (7890B GC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a capillary column (ZB-SemiVolatiles, 34.59 m, internal diameter 250 µm, film thickness 250 µm, Phenomenex, Torrance, USA) hyphenated to a time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Pegasus BT, Leco, Saint Joseph, Benton Harbor, MI, USA). One microliter of sample was injected in split mode (1:50) at 230°C. Helium was used as carrier gas at 0.6 mL/min. The initial oven temperature was kept at 70°C for 1 min and then increased to 320°C (9°C/min) and maintained for 10 min. The m/z scan range was 70–600 with a cycle time of 20 scans/s. Source temperature and transfer line were set at 250°C. The MultiPurpose Sampler was controlled by Maestro Version 1.4.40.1. Gerstel and gas chromatography system with mass spectrometer were controlled by ChromaTOF Version 5.20.38.0.54864 (LECO, Saint Joseph, MI, USA). GC–EI–TOFMS data were deconvoluted with the LECO NTD software (LECO, St. Joseph, MI, USA), then the peak list was curated manually to remove incorrectly deconvoluted peaks and contaminants. Peak annotation was based on spectral and retention index (RI) similarity using mass spectral libraries (Golm database, NIST 2014, Leco-fiehn rtx5). Identification level of each metabolites was determined according to criteria inspired by Schymanski *et al.* (2014): level 1, confirmed structure by comparison with authentic standard, reverse match > 850, difference between retention index (RI) < 1%; level 2, probable structure, reverse match > 800 and difference between RI < 1%; level 3, tentative candidate, 600 < reverse match < 1000 and difference between RI > 1%.

A specific extracted ion chromatogram (XIC) was chosen for each molecule for integration; then peak areas were normalized against the internal standard so the final dataset consisted of semi-quantitative information. The list of metabolites detected and their analytical features can be found in Appendix 1.

## 2.8. Untargeted UPLC-ESI-QTOF-MS/MS profiling

Analyses were performed with an Acquity I-Class UPLC system (Waters, Mildorf, MA) hyphenated to a Synapt G2-Si quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Waters, Mildorf, MA) equipped with an electrospray ionization source (ESI). Chromatographic separation was achieved using a Kinetex 1.7  $\mu\text{m}$  F5 Core-shell LC columns (150 x 2.1 mm, Phenomenex, California, USA). The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1 % formic acid. One microliter of sample was injected before running the solvent gradient: 2% B for 1 min, then up to 100 % B in 18 min followed by 2 min at 100 % B and then back to initial conditions in 1 min (total run time 23 min). The column was maintained at 35°C with a flow rate of 0.3 mL/min. The source temperature was set to 120°C and the desolvation temperature to 600°C. The capillary voltage was set to 0.8 kV and the cone voltage to 40 V. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas, with 50 L/h gas flow and 800 L/h desolvation gas flow. Analysis was performed twice, in negative and positive ionization modes, with a resolution of 40 000. Data independent acquisitions were performed simultaneously in MS and MS/MS modes (MS<sup>e</sup>, continuum), with a collision energy ramp from 20 V to 70 V. Mass spectra were recorded at 0.2 second per scan from 50 to 1200 m/z. Chromatograms from negative mode acquisition were scanned to extract the major compounds. Metabolites were identified at the level 3 (Schymanski *et al.*, 2014) by a manual examination of MS and MS/MS spectra in positive and negative modes and spectral comparison with in-house database and literature (Appendix 2).

## 2.9. Targeted UPLC-DAD-ESI-TQMS profiling

Analyses were performed with an Acquity I-Class UPLC system (Waters, Mildorf, MA) equipped with a diode array detector (DAD) and hyphenated to a Xevo TQ-XS (Waters, Mildorf, MA) equipped with an ESI source. Pure standards (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were injected and MRM (multiple reactions monitoring) methods were optimized by testing ESI

polarity, cone voltage and collision energy. Data acquisition and analysis were performed in using MassLynx software (Waters, Mildorf, USA). Identification level of each metabolites was determined according to Schymanski *et al.* (2014) as follows: level 1, confirmed structure by comparison with authentic standard; level 2, probable structure by comparison with data bases and/or literature; level 3, MS<sup>2</sup> spectrum interpretation and light absorbance spectrum matched a tentative candidate. List of metabolites with detailed analytical parameters are provided in Appendix 3

### 2.9.1. Phenolic compounds

Chromatographic separation was achieved using a Kinetex 1.7 µm F5 Core-shell LC columns (150 x 2.1 mm, Phenomenex, California, USA). The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1 % formic acid. One microliter of sample was injected before running the solvent gradient: 2 % B for 1 min, then up to 55 % B in 18 min, 1 min to reach 100 % B followed 2 min at 100 % B and then back to initial conditions in 3 min (total run time 25 min). The column was maintained at 35°C with a flow rate of 0.25 mL/min. The source temperature was set to 120°C and the desolvation temperature was set to 600°C. The capillary voltage was set to 1.2 kV. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas, with 50 L/h gas flow and 800 L/h desolvation gas flow.

### 2.9.2. Amino acids and polyamines

Polyamines and amino acids were analyzed after derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit, Waters, Mildorf, USA) according to the manufacturer's instructions. Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm column (2.1 x 50 mm, Waters, Mildorf, USA) with a pre-column. One microliter of sample was injected before running the solvent gradient: 0.01 % B for 0.54 min, then up to 9.1 % B in 6.5 min, 2 min at 21.2 % B followed by 0.4 min at 59.6 % B and then back to initial conditions in 0.6 min (total run time 10.1 min). The column was maintained at 55°C with a flow rate of 0.7 mL/min. The source temperature was set to 150°C and the desolvation temperature was set to 650°C. The capillary voltage was set to 3.0 kV. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas, with 600 L/h gas flow and 1200 L/h desolvation gas flow.

### 2.9.3. Phytohormones

One milliliter of polar extract was evaporated under vacuum overnight. The dry residue was concentrated in 100  $\mu$ L of a methanol/water (80:20, v/v) solution. Chromatographic separation was achieved using an Acquity 1.7  $\mu$ m C18 CSH LC column (100 x 2.1 mm, Waters, Mildorf, USA). The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B), both containing 0.01% formic acid. Five microliters of sample were injected before running the solvent gradient: 25% B for 0,5 min, then up to 100% B in 6 min followed 2 min at 100% B and then back to initial conditions in 1,5 min (total run time 9,5 min). The column was maintained at 45°C with a flow rate of 0.4 mL/min. The source temperature was set to 120°C and the desolvation temperature was set to 550°C. The capillary voltage was set to 2.8 kV. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas, with 150 L/h gas flow and 1000 L/h desolvation gas flow.

### 2.10. Data analysis

Boxplots were generated with the R packages "PMCMRplus" and "ggplot" and statistically significant differences were found with a Kruskal-Wallis test and Conover post-hoc test with Bonferroni adjustment. Principal component analysis (PCA) and Heatmap were generated with the R package "FactoMineR" and "Pheatmap" respectively, after performing log transformation and Pareto scaling. Metabolites were mapped to metabolic pathways using the Plant Metabolic Network database (Hawkins *et al.*, 2021).

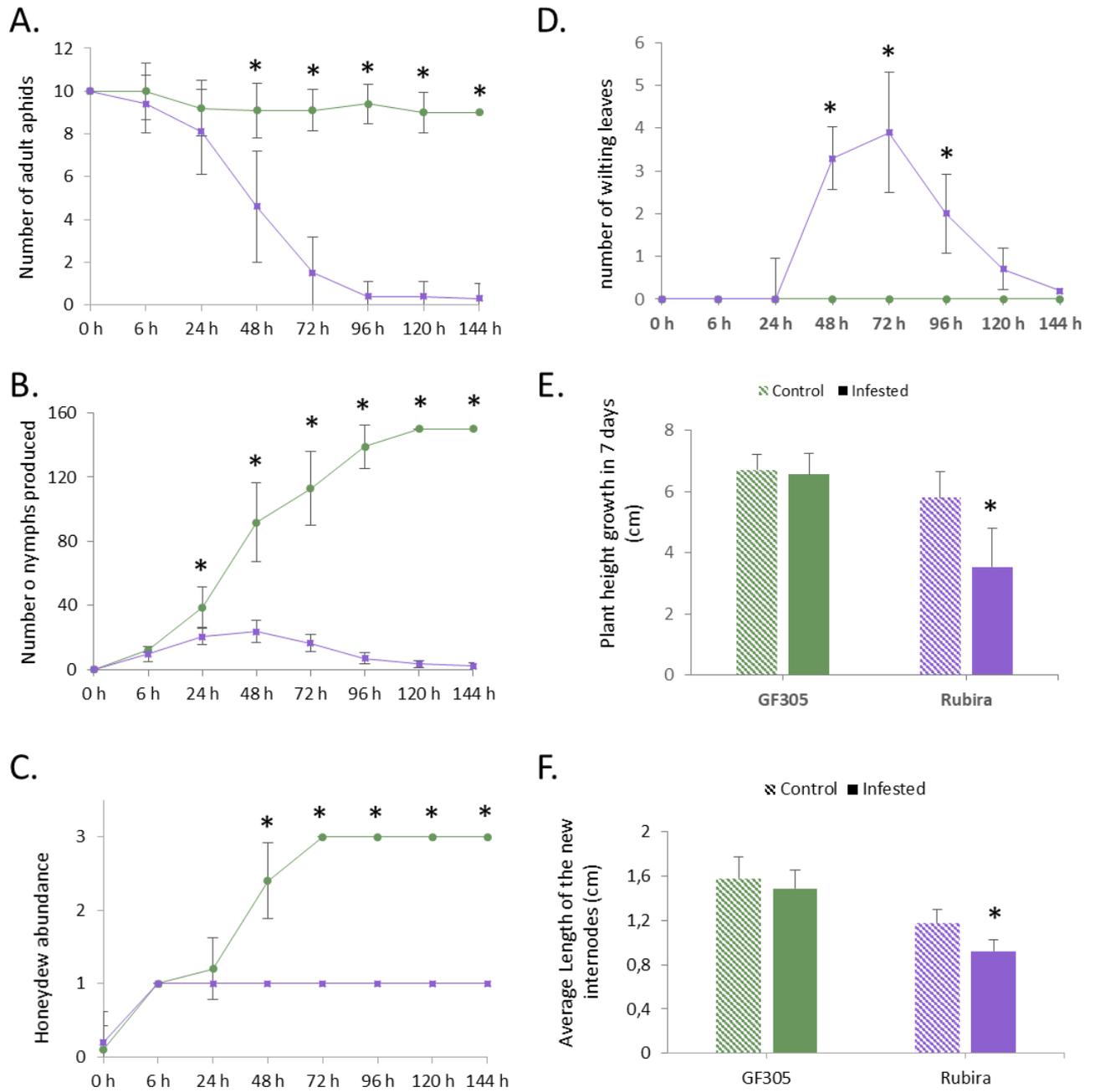


Figure 23 : Aphid behavior and plant symptoms after infestation with *M. persicae*. Significant differences according to a Mann Whitney test are indicated ( $p$ -value $<0.01$  \*). A. Number of remaining aphids (out of ten adult deposited) on the susceptible GF305 (green circles) and the resistant Rubira (purple squares) seedlings over 6 days. B. Number of nymphs produced. C. Honeydew abundance expressed per classes (0: absence; 1: low; 2: medium; 3: high). D. Number of wilting leaves on the growing shoot. E. Height growth of the plants in seven days. F. Average length of new internodes formed in 7 days (cm).

### 3. Results

#### 3.1. Response to infestation: aphid behavior and plant symptoms

After infestation, the aphids deposited on the susceptible GF305 remained on the plant, with an average of nine aphids per plant, while they decreased rapidly on the resistant Rubira over 7 days, down to five aphids per plant 48 hpi, until all of them escaped 96 hpi (Figure 23A). The number of nymphs increased constantly on GF305 up to more than 150 (120 hpi), while after a moderate increase during 24 h on Rubira, it fell down to less than five 120 hpi (Figure 23B). The evolution of honeydew abundance on the leaves corroborates these trends: it was high on GF305 and low on Rubira, indicating an aphid feeding failure on the resistant plants (Figure 23C). GF305 plants also displayed typical symptoms of susceptibility 48 hpi, with young twisted leaves, whereas Rubira developed necrotic lesions on shoots and leaves and showed wilting leaves, (Figure 23D and Appendix 4). The infested resistant plants experienced a 39% reduction in height elongation 7 dpi compared to the control plants, while height elongation of susceptible plants was not affected by infestation (Figure 23E and 23F).

#### 3.2. Major transcriptomic and metabolomic patterns associated to genotypic differences and infestation

A PCA performed on the transcriptomic raw dataset with 26 873 transcripts (Figure 24A) revealed that 88 % of the total variance associated to PC1 was driven by aphid-induced differentially expressed genes (DEGs) in the resistant genotype Rubira. The second PC only expressed 9% of the total variance and was driven by the genotype-induced differential gene expression. Among the 20 606 expressed genes obtained after filtration, we found a total of 5743 DEGs: 284 genes were found differentially expressed between the 2 genotypes under control condition (175 DEGs upregulated in Rubira and 109 downregulated, Appendix 5), only 35 DEGs were found between control and infested apices of the susceptible GF305 (34 upregulated 48 hpi and 1 downregulated, Appendix 6) and 5424 DEGs between control and infested apices of the resistant Rubira (2990 upregulated 48 hpi and 2434 downregulated, Appendix 7). The Venn diagram (Figure 25) shows the number of common DEG for each modality.

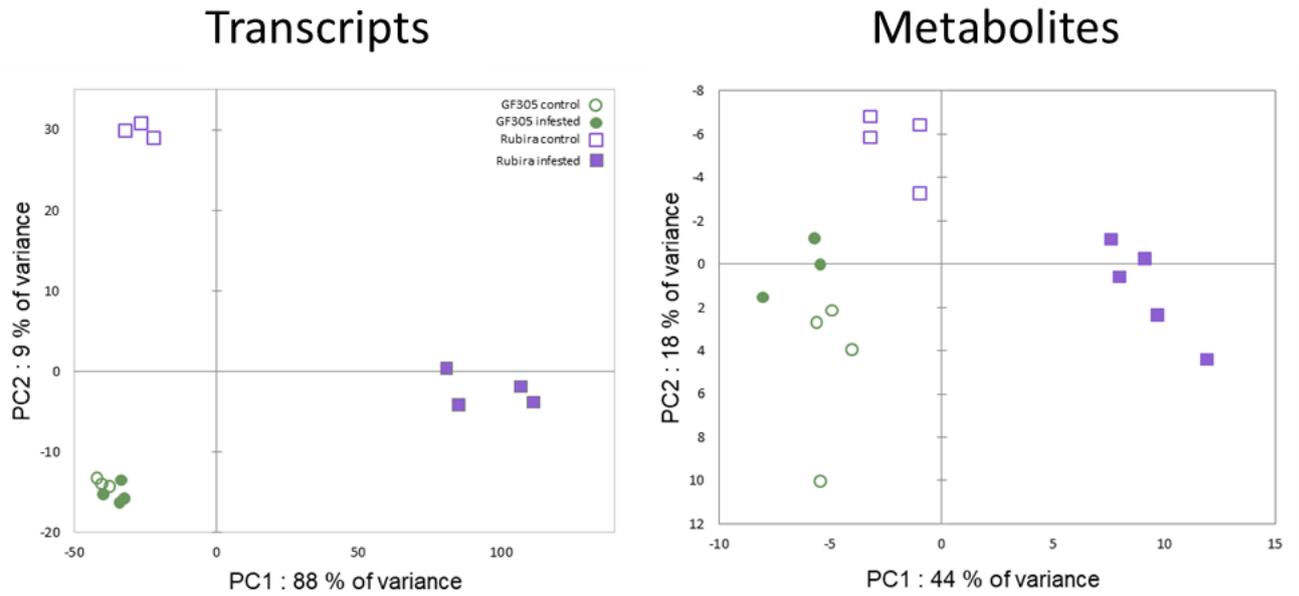


Figure 24 : PCA score plots on raw transcription count data and metabolite semi-quantitative levels.

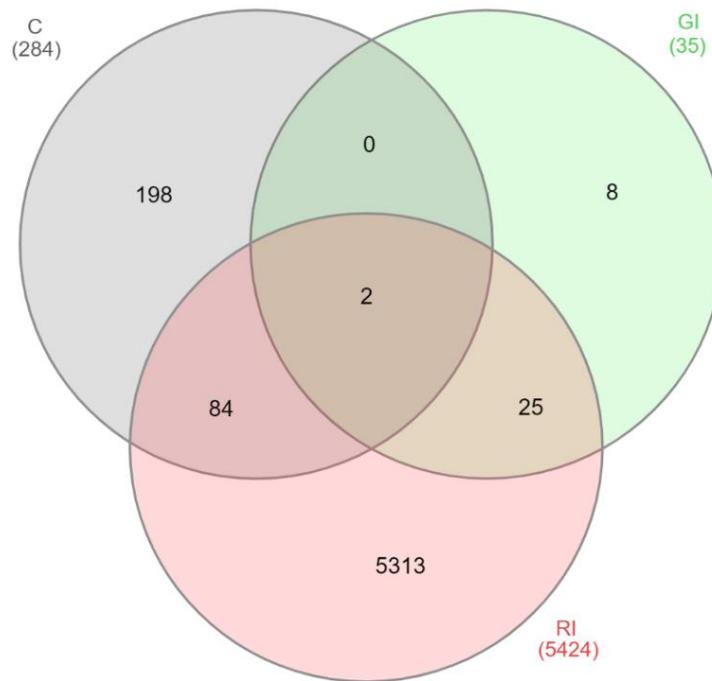


Figure 25 : Venn diagram representing the distribution of DEGs between the modalities.

C : GF305 control VS Rubira control ; GI : GF305 control VS GF305 infested ; RI : Rubira control VS Rubira infested

A combination of targeted and non-targeted metabolomic approaches provided the relative contents of 138 metabolites, including 3 phytohormones, 69 primary and 66 secondary compounds. The reliability of identification was determined as recommended by Schymanski *et al.* (2014): 69 compounds were identified at level 1, 22 at level 2 and 47 at level 3. The distribution of these compounds in structural families is shown in the Appendix 8. A total of 94 compounds showed significant variation in at least one condition: 73 discriminated the uninfested genotypes (Appendix 9), 12 changed after infestation in GF305 (Appendix 10) and 54 in Rubira (Appendix 11). Interestingly, the trends revealed by a PCA was similar to that observed for gene expression (Figure 24B): PC1 explained 44 % of the variance and discriminated aphid-infested Rubira samples from other samples, while PC2 explained only 18 % of the variance and was associated to the discrimination of the uninfested genotypes, confirming that the molecular response of Rubira to *M. persicae* was several orders of magnitude greater than that of GF305 and also exceeded the constitutive difference between the genotypes. A hierarchical clustering analysis conducted on the 94 discriminant compounds revealed clusters of metabolites discriminating the genotypes and/or responding to infestation (Figure 26). The clusters 2.2.2 and 1.2 gather mostly secondary metabolites remaining stable after infestation but with higher constitutive content in GF305 and Rubira respectively. The cluster 2.2.2 is a mixture of flavonols and coumaroyl-acetyl-glucosides while the cluster 1.2 contains flavonols and anthocyanins. The cluster 2.1 gathers caffeoyl esters that were constitutively more abundant in GF305 but decreased in this genotype after infestation while they increased in Rubira. Finally, the clusters 1.1 and 2.2.1 show respectively the specific aphid-induced accumulation and depletion of primary metabolites in Rubira.

### 3.3. Constitutive differences between the susceptible and resistant genotypes

The Gene Ontology (GO) enrichment analysis of the 284 DEGs highlighted five functions, most upregulated genes being found in Rubira (Figure 27 ; Appendix 5). The greater differences relate to flavonoid metabolism (GO:0019748, GO:0009812), with most genes globally overexpressed in Rubira. This is consistent with the accumulation of quercetin-3-O-rhamnoside and especially cyanidin-3-O-glucoside (Appendix 12), responsible for the red colour of Rubira's foliage, a trait associated with the *Gr* locus and independent of aphid resistance (Pascal *et al.*, 2002).

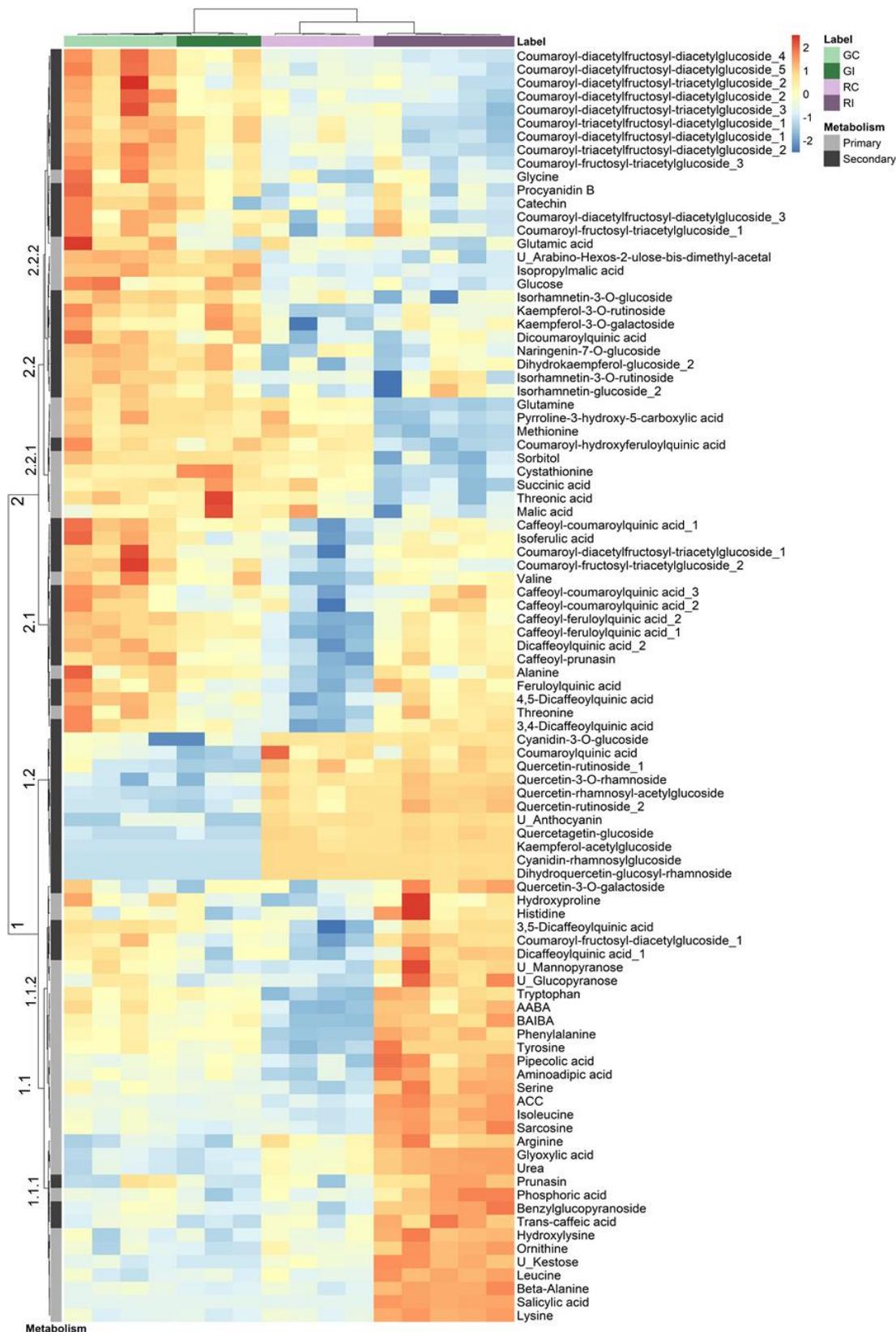


Figure 26 : Hierarchical clustering analysis of a subset of metabolites displaying a significant difference (Kruskall-Wallis,  $p < 0.05$ ) between uninfested GF305 and Rubira control plants (GC vs RC) or between control and infested plants (Gc vs GI and RC vs RI) 48 hpi. HCA was performed using the Euclidian distance and the Ward algorithm on data after log transformation and Pareto normalization (mean-centered and divided by the square root of the standard deviation). Primary and secondary metabolites are indicated by a gray scale on the left. GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.

Indeed, *PpMYB10.4* (*Prupe\_6G175900*), a candidate Gr gene encoding a transcription factor regulating leaf pigmentation (Zhou *et al.*, 2014b) and homologous to Arabidopsis *MYB113*, was overexpressed in Rubira. The high anthocyanin content is further explained by the strong expression of the orthologs of leucoanthocyanidin dioxygenase (*Prupe\_5G086700*), anthocyanidin-3-O-glucosyltransferase (*Prupe\_2G324700*), and *PpGST1* (*Prupe\_3G013600*), a Glutathione S-transferase, orthologous to *GSTF12* and involved in the transport of anthocyanins essential for peach coloration (Zhao *et al.*, 2020). In contrast, GF305 had higher levels of isorhamnetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-rutinoside and kaempferol-3-O-rutinoside, as well as caffeoylquinic acids, phenylpropanoid-acetyl-sucrose esters and the three aromatic amino acids, phenylalanine, tyrosine and tryptophan.

### 3.4. Responses to infestation in the susceptible genotype

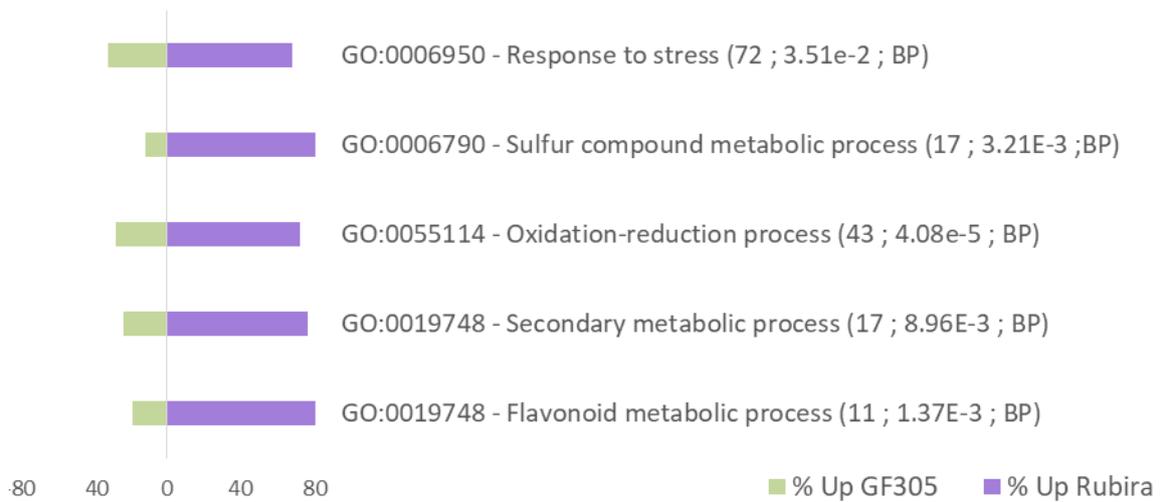
Only 35 genes were differentially expressed in GF305 after infestation, all but one overexpressed (Appendix 6). Of the 34 genes overexpressed, 27 were also overexpressed in Rubira after infestation. The small number of genes involved did not allow for an enrichment study but many genes could be *a priori* assigned to a few functional groups.

#### 3.4.1. Defense genes

A few DEGs could arguably be classified as defense genes. The most remarkable, *Prupe\_5G025300*, is a *NLR* gene that shares homology (32.5 % identity) with its Blastp best hit in Arabidopsis, the resistance protein RPM1 (Gao *et al.*, 2011). It was the only gene repressed in GF305 after infestation while it was overexpressed in Rubira. GF305 infestation also induced *Prupe\_7G265200*, a close homolog to *HSP70B* involved in many defense responses (Jiang *et al.*, 2014; Bricchi *et al.*, 2012) and inducible in Arabidopsis by OPDA, the precursor of JA (Taki *et al.*, 2005).

#### 3.4.2. Brassinosteroid related genes

Nine genes induced by infestation in GF305 are closely or remotely related to BR signalling. Two genes are involved in BR regulation: *Prupe\_1G520800* is a close homolog of *EXORDIUM*, a central coordinator of BR-dependent growth control (Coll-Garcia *et al.*, 2004), also involved in response to herbivory (Mohanta *et al.*, 2012).



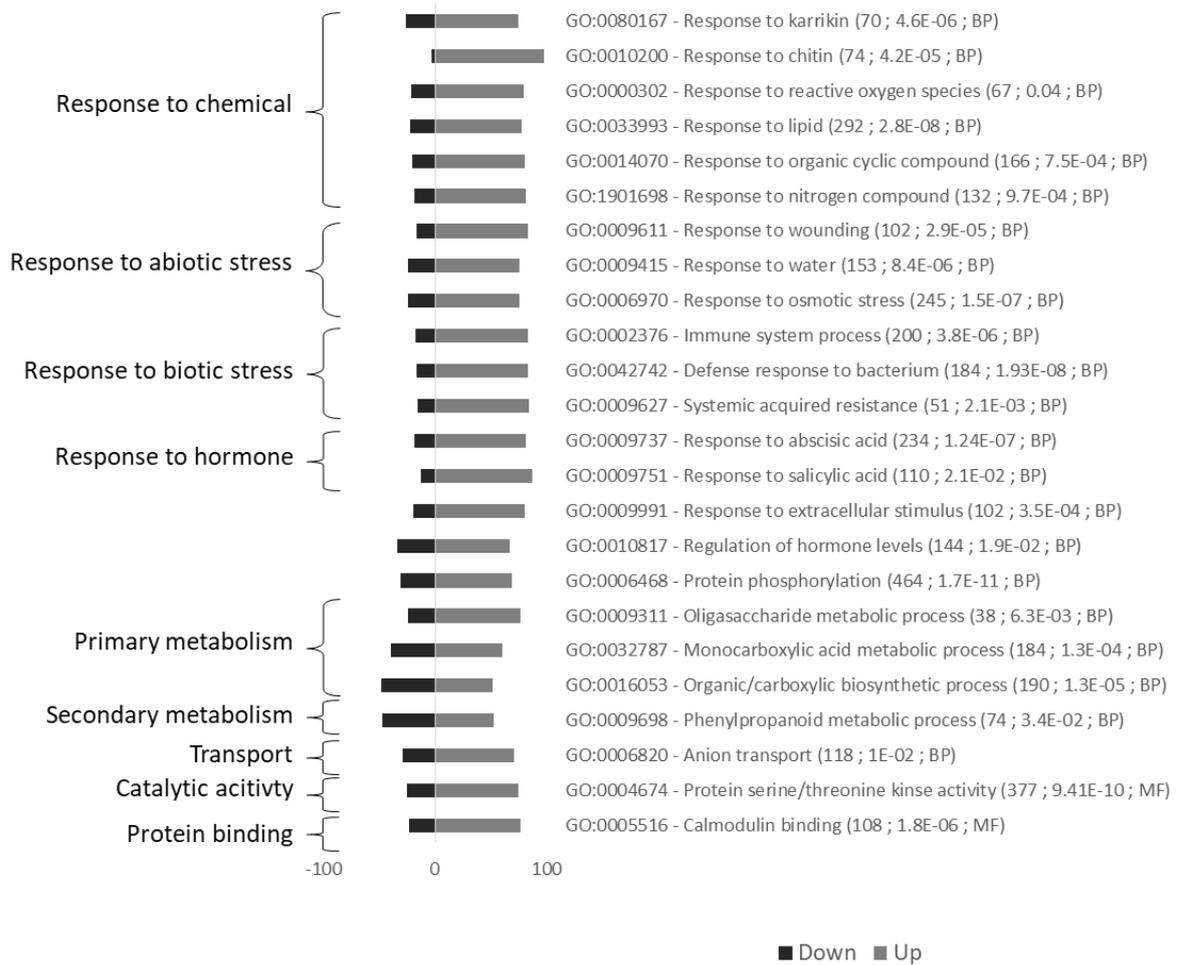
**Figure 27 : Gene Ontology (GO) enrichment analysis for the comparison of constitutive gene expression in the uninfested resistant Rubira compared to the susceptible GF305.** Bars indicate the percentage of upregulated genes associated to GO terms. A total of 217 markers were mapped in this enrichment analysis. GO terms with at least a 1.5-fold over-representation and an enrichment adjusted p.value lower than 0.05 are presented. For each GO term, details are given in parentheses: (i) number of *P. persicae* GO annotated genes, (ii) adjusted p.value of enrichment, (iii) GO groups (BP : Biological process).

The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor BEE3 is a positive and early regulator of BR signalling (Friedrichsen *et al.*, 2002), interacting with PAR1 to promote hypocotyl elongation during shade avoidance syndrome (Cifuentes-Esquivel *et al.*, 2013)

Seven other DEGs have been reported to respond to BR. *Prupe\_7G268600* and *Prupe\_7G268900* are two homologs of *AER*, coding for enzymes catalyzing the  $\alpha,\beta$ -hydrogenation of reactive carbonyls, are BR-regulated and participate in plant resistance to oxidative stress (Mano *et al.*, 2005). Several DEGs are homologs of Arabidopsis genes regulated by BRs and also regulated by auxin, like *EOD3*, *KRP1* and *BEE3* (Gupta *et al.*, 2015). *EOD3* encodes the cytochrome P450 monooxygenase 78A6, repressed 3 hours after brassinolide treatment (Goda *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006) and found to enhance reproductive organ and seed size in Arabidopsis by inducing cell proliferation and expansion (Fang *et al.*, 2012). *KRP1* is a Calcium binding EF-hand family protein linked to calcium homeostasis during the photoperiod and possibly controlling the diurnal sucrose synthase activity (Solomon *et al.*, 2010). Three more genes can be associated with BRs: the ortholog of *AT2G30070* (potassium transporter *KUP1*), mainly expressed in Arabidopsis roots and repressed in Arabidopsis leaves 3 hours after brassinolide treatment (Winter *et al.*, 2007), and 2 genes related to both BR and glucose signalling, the respective orthologs of *AT4G21970* and *AT3G60650*, both of unknown function but induced by brassinolide and modulated by glucose treatments (Gupta *et al.*, 2015).

#### 3.4.3. Auxin and ethylene related genes

Five genes upregulated in GF305 48 hpi have been related to auxin and/or ethylene. A putative cellulose synthase responsible for the hemicellulose formation allowing the fibers cellulose bridging, possibly related to the auxin-dependent cell wall extensibility for cell elongation (Majda and Robert, 2018). The ortholog of the Ethylene responsive factor *ERF17* (*Prupe\_7G194400*, ortholog), a target of the bZIP HY5 transcription factor that regulates photomorphogenesis through the control of genes linked to phytochromes, auxin, ethylene and gibberellin (Desai and Hu, 2008). Moreover, *ERF17* was also affected by OPDA treatment, as described by Taki *et al.*, (2005). Another putative ethylene responsive factor is *ERF012* (*Prupe\_1G500900*), encoding a transcriptional activator involved in the regulation of plant development and tolerance to abiotic stresses (Krishnaswamy *et al.*, 2011).



**Figure 28 : Gene Ontology (GO) enrichment analysis for the comparison of gene expression variations induced by *M. persicae* infestation of *Rubira*. A. Upregulated genes.** Bars indicate the percentage of genes up- or down-regulated associated to GO terms. A total of 3376 markers were mapped in this enrichment analysis. GO terms with at least a 1.5-fold over-representation and an enrichment adjusted p-value lower than 0.05 are presented. For each GO term, details are given in parentheses: (i) number of *P. persicae* GO annotated genes, (ii) adjusted p-value of enrichment, (iii) GO groups (BP : Biological process ; CC : Cellular compartment ; MF : Molecular Function).

*Prupe\_6G222600*, ortholog to a probable *HLS1-like* gene, is possibly involved in the regulation of sugar-dependent signalling, via the negative control of the auxin-dependent regulatory pathway (Ohto *et al.*, 2006) and finally the *AT4G29780* ortholog, coding for a protein that was suggested to interact with RGS1 and NDL1, both of which part of a multimeric protein complex that regulates the auxin transport at the membrane level during lateral roots formation (Visscher *et al.*, 2015).

#### 3.4.4. ABA-related genes

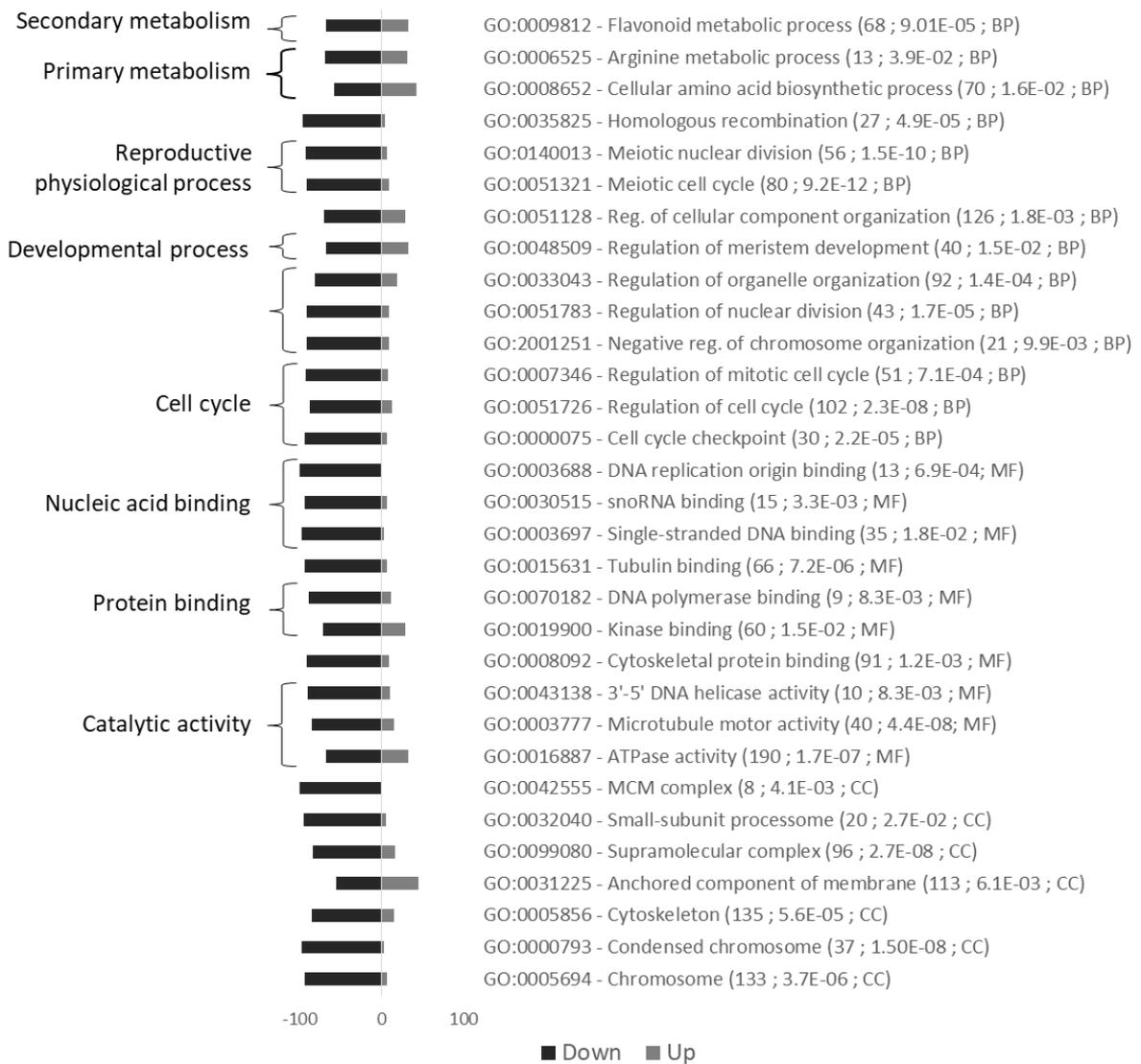
Several genes associated with ABA signalling and water deficit management were overexpressed 48 hpi. *Prupe\_7G124100* is a homolog of the *UDP-glycosyltransferase 73C3*, whose induction has already been reported after *Arabidopsis* infestation by *M. persicae* (Kerchev, 2011). Among the upregulated genes *Prupe\_8G213800* and *Prupe\_8G214100* are two homologs of the *ABCCG40* transporter gene encoding *PDR12*, which is involved in ABA uptake and modulates camalexin secretion in *Arabidopsis* after infection by the necrotrophy *Botrytis cinerea* (He *et al.*, 2019). Finally, *Prupe\_2G289500* is the ortholog of *DREB1D*, coding for a transcription factor mediating the expression of ABA- and dehydration-inducible transcription (Vonapartis *et al.*).

#### 3.4.5. Metabolites

Only twelve metabolites showed statistically significant variations after infestation (Appendix 10). All of them decreased: glutamate, threonine and nine secondary metabolites related to defense, including caffeoyl-prunasin, caffeoylquinic and dicaffeoylquinic acids and coumaroyl-acetyl-sucrose esters (Appendix 13).

### 3.5. Responses to infestation in the resistant genotype

24 GO terms including stress and metabolism were mostly upregulated and 31 GO terms including cell division were mostly downregulated in Rubira after infestation (Figure 28 and 29).



**Figure 29 : Gene Ontology (GO) enrichment analysis for the comparison of gene expression variations induced by *M. persicae* infestation of *Rubira*.** Downregulated genes. Bars indicate the percentage of genes up- or down-regulated associated to GO terms. A total of 3376 markers were mapped in this enrichment analysis. GO terms with at least a 1.5-fold over-representation and an enrichment adjusted *p*-value lower than 0.05 are presented. For each GO term, details are given in parentheses: (i) number of *P. persicae* GO annotated genes, (ii) adjusted *p*-value of enrichment, (iii) GO groups (BP : Biological process ; CC : Cellular compartment ; MF : Molecular Function).

### 3.5.1. Repression of cell division and growth

Most downregulated DEGs were associated to GO terms in cellular component (GO:0005575), Molecular function (GO:0003674) and regulation process (GO:0050789) (Figure 29). These genes are operating in the many processes of cell division and growth, including supramolecular complex (GO:0099080), chromosomes (GO:0005694), condensed chromosomes (GO:0000793), cytoskeleton (GO:0005856) and protein complexes such as the mini-chromosome maintenance (MCM) complex (GO:0042555), a protein complex necessary for the initiation and regulation of DNA replication (Tuteja *et al.*, 2011), or the small-subunit processome (GO:0032040), a preribosomal complex required for the 18S ribosomal RNA biogenesis (Bernstein *et al.*, 2004). The molecular functions involved concern ATP hydrolysis activity (GO:0016887), and interaction with nucleic acids for DNA replication, RNA transcription, and cell division, such as DNA polymerase binding (GO:0070182) and single-stranded DNA binding (GO:0003697). The downregulated genes are also associated to the regulation of cell cycle (GO:0051726), Meristem development (GO:0048507), reproductive functions (Meiotic cell cycle GO:0051321 and meiotic nuclear division GO:0140013). Accordingly, many homologs genes coding for ribosomal proteins were downregulated, such as *Prupe\_7G102700*, *Prupe\_6G300200*, and *Prupe\_6G236800*, the respective orthologs of *RPS14C*, *RPL17* and *RPL12A* (Appendix 7).

### 3.5.2. Induced expression of immune receptor genes

The genes associated with the protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674) and the calmodulin binding (GO:0005516) were mostly upregulated (Figure 28). Biotic stress is first perceived by transmembrane protein kinases, such as RLKs, comprising an extracellular domain that perceives stimuli and an intracellular domain transmitting information to several cytoplasmic protein kinases subfamilies: mitogen-activated protein kinases (MAPKs), calcium-dependent protein kinases (CPKs) and calcineurin B-like proteins (CBLs) (Kurusu *et al.*, 2010); (Tang *et al.*, 2017). Many genes coding for these proteins were upregulated in Rubira after infestation, probably involving reactive oxygen species (ROS)-mediated signal transduction, since response to reactive oxygen species (GO:0000302) genes were also over-represented. Homologs of typical *PRR* genes involved in PTI were activated (Appendix 7), like

*Prupe\_4G029800*, an homolog of *CLRK1/CLRK2* in Arabidopsis and homolog of *Csa5M642150* in cucumber, identified as a candidate for resistance to *A. gossypii* (Liang *et al.*, 2016). *Prupe\_1G542300* is the ortholog of *RLK7*, a cell surface receptor which triggers immune response upon detection of the PAMP-induced secreted peptide 1 (PIP1) and controls the accumulation of ROS detoxifying enzymes such as the superoxide dismutase (Pitorre *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2014). *Prupe\_3G213100* and *Prupe\_5G001000*, orthologs of chitin elicitor receptor kinase 1 (*CERK1*) and Lysin motif-containing receptor-like kinase 5 (*LYK5*) respectively, both involved in chitin detection (Erwig *et al.*, 2017), were up-regulated as well. *Prupe\_1G558900* encoding a homolog of the co-receptor *BAK1*, involved in brassinosteroid signalling and PTI, through its association with *BRI1* or *FLS2* respectively (Li *et al.*, 2002, Chinchilla *et al.*, 2007), was upregulated, as well as *BKI1* (Wang and Chory, 2006) and homologs of *FLS2* (Gómez-Gómez and Boller, 2000). On the contrary *Prupe\_5G041700*, ortholog of *BSK2* involved in BR signalling, was downregulated (Tang *et al.*, 2008). Other genes encoding receptor kinases, the *WAKs* (Wall-associated kinases, like *Prupe\_4G093300*, the ortholog of *WAK2*) and *WAKLs* (WAK-like, such as *Prupe\_7G145100*, the ortholog of *WAKL14*) were differentially expressed after infestation, with 14 out of 15 being overexpressed and only one repressed.

Many NLR genes were also up-regulated as *Prupe\_1G389500*, the ortholog of *ADR1-like1*, and seven homologs of *NRG1* (Appendix 7). They code for cytosolic CNLs, working downstream in parallel branches as helpers of TNLs necessary for TNL-mediated immunity (Wu *et al.*, 2019). These proteins associate with nucleocytoplasmic lipase-like proteins as *EDS1* and *PAD4* or *SAG101*, that enhance TNL responses (Lapin *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). The orthologs of *EDS1* (*Prupe\_5G181000*), *PAD4* (*Prupe\_4G276500*) and *SAG101* (*Prupe\_3G279300*) were all upregulated in infested Rubira (Appendix 7). In addition, *Prupe\_7G160100*, the ortholog of the CNL *ZAR1*, was also overexpressed, as were several homologs and orthologs of the associated RLCKs *ZED1*, *RKS1* (*Prupe\_8G149400*) and *PBL2* (*Prupe\_1G270700*) (Duxbury *et al.*, 2021)

It is also worth mentioning the impact of infestation on the expression of lectin receptor-like kinases genes (*LecRLKs*). A total of thirty-four *G-type LecRLKs* and nine *L-type RLKs* genes were differentially expressed after infestation, thirty G-type and nine L-type being upregulated. G-type and L-type lectin *LecRLKs* are transmembrane receptors with an intracellular kinase domain (Bellande *et al.*, 2017).

They belong to the vast family of lectins, containing a binding site with high affinity for free carbohydrates and glycoproteins although L-type lectins are thought to lack such activity.

### 3.5.3. Upregulation of ROS signalling, phosphorylation cascades and HR

Downstream, defense signal transduction mechanisms were activated in Rubira. Upregulated MAPK phosphorylation cascades included *Prupe\_1G564100* an homolog of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducible gene *MEKK1*, which in turn induced *MPK4* (*Prupe\_2G175200*, ortholog) expression (Pitzschke *et al.*, 2009). These two central regulators of redox homeostasis in plants control detoxification enzymes, such as the catalase *CAT2* (*Prupe\_5G011300*, ortholog) and can induce expression of *WRKY53* (*Prupe\_5G117000*) (Pitzschke *et al.*, 2009b), a transcription factor responding to infection or abiotic stress (Hu *et al.*, 2012). Other peach genes encoding protein kinases subfamilies: *CPK*, *CBL* and CBL-interacting protein kinases (*CIPKs*) were also strongly represented and generally induced. These proteins share a Ca<sup>2+</sup> activated EF-hand motif and a kinase domain triggering phosphorylation events (Marcec *et al.*, 2019). *CPKs* can activate respiratory burst oxidases (RBOH), such as RBOHF, a family of NADPH-oxidase producing O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the apoplast, which turns into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, either spontaneously or by the action of a superoxide dismutase (Kimura *et al.*, 2017). NO signalling activation was also detected, with the upregulation of the Nitrate reductase 1 ortholog (*NR1*, *Prupe\_1G505400*).

The presence of necrotic spots near the secondary veins and on the stems indicates the establishment of a hypersensitive response (HR). This was associated to the transcriptional upregulation of genes involved in Response to reactive oxygen species (GO:0000302), Protein phosphorylation" (GO:0006468) and Anion transports (GO:0006820) (Figure 28), which are rapid events generally preceding HR. Orthologs of important HR genes were upregulated, like the orthologs of *HIR 1*, *HIR2* and *HIR4* encoding hypersensitive-induced reaction (HIR) proteins members of the PID (Proliferation, Ion and Death) superfamily, involved in the development of spontaneous lesions (Choi *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2011). Other HR markers were *Prupe\_7G158900*, the ortholog of *HSR4* (Zhang *et al.*, 2014) and *Prupe\_7G097100* the ortholog of *NHL1*, a member of NDR1/HIN1-like (NHL) gene family including *NDR1* in Arabidopsis (Knepper *et al.*, 2011), required for HR and resistance conferred by R genes and *HIN1*, initially identified in tobacco as an HR marker based on its induction by harpins (Pontier *et al.*, 1999).

de Angeli *et al.* (2007) revealed the involvement of anionic fluxes in the alert signal transduction which are essential for the establishment of HR. The anions may associate with calcium signalling to depolarize the membrane and cause gradual water loss leading to cell shrinkage characteristic of hypersensitive reactions. Our data support this statement as well, since 66% of DEGs involved in anion transport were overexpressed after infestation of the resistant genotype post-infestation (Figure 28). The ortholog of *NLS1*, which encodes a protein of the MACPF (Membrane attack complex component/perforin) family whose KO in *Arabidopsis* causes spontaneous cell death (Noutoshi *et al.*, 2006), was overexpressed, as well as the ortholog of *MIEL*, encoding an E3 ubiquitin ligase that can specifically tag and degrade the transcription factor MYB30, a positive regulator of HR, supporting the hypothesis of a tight HR control (Doroodian and Hua, 2021).

#### 3.5.4. Rebalancing of phytohormones pathways

In aphid-infested Rubira, 84 % of the DEGs classified in SAR (GO:0009627) were upregulated, including *EDS1*, a positive regulator of HR and SAR through salicylic acid signalling (Gao *et al.*, 2015; Dongus and Parker, 2021). Moreover, one of the nine repressed genes in this GO category was *SN1*, which encodes a core protein capable of suppressing the expression of PRs and more generally of SAR (Li *et al.*, 1999).

SAR is controlled by two immune pathways, one involves salicylic acid (SA) and PR proteins, the other pipecolic acid. The activation of the SA pathway was demonstrated by accumulation of SA and SAG in Rubira 48 hpi (Appendix 7 and Appendix 14) as well as the overexpression of 87 % of salicylic acid response genes (GO:0009751) and homologs of *PR-1*, *PR-4*, *PR-5* and *PR-10* (MLPs). The transcription of many genes implicated in SA regulation was impacted, like *Prupe\_7G267900*, the ortholog of *SGT1* coding for a glycosyltransferase catalyzing the formation of SAG and SA glucose ester (SGE), *Prupe\_7G142200* and *Prupe\_6G168500*, the respective orthologs of *MES1* and *SAMT1* involved in the production of methyl-salicylate (MeSA). Upstream, the ortholog of a gene encoding a transcription factor recruited in the promoter of many SA and PR biosynthesis genes, *SARD1* (*Prupe\_5G22360*), was upregulated (Sun *et al.*, 2015), as well as homologs of *CBP60b*, that positively regulates immunity genes (Li *et al.*, 2021a) and *SARD1* (Huang *et al.*, 2021). The ortholog of *WRK70* (*Prupe\_2G265000*), a transcription factor involved in SA

signaling (Wang *et al.*, 2006) and already found to be required for the resistance to aphids and nematodes mediated by *Mi-1* in tomato (Atamian *et al.*, 2012). By contrast, the homolog of *NPR1*, that promotes SA synthesis and signalling (Zhang *et al.*, 2006) was not differentially expressed while the homologs of its cofactor *TGA6* and its repressor *NPR3* were upregulated. Similarly, *NIMIN-1* and *NIMIN-2* orthologs, coding proteins that can physically interact with *NPR1* to regulate its functions (Joglekar *et al.*, 2018), were differentially expressed after infestation. The second SAR pathway depends on the accumulation of *N*-hydroxy-pipecolic acid (NHP) (Návarová *et al.*, 2012; Hartmann and Zeier, 2018). NHP could not be detected in this study but its direct precursor, pipecolic acid, was found to accumulate 48 hpi in Rubira (Appendix 14). Orthologs of NHP biosynthetic pathway genes were all upregulated: *ALD1* (*Prupe\_1G558600*), coding for an aminotransferase that catalyzes the first step of lysine catabolism to  $\epsilon$ -amino- $\alpha$ -keto caproic acid; *SARD4* (*Prupe\_2G302000*), which allows the formation of pipecolate from  $\Delta$ 1-piperidine-2-carboxylate; and *FMO1* (*Prupe\_7G193500*) allowing the hydroxylation of pipecolate to NHP. Finally, a global regulation of SAR was also suggested by the overexpression of the transcription factor *WRKY33* (Barco and Clay, 2020; Wang *et al.*, 2018a).

The response of Rubira to infestation enriched four boxes tightly related to other phytohormones: Regulation of hormone levels (GO: 0010817), Response to wounding (GO:0009611), Response to ABA (GO: 0009737) and Response to osmotic stress (GO:0006970) probably related to observations of leaf wilt. Jasmonic acid (JA) and its derivatives are major biotic stress phytohormones, responding notably to wounding and necrotrophs attacks (Acosta and Farmer, 2010). Two genes involved in JA biosynthetic pathway were upregulated: an homolog of *AOC4* (*Prupe\_3G239900*), catalyzing the production of the JA precursor 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) and the ortholog of *JAR1* (*Prupe\_2G184100*), catalyzing the adenylation of jasmonate to jasmonate-isoleucine (JA-Ile) (Ruan *et al.*, 2019). The probable implication of jasmonates is also supported by the upregulation of the orthologs of *COI1*, playing a central role in the JA signalling pathway (Chini *et al.*, 2009) and *RGLG3*, coding for an E3 ubiquitin-protein ligase acting as an upstream modulator of JA signalling (Zhang *et al.*, 2012). The JA-related molecules changed consistently: OPDA, increased in both genotypes from 0 to 12 hpi and remained high until 48 hpi, while JA and JA-Ile also increased early but displayed a second phase of increase between 24 and 48 hpi (Appendix 14).

However, these responses at metabolite level were not specific to Rubira, since similar patterns were observed in GF305 post-infestation.

The induction of many genes associated to Response to abscisic acid (GO: 0009737) was observed. The orthologs of key enzymes for ABA biosynthesis, *NCED3* and *ZEP*, were upregulated 48 hpi. Moreover, genes encoding ABA signalling regulators were upregulated: the ortholog of *GPX3*, encoding a glutathione peroxidase-like involved positively in ABA signalling; an homolog of *CPK12*, a regulator of the calcium-mediated ABA signalling pathway (Zhao et al., 2011); the ortholog of *OST1*, a ROS/ABA dependent activator of RBOHF (Mittler and Blumwald, 2015) and the ortholog of *NHL6* (Bao et al., 2016). The upstream ortholog of ABA receptor *GCR2* was also overexpressed, as well as the downstream transcription factor *ABF3*, whose product binds to the promoter of ABA-inducible genes. These results however contrast with the trends observed in ABA accumulation. ABA increased early after infestation in both genotypes, but then decreased back to the initial level 24 hpi in Rubira plants only.

Despite the lack of significant change in indole-3-acetic acid (IAA) level observed in Rubira after infestation (Appendix 14), the auxin signalling pathways was reconfigured to some extent at the transcriptional level (Appendix 7). *PINs* auxin efflux carriers genes orthologs were downregulated, as well as an ABC transporter, *BIG GRAIN LIKE 1* proteins while positive auxin regulators like *PID*, *ICR1*, *NDL2* or *RNJ*, while *ISS1*, *RGLG2*, *PILS2*, *APM1* and *AVP1* were upregulated. The indole-3-pyruvate monooxygenases orthologs *YUCs* (Cao et al., 2019) and *AAE18* and *MS17*, involved in auxins biosynthesis, were differentially expressed. It is also worth noting the variations of several other phytohormone related genes. *Prupe\_5G106200*, the ortholog of *ACS6*, coding for a lyase catalyzing the biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), the precursor of ethylene, and of the Ethylene-responsive transcription factor 1B (*ERF1B*, *Prupe\_5G061800*), were upregulated, in line with the actual accumulation of ACC registered 48 hpi (Appendix 14 A). Finally, orthologs of *BZR1* (*Prupe\_1G382900*), a positive regulator of BR signalling pathways and *BRS1* (*Prupe\_7G264200*), a carboxypeptidase involved in BR signalling, were repressed after infestation.

### 3.5.5. Upregulation of autophagy

Several genes involved in autophagy were upregulated upon infestation. Autophagy-related 8 genes (e.g. *Prupe\_4G215300*, an *ATG8c* isoform) produce proteins that covalently attach to autophagic membranes and can bind autophagy receptors such as NBR1 (*Prupe\_5G165900*, homolog) to deliver cargo in vacuole for degradation (Kirkin *et al.*, 2009; Yoshimoto and Ohsumi, 2018). Other markers of autophagy include *Prupe\_8G193300*, the ortholog of *CHIP*, coding for a ubiquitin ligase and *Prupe\_7G106600*, the homolog of a heat shock protein HSC70-4 gene, which both mediate cytosolic protein aggregate degradation (Lee *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2014a).

### 3.5.6. Reconfiguration of central metabolism

A handful of metabolites and genes indicate that the central carbon metabolism was affected by infestation in Rubira (Appendix 11). Sorbitol level decreased massively 48 hpi (Appendix 15), while the upregulation of genes coding for several polyol transporters and sorbitol dehydrogenase (Nosarzewski *et al.*, 2012), converting sorbitol to fructose, suggest an active depletion of the sorbitol pool in infested apices.

On the contrary, glyoxylate accumulated 48 hpi and several DEGs indicate that the three pathways contributing to glyoxylate biosynthesis, *i.e.* photorespiration, the glyoxylate shunt, and purine catabolism, were all activated. The photorespiratory production of glyoxylate (Dellero *et al.*, 2016) is revealed by the accumulation of serine, the overexpression of the ortholog of serine-glyoxylate aminotransferase 1 (*AGT1*, *Prupe\_4G258800*) and homolog of glyoxylate oxidase (*GOX1*), while *Prupe\_3G048100*, the ortholog of the competing Glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 2 (*GLYR2*) and a homolog of Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase (*HPR3*) were repressed. A key enzyme of the glyoxylate shunt produces glyoxylate and succinate from isocitrate: the isocitrate lyase (ICL), whose ortholog gene, *Prupe\_3G219100*, was also overexpressed in rubira 48 hpi. This anaplerotic pathway shunts the tricarboxylic acid cycle and indeed, orthologs of the TCA cycle *ODH* (*Prupe\_4G216900*) and *MDH* (*Prupe\_4G170500*) were downregulated after infestation of Rubira. Consistently, citrate and glyoxylate increased and succinate and malate pool were reduced, confirming the downregulation of the TCA cycle in favor of the glyoxylate shunt.

The shunt is fed by fatty acid-derived acetyl-CoA, condensed onto oxaloacetate to produce citrate (Smith, 2002). In our data, the overexpression of orthologs of the long chain acyl-CoA synthase 7 (*LACS7*, *Prupe\_1G155800*), acyl-CoA oxidases (*ACX1* *Prupe\_5G065100*, *ACX2*, *Prupe\_6G181800*) and 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (*PED1*, *Prupe\_1G003300*), traduced the activation of lipid beta-oxidation. Moreover, the strong upregulation of *Prupe\_1G541200*, the ortholog of *PCK1*, revealed an activation of gluconeogenesis, a primary function of the glyoxylate shunt (Smith, 2002). The third pathway of glyoxylate production involves the degradation of purine (Werner and Witte, 2011), attested here by the overexpression of orthologs of allantate deaminase (*AAH*, *Prupe\_4G116700*), allantoinase (*ALN*, *Prupe\_4G045000*) and xanthine dehydrogenase 1 (*XDH1*, *Prupe\_4G245700*), the latter producing glyoxylate and urea, which both accumulated 48 hpi.

The reconfiguration of central N metabolism was massive, as 66% of DEGs in metabolic processes were linked to amino acids. Genes in the categories Arginine metabolic process (GO: 0006525) and Cellular amino acid biosynthesis process (GO: 0008652) were mostly downregulated (Figure 29). Indeed, in infested Rubira, the major amino acids involved in nitrogen assimilation and distribution were either stable, for aspartate and asparagine, or reduced for glutamate and glutamine (Appendix 15B and 16B). Decrease in glutamate could be related to the upregulation of *GDH2* ortholog (*Prupe\_2G269800*), and the decrease in glutamine could be linked to the upregulation of *GLT1* ortholog (*Prupe\_2G311700*) and the glutamine hydrolyzing asparagine synthetase ortholog (*ASN1*, *Prupe\_6G054800*). The strong overexpression of *ASN1* after infestation, while the asparagine pool remained constant, suggests the activation of a mechanism exporting nitrogen out of the infested apices. This hypothesis is supported by the upregulation of cationic amino acid transporter genes (*CATs*) and nitrate or ammonium transporter genes (*NPF*, *AMT1*). Nitrogen metabolism was also impacted at the level of the urea cycle, a pathway producing urea from arginine and recycling ornithine in the process (Winter *et al.*, 2015). Citrulline decreased 48 hpi but ornithine and arginine accumulated (Appendix 15C and 16C). Paradoxically, the upstream pathways participating in arginine biosynthesis were transcriptionally downregulated: *NAGK*, *CARB*, *OCT*, *ArgJ* and *ASSY* orthologs, whereas *ARGAH* homologs, involved in the last step turning arginine into ornithine and urea, were upregulated. Urea content actually increased, concomitantly with the overexpression of the *DUR3* ortholog *Prupe\_5G019100*, encoding an active urea transporter (Bohner *et al.*, 2015) as well as some aquaporin orthologs (*NIPs*)

allowing the passive transport of this molecule (Matiz *et al.*, 2019). The catabolism of ornithine was also activated toward the biosynthesis of proline, since the ortholog of the ornithine aminotransferase (*OAT*, *Prupe\_4G083300*) and a homolog of the pyrroline-5-carboxylate reductase (*PROC1*) were upregulated. Proline level however remained stable, perhaps because of the simultaneous transcriptional activation of its degradation via  $\Delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (*Prupe\_5G187700*, ortholog of *ALDH12A1*). The sulfur amino acid methionine and its precursor cystathionine were notably reduced after infestation (Appendix 15D) and consistently, genes involved in methionine biosynthesis and degradation, *i.e.* the orthologs of *MS1* and *MGL*, were respectively down- and upregulated.

The branched-chain amino acids (BCAAs) isoleucine, leucine and valine were accumulated in Rubira tissues after infestation, as well as the isoleucine precursor threonine (Appendix 16D). The genes coding for enzymes involved in early steps of biosynthesis were all downregulated by infestation: a homolog of *OMR1* and the ortholog of *ALS* (*Prupe\_5G043100*) for isoleucine, orthologs of *IMDH2* and *DHAD* for leucine and valine respectively. On the contrary, homologs of *BCAT3*, encoding the enzyme catalyzing the last step of BCAAs biosynthesis, were upregulated. Another discrepancy concerns histidine and lysine metabolism, since all DEGs involved were downregulated while histidine, lysine and its catabolites hydroxylysine and pipecolate accumulated (Appendix 16E). Beta-alanine and beta-aminoisobutyrate accumulation (BAIBA) (Appendix 16F) could be explained by the activation of the uracil degradation pathway (Parthasarathy *et al.*, 2019), with the upregulation of the dihydropyrimidase homolog (*PYD2*) and Beta-ureidopropionase ortholog (*PYD3*, *Prupe\_8G070200*).

Finally, it is worth mentioning the trace detection of aphid-induced alpha-aminobutyric acid (AABA) and sarcosine (N-methyl-glycine) (Appendix 16F). No DEG could be associated to these compounds.

### 3.5.7. Reconfigurations of secondary metabolism

Enrichment in the categories Phenylpropanoid metabolic process (GO: 0009698) and Flavonoid metabolic process (GO:0009812) underlines that significant modifications happened in secondary metabolism after Rubira was infested. The transcription of most DEGs implicated in the phenylpropanoid pathway was downregulated (Appendix 7). Upstream, the shikimic acid pathway genes involved in chorismic acid and aromatic amino

acids were downregulated with the exception of the chorismate mutase 2 *CM2* ortholog (*Prupe\_1G393400*). The two peach phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) genes were not differentially expressed, but the *CYP73A5* ortholog, *Prupe\_6G040400*, encoding a trans-cinnamate 4-monooxygenase producing coumaric acid from cinnamic acid and an homolog of *4CL3*, encoding a coumarate-coA ligase specifically involved in flavonoid biosynthesis (Li *et al.*, 2015b), were both repressed. Homologs of genes involved in the biosynthesis of hydroxycinnamoylquinic derivatives, *HCT* and *C3'H*, were also downregulated, as well as downstream genes from the entrance of the flavonoid pathway (ortholog of *CHS*, *Prupe\_1G003000*) to a homolog caffeoyl methyltransferase-like (*OMT1*) required for lignin syringyl (S) unit and sinapate esters formation (Goujon *et al.*, 2003). The only exception was the upregulation of the ortholog of *CAD4* (*Prupe\_8G135300*) and a homolog of *CAD7*, coding respectively for cinnamyl alcohol dehydrogenases catalyzing the last step of monolignols biosynthesis (Tronchet *et al.*, 2009) and for a NADPH-dependent aldehyde reductase converting (Z)-3-hexenal to (Z)-3-hexen-1-ol in Arabidopsis (Tanaka *et al.*, 2018). The metabolites however present a different pattern: while most flavonoids did not change in response to infestation, many hydroxycinnamoylquinic derivatives were accumulated (Appendix 17). Aromatic amino acids increased, as well as the simple phenylpropanoids caffeic acid and isoferulic acid. Quinic acid esters increased while their direct precursor, free quinic acid, decreased. Many of the phenylpropanoids accumulated 48 hpi were caffeic conjugates, like caffeoyl-feruloyl-quinic acid and especially 5 isomers of dicaffeoylquinic acid. Finally, a few coumaroyl-acetyl-glucose esters increased, as well as the defense cyanogenic glycosides prunasin and caffeoyl-prunasin derived from phenylalanine (Yamaguchi *et al.*, 2014; Shimomura *et al.*, 1987). Interestingly, contrary to what was observed in Rubira, some of these compounds were decreased in the susceptible genotype GF305 after infestation (Appendix 13).

## 4. Discussion

In this work, we assessed the transcriptomic and metabolomic responses 48 hpi by *M. persicae*, a main threat for horticultural and field crops, in its primary host, the peach tree. The two varieties studied, GF305, susceptible to infestation, and Rubira, carrying the major resistance gene *Rm2*, provided an opportunity to compare the molecular functions involved in susceptibility and resistance.

### 4.1. GF305 and Rubira showed highly contrasting transcriptomic and metabolomic responses to infestation

Large differences in the number of DEGs induced by aphid infestation between susceptible and resistant genotypes are found in the literature, but generally not to the same extent as in the present study, which involved 5424 DEGs in Rubira, *i.e.* 20 % of the coding sequences, and only 35 DEGs in GF305. In peach, a previous study compared the transcriptomic response to *M. persicae* of the resistant peach cultivar "Fen Shouxing", bearing the single dominant gene *Rm3*, to the response of a susceptible genotype (Niu *et al.* 2018). Infestation resulted in 1177 DEGs in the resistant line 48 hpi compared to the aphid-free control plants, *i.e.* almost 5 times less than in the present study, and 282 in the susceptible line, that is 8 times more than in the present study. In soybean (*Glycine max*) near-isogenic lines with *Rag5* alleles for resistance or susceptibility to *Aphis glycines*, 1391 DEGs were found 48 hpi in the resistant line compared to the aphid-free control, and only 99 in the susceptible line (Lee *et al.*, 2017). Similarly, 1523 DEGs were found 96 hpi in a sorghum line moderately resistant to the sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari*) and only 136 in a susceptible line (Serba *et al.*, 2021). Comparisons between studies should be made with caution since environmental conditions, plant age, genetic characteristics, initial number of aphids and RNAseq data filtering parameters, may not be identical across experiments. However, two differences are worth mentioning between the study of Niu *et al.* (2018) on *Rm3* and the present work on *Rm2*. The first one concerns the number of DEGs induced by infestation of the susceptible strain, which is much lower in our experiment. This could be explained by the very high susceptibility of GF305 to *M. persicae* (Sauge *et al.*, 1998a), and/or by the high pre-adaptation of the aphids, since they were reared on this genotype before the experiment. Indeed, aphids

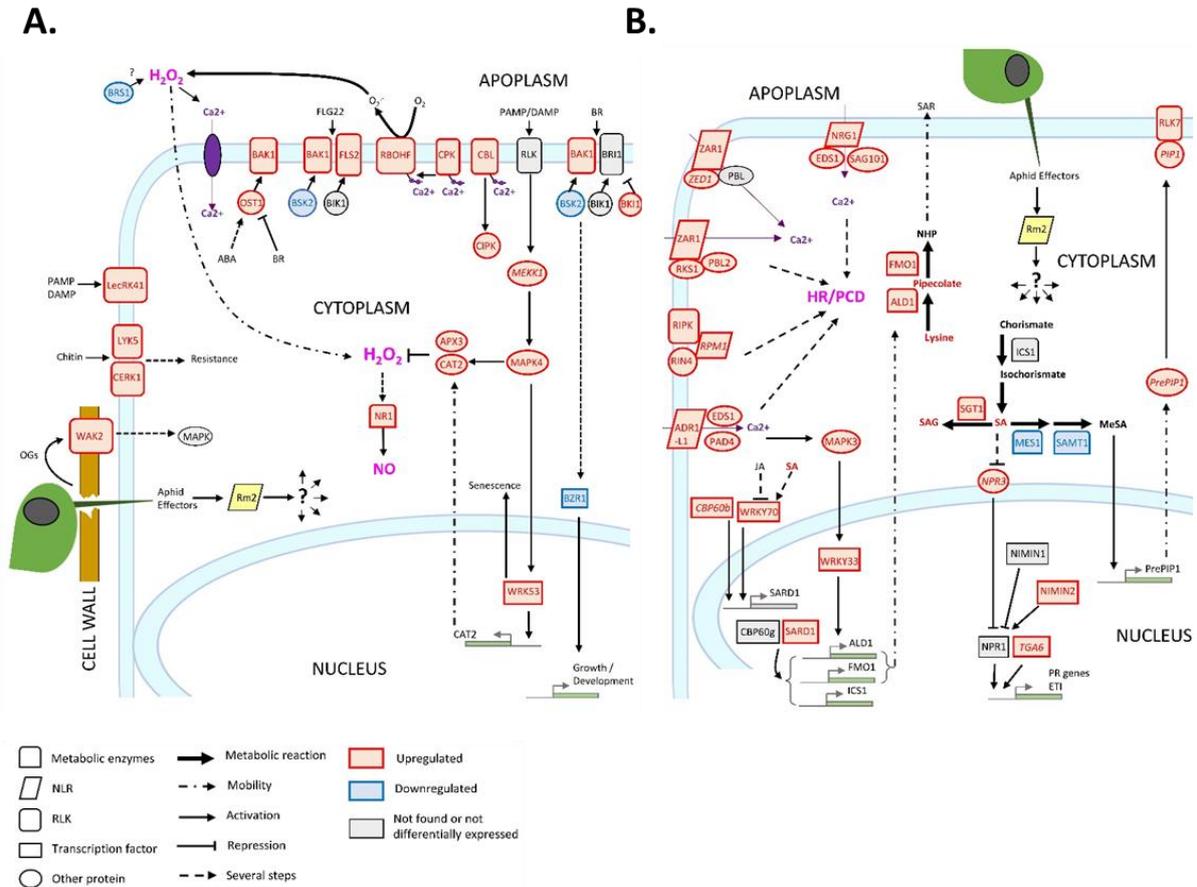
continuously adapt their behavior to the plant characteristics, like their resistance level (Pompon and Pelletier, 2012; Jhou *et al.*, 2021). Their experience on the plants they are reared on modulates their physiology temporarily, like duration of phloem intake, probing frequency, salivation duration (ten Broeke *et al.*, 2014) and the gene expression level of particular effectors related to host utilization (Eyres *et al.*, 2016; Thorpe *et al.*, 2020). The second difference concerns the number of repressed DEGs in the infested resistant line: Niu *et al.* (2018) found only a small proportion of repressed genes (between 6 % 12 hpi and 38 % 72 hpi), whereas half of the DEGs of the resistant genotype Rubira were repressed by infestation in our experiment. This difference is due to the repression of hundreds of genes involved in metabolism and cell division (Figure 29), in probable relation with the strong inhibition of plant elongation measured post infestation in our experiment.

#### 4.2. GF305 weak response to infestation may reflect manipulation by *M. persicae*, repressing defense and promoting growth

The very limited transcriptional response of the susceptible genotype 48 hpi included only one underexpressed gene: Prupe\_5G025300, a homolog of the CNL *RPM1*, a R-protein triggering HR-mediated defense against *P. syringae* (Kim *et al.*, 2009). In Arabidopsis, *RPM1* was found to interact functionally with the important defense protein *RIN4*, which is activated by an *RPM1*-induced protein kinase (*RIPK*) (Liu *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011). Prupe\_5G025300 and 12 other *RPM1* homologs, as well as the *RIN4* ortholog Prupe\_8G19980 and the *RIPK* ortholog Prupe\_7G198400, were upregulated in Rubira after infestation, which might lead to the detection of a particular aphid effector, thereby activating a set of defense responses controlled by *RPM1*, while by contrast, *RPM1* downregulation and *RIN4* and *RIPK* not being differentially expressed in GF305 could traduce a neutralization of defense mechanisms by the aphid.

The infestation impacted genes related to growth and development hormones in GF305. Two genes in particular, *EXORDIUM* and *BEE3* are regulators of BR signalling pathways, a class of hormone that control plant growth and development by modulating the expression of a large number of genes involved in the cell elongation, division and differentiation, cell walls modification and photomorphogenesis (Sun *et al.*, 2010). BRs were also found to act on plant resistance to multiple stresses such as drought, temperature variation, salinity and pests (Anwar *et al.*, 2018).

*EXORDIUM* is essential for the apices and roots growth *via* the control of carbon metabolism (Lisso *et al.*, 2013) and is also strongly involved in response to herbivores: De Vos *et al.* (2005) and Mohanta *et al.* (2012) showed an over-expression of this gene 24 hours after *M. persicae* infestation in *Arabidopsis* and 4 hours after cotton leafworm *Sodoptera littoralis* infestation in *Ginkgo biloba*. Several BR-inducible genes were also found inducible by auxin (Gupta *et al.*, 2015), an hormone involved in cell elongation and therefore directly regulating plant growth and development: *BEE3*, a photomorphogenic repressor gene involved in shade avoidance by promoting hypocotyls growth (Cao *et al.*, 2022), *KRP1/CMI1*, coding for a morphogenesis controller at the crosstalk of auxin and  $Ca^{2+}$  signalling (Hazak *et al.*, 2019), and the ortholog of the senescence regulator *AT4G21970*. A synergistic effect of BR and glucose treatment on *KRP1* expression was reported by Gupta *et al.* (2015) and besides BR and auxin, it also appears to be controlled by OPDA (Taki *et al.*, 2005) and induced by a TINY factor responding to abiotic stresses such as drought or cold (Sun *et al.*, 2010). Interestingly, though not statistically significant, an increase in IAA level was registered in GF305 24 and 48 hpi, while in Rubira IAA constantly dropped after infestation (Appendix 14). A correlation between high auxin levels and sensitivity to the phloem feeder Brown planthopper was recently reported by Zhang *et al.*, (2022b). In the present work, the upregulation of auxin responsive genes, like the putative hemicellulose synthase *Prupe\_3G214400*, could indicate an aphid-induced cell elongation and therefore a stimulation of growth in the susceptible genotype. Overall, many of these transcriptional responses observed in GF305 are not specific to this genotype, as they were also observed in Rubira (Supplementary tables S6 and S7). The overexpression of several growth-related hormones genes both in susceptible and resistant genotypes are manifestations of the complex interplay between defense activation, resources allocation and growth at stake during aphid infestation, that could either indicate a role in defense or the activation of a local physiological sink beneficial to the aphid (Züst and Agrawal, 2016). In this respect, the metabolic profiles of GF305 did not show any significant change in the levels of primary metabolites that could improve the diet of the aphids, but rather a decrease in a single metabolite, glutamate (Appendix 10), which may be nutritionally important (Dadd and Krieger, 1968). Given the maintenance of plants elongation over 7 days (Figure 23E) and the stability of nutrient metabolite levels 48 hpi, excepted glutamate, while the aphid population was increasing, the reduction in glutamate levels could be interpreted as a the symptom of a relative local depletion of the plant's nitrogen resources.



**Figure 30 : Transcriptional regulation of ETI, PTI, HR and SAR in Rubira 48 hours after infestation with *M. persicae*.** **A.** PTI genes. **B.** ETI genes. Genes are annotated according to their Arabidopsis orthologs, non-orthologs (homologs) are noted in italics. Upregulated genes/metabolites are figured in red, downregulated genes/metabolites in blue and not found or not differentially expressed genes/metabolites in black. BIK1, Botrytis induced kinase 1; BRI1, Brassinosteroid insensitive 1; ICS1, Isochorismate synthase 1; NPR1, Nonexpresser of PR genes 1; OST1, Open stomata 1; RIN4, RPM1-interacting protein 4; RPM1-induced protein kinase; Disease resistance protein RPM1; PCD, programmed cell death; ADR1-LIKE 1, Activated disease resistance 1 like 1; ALD1, AGD2-like defense response protein 1; APX3, Ascorbate peroxidase 3; BAK1, Brassinoid insensitive 1-associated receptor kinase 1; BIK1, BRI1 kinase inhibitor 1; BRS1, BRI1 suppressor; BSK2, Brassinosteroid-signaling kinase 2; BZR1, Protein BRASSINAZOLE-RESISTANT 1; CAT2, Catalase 2; CBL10, Calcineurin B-like protein 10; CBP60B, Calmodulin-binding protein 60 B; CERK1, Chitin elicitor receptor kinase 1; CIPK25, CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 25; CPK12, Calcium-dependent protein kinase 12; EDS1, Enhanced disease susceptibility 1; FLS2, Flagellin sensitive 2; FMO1, Probable flavin-containing monooxygenase 1; LECRK41, L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1; LYK5, LysM-containing receptor-like kinase 5; MEK1, Mitogen-activated protein kinase kinase 1; MEK2, Mitogen-activated protein kinase kinase 2; MES1, Methyl esterase 1; MPK3, Mitogen-activated protein kinase 3; MPK4, Mitogen-activated protein kinase 4; NIMIN1, NIM1-interacting 1; NIMIN2, NIM1-interacting 2; NPR3, NPR1-like protein 3; NRG1, Probable disease resistance protein; PAD4, Lipase-like PAD4; PIP1, PAMP-induced secreted peptide 1; RBOHF, Respiratory burst oxidase homolog protein F; RLK7, Receptor like protein kinase 7; SAG101, Senescence associated gene 101; SAMT1, S-adenosylmethionine transporter 1; SARD1, Protein SAR deficient 1; SGT1, Salicylic acid glucosyltransferase 1; TGA6, TGACG motif-binding factor 6; WKRY33, Transcription factor WKRY33; WKRY53, Transcription factor WKRY53; ABA, Abscisic acid; SA, Salicylic acid; SAG, Salicylic acid glucoside; OGS, oligogalacturonides; PAMP, Pathogenesis-associated molecular pattern; DAMP, Damage-associated molecular pattern.

It is also possible that glutamate reduction impaired defense, since this compound is involved in long distance wounding signalling (Toyota *et al.*, 2018). The observed decrease in the pool of defense compounds such as caffeoyl derivatives also supports the hypothesis of efficient manipulation of metabolism orchestrated by *M. persicae*. Aphids are stealthy herbivores, inducing little structural damages and actively suppressing plant recognition by secreting salivary effectors. A recent genome analysis revealed an estimated 240 putative salivary effectors in *M. persicae*. Some effectors can prevent the occlusion of sieve tube elements, a major resistance factor against aphids (Will *et al.*, 2007), while Mp10 was proved to suppress the oxidative burst induced by elicitation (Bos *et al.*, 2010). Overall the susceptibility is manifested by a quasi-absence of transcriptional response and a controlled inhibition of plant defenses by *M. persicae* in GF305, in contrast with the massive activation of defense responses observed in the resistant genotype.

#### 4.3. The *Rm2* gene triggered ETI, PTI and SAR upon infestation

Three genes conferring high-level resistance to *M. persicae*, *Rm1*, *Rm2* and *Rm3*, have been detected in peach so far, located in the same genomic region at the bottom of chromosome 1 (Lambert and Pascal, 2011); (Pascal *et al.*, 2017); (Niu *et al.*, 2016). These three overlapping regions contain TNL candidate genes (Pan *et al.*, 2022, Poëssel *et al.*, personal communication) which are likely receptors activated by an *M. persicae* saliva effector that triggers ETI. In the present study, *Rm2* activation by *M. persicae* seems to have triggered coordinated processes in a dynamic network of ETI, HR, Pipecolate, SA-mediated SAR and PTI, contributing to aphid resistance (Figure 30).

Downstream consequences of *Rm2* activation involved the helper NLRs ADR1-L1 and NRG1, whose peach orthologs were overexpressed upon infestation of Rubira. ADR1 interacts with the lipase-like EDS1 and PAD4 to activate SAR and was recently found to localize at the plasma membrane by interacting with phospholipids, whereas NRG1 interacts with EDS1 and SAG101 to activate programmed cell death (PCD) (Saile *et al.*, 2021; Collier *et al.*, 2011; Lapin *et al.*, 2019). The peach orthologs of *EDS1*, *PAD4* and *SAG101* were also overexpressed in infested Rubira and could play a major role in the activation of the resistance to *M. persicae*. The peach ortholog of *SARD1* and a close homolog of *CBP60b* were overexpressed. The transcription factor *SARD1* is thought to act downstream of EDS1 and PAD4 (Wang *et al.*, 2011), by binding to the promoters of defense genes, notably *ALD1*, *FMO1* and *ICS1*, directly

involved in the biosynthesis of pipicolate and SA (Sun *et al.*, 2015). SARD1 is also under the control of transcription factors such as CBP60b and WRKY70 (Chen *et al.*, 2021), both overexpressed in Rubira upon infestation and the latter found to be upregulated by SA and downregulated by JA (Atamian *et al.*, 2012). These observations are well in line with the overexpression of *ALD1*, *FMO1* and the accumulation of pipicolate discussed below, demonstrating the activation of SAR. Infestation also induced overexpression of the ortholog of another NLR coding for *ZAR1*, which does not require a helper (Adachi 2019) but whose molecular association with kinases was recently discovered (Bi and Zhou, 2021): ZED1, a decoy pseudokinase that captures a *Pseudomonas* effector (Lewis *et al.*, 2013) and ZAR1/RKS1, which has been shown to recognize PBL2 (Wang *et al.*, 2015a) and form a pentameric calcium-permeable complex associated to the membrane, the resistosome, that promotes cell death when activated by an effector (Wang *et al.*, 2019b).

Interestingly, overexpression of peach homologs of cell surface receptors indicates that PTI was also strongly activated, potentiating elicitors detection such as flagellin (*FLS2*) chitin (*CERK1*, *LYK5*) and secreted peptides PIP1/PIP2 (*RLK7*). RLK7-PIP1 interaction was shown to amplify PTI (Hou *et al.*, 2014), self-amplification loops of signals after initial perception being an important characteristic of plant immunity. PrePIP1 transcription was indeed reported induced by MeSA (Hou *et al.*, 2014) while PIP1 participates in stomatal closure (Shen *et al.*, 2020). BAK1 is a key regulatory RLK required downstream of numerous immune responses through complex phosphorylation cascades of cofactors, and its implication in aphid detection has already been extensively demonstrated (Prince *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2017; Chaudhary *et al.*, 2014; Tungadi *et al.*, 2021). BAK1 co-receptor interacts with other RLKs, like *FLS2* and *BRI1* and other co-receptors *BKI1*, *BIK1* and *BSKs*, essential for BR-signalling transduction. We found an increase in the expression of *BKI1*, a negative regulator of *BRI1*, and a decrease of the positive regulator *BSK2* (Tang *et al.*, 2011), suggesting a reduction of *BZR1* dephosphorylation and thus of its activity as a positive regulator of BR-dependent gene expression (Ortiz-Morea *et al.*, 2020). The downregulation of *BZR1* and *BSR1* confirms a general shutdown of BR pathways that could contribute to explain the slowdown of apices elongation measured 7 dpi. The fitness cost associated with R genes is usually considered high because of their pleiotropic effect (Karasov *et al.*, 2017). For example, *RMP1* confers high resistance to *P. syringae* in *Arabidopsis* but with a 10% corresponding reduction in seed production (Tian *et al.*, 2003a).

It is now considered that the trade-off between growth and defense is mainly the result of transcriptional and hormonal regulations, rather than a strict lack of resources (Karasov *et al.*, 2017), and that metabolic manifestations of these changes involve both redirection of fluxes, resulting in growth reduction, and the establishment of defensive metabolic pathways. Consistently, BRS1 was described as an apoplastic regulator of redox status and stress signalling (Zhang *et al.*, 2021), while BAK1 also associates to OST1 to stimulate RBOHF and trigger ABA/NO regulated stomatal closure (Sierla *et al.*, 2016). As for lectins, G-type LecRLKs functions remain largely unknown, whereas L-type LecRLKs respond to various abiotic and biotic stresses (Bellande *et al.*, 2017), such as LecRK41, a L-type lectin reported inducible by SA (Blanco *et al.*, 2005). Several genes encoding wall-associated receptors, WAKs, were also overexpressed. These proteins possess an extracellular domain that binds pectin (Kohorn *et al.*, 2009) and are activated by oligogalacturonides (Brutus *et al.*, 2010). (Foyer *et al.*, 2015) reported in a meta-analysis the overexpression of these receptors, in particular *WAK1* and *WAK2*, in tissues attacked by phloem-feeding insects. It has been proposed that aphid salivary effectors such as pectin-methylesterases and polygalacturonases released during stylet penetration between cells would produce oligogalacturonides, acting as DAMPS and detected by WAKs to trigger MAPK signalling cascades (Silva-Sanzana *et al.*, 2020).

Overall, our observations fit well with the emerging model of a strong interplay between ETI and PTI. Ngou *et al.* (2021) showed that a strong immune response requires both ETI and PTI, via upregulation of PTI signalling components at transcriptional and post transcriptional levels, ETI being insufficient to activate ROS production alone, but enhancing it upon elicitation by PAMPs and elevated protein levels of PTI signalling components. The same finding was made by Yuan *et al.* (2021), who showed that ETI could not be established without the activation of PTI, in particular the establishment of an efficient oxidative burst, with the PRRs and NLRs receptors working in synergy. Consistently, downstream signalling networks were activated in Rubira upon infestation, involving calcium-dependent proteins CBLs (*e.g. Prupe\_1G412900*, ortholog of *CBL10*), CPKs (*e.g. Prupe\_4G213800*, ortholog of *CPK9*), CIPK (*e.g. Prupe\_2G195900*, ortholog of *CIPK9*) and NADPH oxidase (*e.g. Prupe\_5G107400*, ortholog of *RBOHF*), which can be inferred to have led to a strong production of apoplastic ROS, mitigated by the accumulation of detoxification enzymes.

CPK2 is involved in ROS signalling through its direct interaction with RBOHD (Wang *et al.*, 2018b) and CPK8, CPK9 and CPK12 participate, directly or indirectly, in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis (Zhao *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019). The role of ROS in plant-aphid interaction is well documented (see Goggin and Fischer, 2022, for review). Interestingly, we found a specific activation of RBOHF consistent with the work on Arabidopsis/*M. persicae* reported by Jaouannet *et al.* (2015), but different from Kuśnierczyk *et al.* (2007), who reported a transcriptional upregulation of RBOHD in Arabidopsis Cvi ecotype but not in Ws after infestation by *M. persicae* or *B. brassicae*. There thus seems to be a specialization of the RBOHs in the defense against aphids, which would be dependent on plant genotypes. More implication of ROS in response to *M. persicae* was revealed by the upregulation of *Prupe\_5G117000*, the ortholog of *WRKY53*. This transcription factor, inducible by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, is a key regulator of senescence and controls the expression of catalase genes (Miao *et al.*, 2004). The onset of HR is finally attested by the upregulation of the NO pathway, with upregulation of *NR1*, specifically responsible for NO generation under the control of ABA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bright *et al.*, 2006). Early NO induction was previously reported in wheat responding to the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) and nitrate reductase transcriptional upregulation was observed in Arabidopsis upon infestation by *M. persicae* and *B. brassicae* (Kuśnierczyk *et al.*, 2007).

#### 4.4. Infested Rubira displayed multiple hormonal changes involving SA, pipecolate, JA, IAA and ABA

Rubira showed a significant accumulation of SA and pipecolate 48 hpi, consistent with the establishment of SAR: the biosynthesis of SA upregulates NHP biosynthesis genes, then the mobile NHP triggers *de novo* SA biosynthesis in systemic tissues and amplifies ETI and PTI (Schnake *et al.*, 2020; Yildiz *et al.*, 2021). A response similar to that reported in the present paper was already observed by Donze-Reiner *et al.* (2017) in switchgrass (*Panicum virgatum*) leaves infested by the greenbug (*S. graminum*), suggesting pipecolate could be a major defense player against aphids in several species. In the present work, every detected metabolic intermediate in NHP production accumulated in Rubira 48 hpi and every gene known to be implicated in its biosynthesis were upregulated.

The main route for NHP biosynthesis involves the conversion of lysine by ALD1, SARD4 and FMO1 since the pipercolate deficient *ald1* mutant is unable to develop SAR upon bacterial infection (Návarová *et al.*, 2012). Moreover, the transcriptional activation of MPK3 and WRKY33 indicates that the SAR positive regulatory loop revealed by Wang *et al.* (2018c) and involving MPK3, WRKY33, ALD1 and pipercolate was also triggered in Rubira 48 hpi.

Jasmonates increased moderately and earlier than SA, so it is possible we missed an accumulation peak just a few hours after infestation (Appendix 14). Expression of *ACO4* and *JAR1* further supports the idea of an activation of the JA pathway in Rubira's. Both SA and JA have been reported to promote defense against aphids. Kamphuis *et al.* (2019) described the recruitment of JA in *M. truncatula* resistance against the bluegreen aphid (*A. kondoi*), conferred by the dominant resistance gene *AKR*, while exogenous JA spraying on tomato reduced lifetime fecundity and increased juvenile mortality of the potato aphid (*M. euphorbiae*) (Cooper and Goggin, 2005). A complementary action in time of SA and JA was suggested by Kersch-Becker and Thaler (2019), using both a *jai-1* tomato mutant impaired in JA signalling and defense and a line overexpressing systemin displaying constitutively high JA-dependent defenses. *Jai-1* plants were more susceptible to the potato aphid, but as aphid population density increased, SA-based defense mechanisms amplified and promoted a negative population growth. In contrast, JA overexpressing plants were less susceptible but did not induce SA accumulation and caused a density-independent population growth. Duhlian *et al.*, (2020) compared compatible and incompatible interaction between Indian mustard (*Brassica juncea*) and two aphid species at the transcriptomic level; they observed upregulation of *MYC* transcription factors involved in JA-mediated defense in both interactions, but a downregulation of coronatine-induced protein1 (*COI1*) involved in JA signal transduction in the compatible interaction, pointing to a manipulation by aphid effectors. The apparent antagonism between SA and JA pathways was often mentioned (Beckers and Spoel, 2006). A simple explanation contributing to work out the contradiction could lie in the spatial organization of defense responses. SA biosynthesis and signal transduction genes were found upregulated in leaves of Arabidopsis infested by *M. persicae*, whereas JA-induced defense proteins transcription was upregulated in systemic leaves (Kerchev *et al.*, 2013). A similar idea was developed by Betsuyaku *et al.* (2018), who reported concentric areas around *P. syringae* lesions where SA and JA pathways were strictly separated. In the present work, several DEGs involved in SA catabolism (*SGT1*, *MES1*, *SAMT1*) or repression of its biosynthesis (*NPR3*),

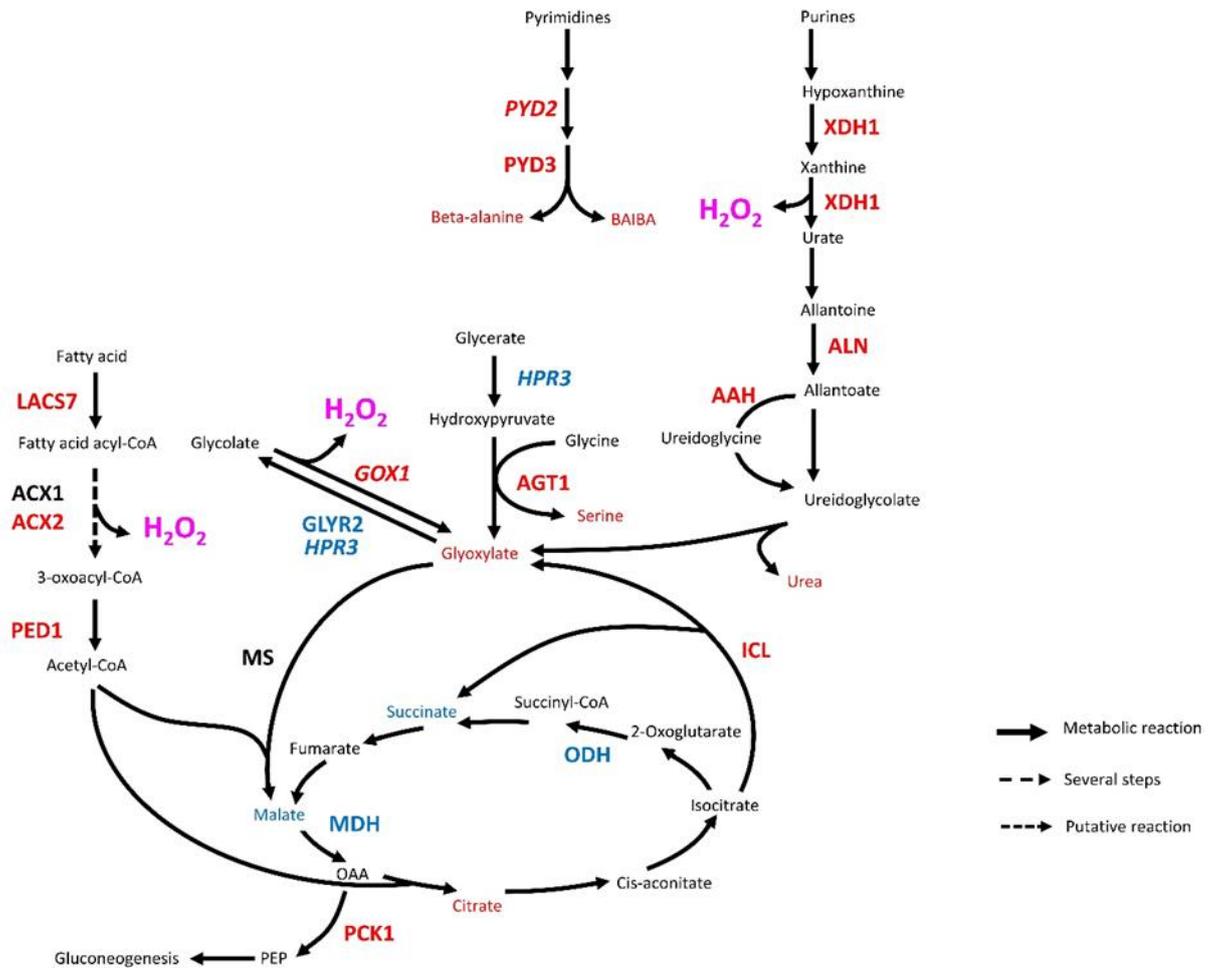


Figure 31 : **Transcriptional regulation of glyoxylate metabolic pathways in Rubra 48 hours after infestation with *M. persicae*.** Genes are annotated according to their *Arabidopsis* orthologs, non-orthologs (homologs) are noted in *italics*. Upregulated genes/metabolites are figured in red, downregulated genes/metabolites in blue and not found or not differentially expressed genes/metabolites in black. AAH, Allantoate deiminase; ACX1, Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1; ACX2, Acyl-coenzyme A oxidase 2; AGT1, Glyoxylate aminotransferase 1; ALN, Allantoinase; GLYR2, Glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 2; GOX1, Glycolate oxidase; HPR3, Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase; ICL, Isocitrate lyase; LACS7, Long chain acyl-CoA synthetase 7; MDH, malate dehydrogenase; MS, Malate synthase; ODH, Oxoglutarate dehydrogenase; PCK1, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; PED1, 3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal; PYD2, Dihydropyrimidinase; PYD3, Beta-ureidopropionase; XDH1, Xanthine dehydrogenase 1; BAIBA, Beta-aminoisobutyrate; PEP, Phosphoenol pyruvate.

suggest a downregulation of SA, possibly as a feedback loop after a strong stimulation of its biosynthesis. Fine-tuning of responses to SA is also apparent in the differential expression of transcription factors controlling SA-inducible genes. Hence one isoform of the transcription factor *NIM1* was overexpressed, the other repressed. In addition, the transcription factor gene *TGA6* was overexpressed, while its cofactor *NPR1* (Pieterse and Van Loon, 2004), which becomes active upon SA-mediated changes in cellular redox status, was repressed.

We found a transient and modest accumulation of ABA in Rubira 12 hpi and the upregulation of several genes related to this phytohormone. As with JA and SA, the role of ABA in plant/aphid interaction is controversial. Hillwig *et al.* (2016) indicated that induction of ABA in *Arabidopsis* blocks the accumulation of defense compounds and allows the development of aphids. On the contrary, Walters (2015) suggested that ABA can upregulate the deposition of callose and the production of ROS, which is harmful to the aphid.

Auxin is necessary for the establishment of the apical-basal axis and the formation of embryonic organs, it can therefore be assumed that the trend of decreasing IAA levels we observed over 7 dpi resulted in an inhibition of organogenesis in Rubira apices. This is substantiated by the simultaneous repression of several *PIN* transporters and auxin biosynthesis genes *YUCs* that synergistically manage leaf development (Cheng *et al.*, 2007). Finally, the overexpression of *ACS6* and *ERF1B* reflects the involvement of ethylene in infestation-induced signalling processes. Though the role of ethylene in response to aphids is unclear, the activation of these two genes has already been documented in the *Arabidopsis/M.persicae* or *B. brassicae* interplays (Kuśnierczyk *et al.*, 2007; Rubil *et al.*, 2022).

#### 4.5. Aphid-induced mobilization of Glyoxylate and P5C/Proline metabolisms may have promoted ROS burst in Rubira

An important metabolic consequence of aphid infestation in Rubira 48 hpi was the accumulation of glyoxylate and the upregulation of several afferent metabolic pathways (Figure 31). An activation of peroxisomal photorespiration was observed both at transcriptomic and metabolomic levels. Rojas *et al.*, (2012) has shown the role of *GOX2*, which is a major source of  $H_2O_2$ , in the control of SA, JA and ethylene pathways (Rojas *et al.*, 2012a). Inoculation of *P. syringae* into tomato plants increased the expression of *GOX2* but also *AGT1* and moreover, tobacco *gox2* KO lines were found to be more susceptible to infection whereas lines overexpressing *GOX2* were more resistant (Ahammed *et al.*, 2018).

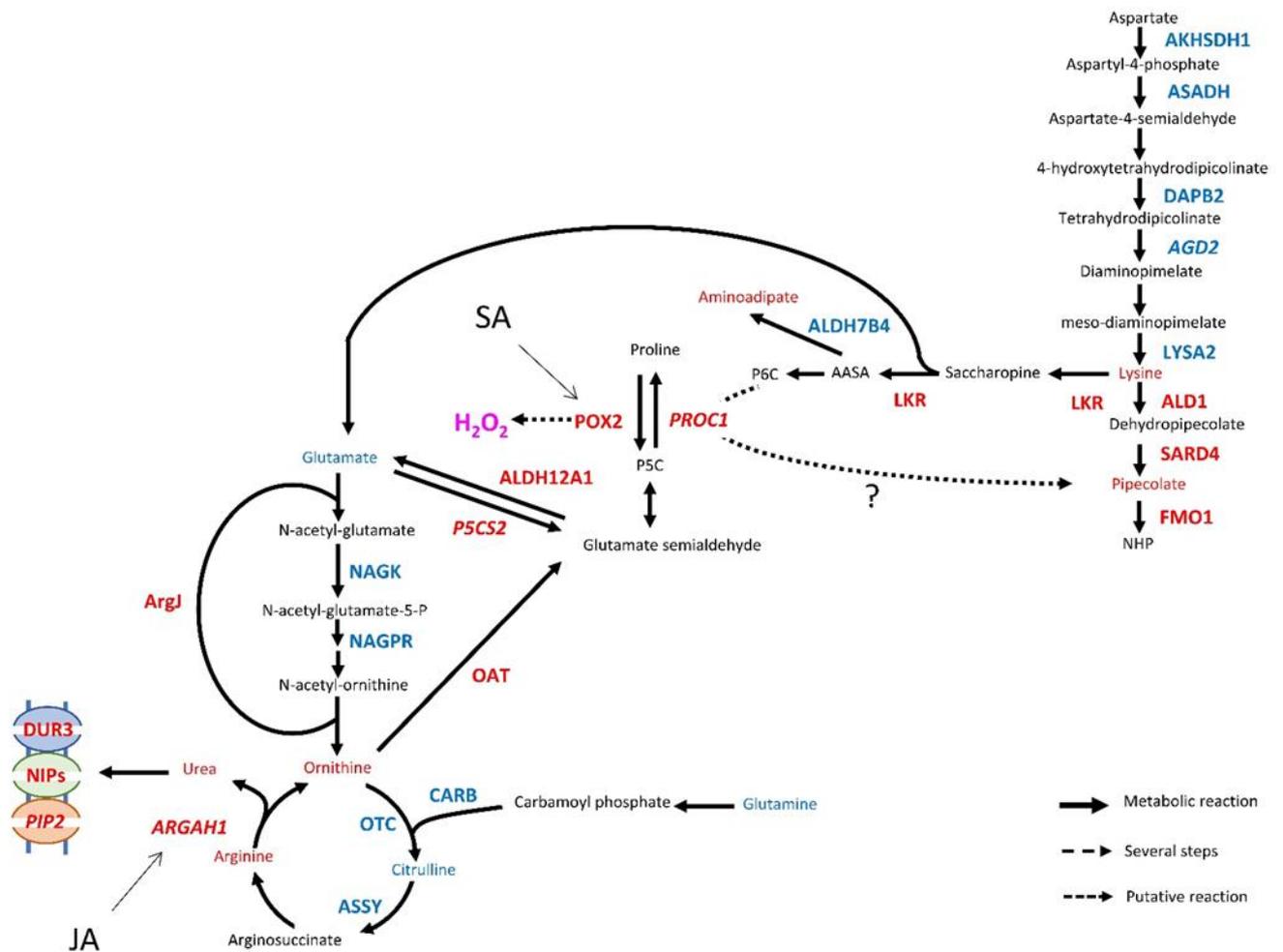


Figure 32 : **Transcriptional regulation of Arginine, proline and lysine metabolic pathways in *Rubra* 48 hours after infestation with *M. persicae*.** Genes are annotated according to their *Arabidopsis* orthologs, non-orthologs (homologs) are noted in italics. Upregulated genes/metabolites are figured in red, downregulated genes/metabolites in blue and not found or not differentially expressed genes/metabolites in black. AGD2, LL-diaminopimelate aminotransferase; AKHSDH1, Aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1; ALD1, AGD2-like defense response protein 1; ALDH12A1, Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 12A1; ALDH7B4, Aldehyde dehydrogenase family 7 member B4; ARGAH1, Arginase 1; ArgJ, Arginine biosynthesis bifunctional protein; Aspartate-semialdehyde dehydrogenase; ASSY, Arginosuccinate synthase; CARB, Carbamoyl-phosphate synthase large chain; DAPB2, 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase 2; DUR3, Urea-proton symporter; FMO1, Probable flavin-containing monooxygenase 1; LKR/SDH, Alpha-amino adipic semialdehyde synthase; LYSA2, Diaminopimelate decarboxylase 2; NAGK, Acetylglutamate kinase; NAGPR, N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase; NIP1, Aquaporin Nodulin-26-like major intrinsic protein; OCT, Ornithine carbamoyltransferase; P5CS2, Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase; PIP2, Aquaporin Plasma membrane intrinsic protein; POX2, Proline dehydrogenase 2; PROC1, Pyrroline-5-carboxylate reductase; SARD4, SAR deficient 4; AASA, alpha-amino adipate; NHP, N-hydroxypipecolate; P5C, Pyrroline-5-carboxylate; P6c, Pyrroline-6-carboxylate.

This study also revealed the involvement of GOX2 in the regulation of SA-mediated signalling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by GOX is regulated by the peroxisomal detoxification enzymes APX3 and CAT2, which genes were overexpressed in Rubira 48 hpi. Peroxisomal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production thus appears to be a key component of redox-mediated defense (Taler *et al.*, 2004; Sandalio *et al.*, 2021), and our data confirm the recent finding of its implication in Arabidopsis response to *M. persicae* (Xu *et al.*, 2021a). The present work suggests that the glyoxylate pool was also supplied by the glyoxylate shunt (Figure 31). Very little information is available about the involvement of the glyoxylate shunt in defense, but the upregulation of genes involved in lipid beta-oxidation feeding this pathway might be related to defense as well, since ACXs produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kong *et al.*, 2017) and ACX1 and PED1 are required for JA biosynthesis in the peroxisome (Cruz Castillo *et al.*, 2004). Overexpression of *ICL* and *MS* have been reported in switchgrass infested by greenbugs (Donze-Reiner *et al.*, 2017) and in soybean under attack by *B. cinerea*, interpreted in this case as a reallocation of carbon during fungus-induced senescence (Cots *et al.*, 2002). It is therefore possible that there is an as yet unknown function of the glyoxylate shunt in defense, beyond fatty acid catabolism. Finally, the overexpression of purine and pyrimidine catabolism genes (homolog of *PYD2*; ortholog of *PYD3* and ortholog of *XDH1*) and the accumulation of uracil and thymine degradation products, *i.e.* beta-alanine and BAIBA (Zrenner *et al.*, 2009) suggests the possibility that glyoxylate was also synthesized from urate and a marker of an accelerated senescence (Figure 31; Appendix 7).

Other metabolic reconfigurations induced in Rubira by *M. persicae* infestation concern the arginine, proline and lysine pathways, which revolve around the  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate (P5C). This compound is produced by the catabolism of proline, under the action of POXs, or by the conversion of glutamate into glutamic- $\gamma$ -semialdehyde (GSA), the latter being in spontaneous equilibrium with P5C. A third biosynthetic pathway is the catabolism of ornithine through the action of OAT. All P5C biosynthetic pathways were transcriptionally activated 48 hpi, whereas *ALDH12A1* (*P5CDH*), which catalyzes its degradation to glutamate, was repressed (Figure 32). Furthermore, a net conversion of P5C to proline can be excluded as the proline pool remained stable: the simultaneous overexpression of *POX2* and *PROC1* (*P5CR*) rather indicate a high flux in the futile proline/P5C cycle. This cycle is thought to be ROS-generating because POX2 activity increases electron transfer from its cofactor FAD to the electron transfer chain and ultimately O<sub>2</sub>, resulting in mitochondrial ROS production

(Miller *et al.*, 2009a). In animal cells, the proline/P5C cycle is central to the control of redox potential and cell death (Chalecka *et al.*, 2021) and several studies have shown that it is involved in HR in plants (Monteoliva *et al.*, 2014). Indeed, the transcription of *POXs* in *Arabidopsis* was stimulated by SA and their activity was found increased in cells undergoing PCD (Cecchini *et al.*, 2011). The authors also showed that *Arabidopsis pox* mutants had reduced ROS levels and cell death and were more susceptible to *P. syringae*. They further reported the same pattern as observed in the present study: POX activation was accompanied by an increase in *P5CR* transcription, *i.e.* the proline/P5C cycle, but not *P5CDH*, while proline levels remained constant. The importance of OAT activity to PTI and ETI as well as to resistance to *P. syringae* has been demonstrated in *N. benthamiana* (Senthil-Kumar and Mysore, 2012). In our case, the urea cycle appeared to be oriented towards P5C formation, with overexpression of the ornithine-producing arginases *ARGAH1* and *ARGAH2*, and overexpression of *OAT*, generating P5C while citrulline formation collapsed due to repression of *OTC* and *CARB*. The urea cycle here appears to operate in an open mode to convert arginine to P5C. This is consistent with the reported increased susceptibility to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae*) and *B. cinerea* of *Arabidopsis argah* mutants (Brauc *et al.*, 2012; Gravot *et al.*, 2012) and the JA-dependant induction of arginase shown by Gravot *et al.* (2012). Another hypothetical role for PROC1 could be the biosynthesis of pipercolate. The ALD1 pathway is thought to be the only effective pipercolate pathway in plants but an alternative route exists, with 3 intermediates: saccharopine,  $\alpha$ -aminoadipate- $\delta$ -semialdehyde (AASA), and  $\Delta^1$ -piperidine-6-carboxylate (P6C) (Hartmann and Zeier, 2018). None of these compounds were detected in our study but a strong accumulation of  $\alpha$ -aminoadipate was observed, which is a direct catabolite of AASA, and a gene coding for an enzyme of the saccharopine pathway was also upregulated: the lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase (*LKR/SDH*) that produces AASA. In human, P6C was found to be in spontaneous equilibrium with AASA and P5CR (PROC1) to be able to turn P6C into pipercolate (Struys *et al.*, 2014). Though not very likely, an involvement of this pathway in pipercolate accumulation after aphid infestation cannot be entirely ruled out. Finally, the accumulation of hydroxyproline (Appendix 18), which may be derived from turnover of parietal proteins, as well as pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate, suggests the existence of an infestation-stimulated hydroxyproline oxidase activity. Such an enzyme is known in animals (Cooper *et al.*, 2008) but has no known equivalent in plants yet.

#### 4.6. Response to *M. persicae* activated protein recycling through autophagy in Rubira

The observed accumulation of lysine, arginine and ornithine contrasted singularly with the repression of genes involved in their biosynthesis (Figure 32). This was also true to some extent for BCAAs and histidine. The work of Niu *et al.* (2018) showed the similar repression of these biosynthetic pathways 48 hpi in the "Fen Shouxing" accession carrying the major *M. persicae* resistance gene *Rm3*. One might think that this repression followed a strong activation earlier, but the genes of the lysine biosynthetic pathway for example were all repressed between 6 and 72 hpi (Niu *et al.*, 2018). The origin of these amino acids could therefore lie in the recycling of proteins from the infestation-induced reconfiguration of the proteome, or even from a state of senescence, as suggested by the accumulation of urea, which is frequently accumulated in this situation (Gerendás and Sattelmacher, 1997). The upregulation of autophagy, revealed by the induced expression of *ATGs*, *NBR1* and genes involved in protein aggregate degradation (*CHIP* and *HSP70-4*) support the hypothesis of protein recycling. Interestingly, *NBR1* was also found to target viral proteins, implying a possible coactivation of defenses against the aphid and the viruses it could transmit (Hafrén and Hofius, 2017).

#### 4.7. Metabolic depletion of key metabolites might have reduced the nutritional value of Rubira for *M. persicae*

Some amino acids have seen their pool diminish 48 hpi. This is the case for glutamine and methionine, in a manner consistent with the transcriptional regulation of their biosynthetic pathway. When the decrease in sorbitol is also considered, it appears that the aphid's main sources of carbon, nitrogen and sulfur nutrition have been reduced in Rubira. Jordan *et al.* (2020) reported peach infestation levels by *M. persicae* proportional to their amino acid and carbohydrate content, stressing that their reduction has the potential to impair aphid growth, a similar conclusion to that of Karley *et al.*, (2002), who compared aphid performance on young developing and old mature potato plants with contrasted nutritional value. The aphid diet from phloem sap is particularly low in nitrogen, with an amino acid/carbohydrate ratio of about 0.1 in the phloem, whereas the protein/carbohydrate ratio is 10 times higher in the diet of leaf chewing insects (Nowak and Komor, 2010).

The importance of plant nutritional quality was demonstrated in feeding choice tests of the specialists aphids *Uroleucon tanacetii* and *Macrosiphoniella tanacetaria* fed on tansy (*Tanacetum vulgare*), as both species showed their preference for plants highly fertilized with nitrogen and infestation with *Uroleucon tanacetii* even increased phloem essential amino acids, especially methionine (Nowak and Komor, 2010; Jakobs *et al.*, 2019). Infestation by sucking insects is well known to modify amino acid levels: *M. persicae* for example increases the amino acid/carbohydrate ratio in *Brassica pekinensis* sap, and the absolute amino acid content in whole leaves (Cao *et al.*, 2016). This study even indicated that nutritional value was at least as important a criterion for food choice as the level of plant defense. It is therefore likely that the reduction in key nutrients and the coincidental slowing of plant elongation negatively impacted aphid performance on Rubira and contributed to limit colony settlement.

#### 4.8. Secondary metabolites accumulation may have contributed to antixenosis in Rubira

In compatible interactions, the very short exploration phase (only a few punctures before reaching the phloem), precedes a long ingestion phase and a massive colonization associated with leaf deformation, a symptom reported here on GF305 and previously on the susceptible genotype "Pamirskij" (Pascal *et al.*, 2002a) and in the progeny of the "Chun Mei" genotype (Niu *et al.*, 2018). On Rubira and "Fen Shouxing" however, aphids perform numerous punctures before reaching the phloem in which they fail to feed for long periods (Sauge *et al.*, 1998b), a phenomenon characteristic of antixenosis. Phloem-based antixenosis is common in aphid-plant interactions, as for instance between *M. persicae* and various wild *Solanum* species reported by Le Roux *et al.* (2010). Antixenosis may result from the presence of deterrent compounds like VOCs, that negatively impact aphid fecundity (Dardouri *et al.*, 2021). Some compounds such as (E)- $\beta$ -farnesene and eugenol are particularly repellent to *M. persicae* (Dardouri *et al.*, 2019) and farnesene emission was detected in peach after infestation with *M. persicae*, VOCs emission being correlated with resistance (Staudt *et al.*, 2010). In the present paper, signs of VOC production were rather associated to indirect defense mechanisms. The overexpression of *CAD7* in Rubira, coding for a NADPH-dependent aldehyde reductase converting (Z)-3-hexenal to (Z)-3-hexen-1-ol in Arabidopsis, indicates a change in the composition of green leaf volatiles (Tanaka *et al.*, 2018), which play a defensive role by attracting pest predators.

Moreover, it is reasonable to interpret the overexpression of *SAMT1* in Rubira as a sign of MeSA emission induced by the infestation, since MeSA emissions were reported higher in resistant varieties, this compound being associated with the attraction of aphid predators in soybean (Zhu and Park, 2005).

Soluble secondary metabolites participate to antixenosis as well. The deterrent effects of phenolic compounds on aphid feeding have been demonstrated *in vitro* (Dreyer and Jones, 1981). An antixenosis or even antibiosis has also been demonstrated *in vivo*: in pepper (*C. annuum*) the leaf contents of direct hydroxycinnamic acid derivatives, notably caffeic acid, increased after infestation by *M. persicae* (Florencio-Ortiz *et al.*, 2021a), while in peach a negative correlation was found between the content of phenolic compounds in peach leaves and the level of infestation by *M. persicae* (Jordan *et al.*, 2020). We noted in Rubira a particular accumulation of caffeoyl derivatives of quinic acid. Many of them increased in Rubira while they decreased in GF305, reaching however equal levels due to the higher constitutive content of GF305, so that no specific antixenotic or antibiotic effect of these compounds can be inferred here. Some compounds however were more abundant in Rubira, such as 3,5-dicaffeoylquinic acid, whose accumulation has already been demonstrated in infested Rubira, and which exhibits strong phage-repulsive and toxic activity against *M. persicae* and other aphid species tested (Poëssel, personal communication). Similarly, in apple, resistant cultivars showed higher levels of hydroxycinnamic acids, especially 4-caffeoylquinic acid (Berrueta *et al.*, 2018). The presence of an orthodiphenol group on the caffeoyl residue makes these compounds potential substrates for polyphenol oxidases and peroxidases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification reactions, as well as chelating agents for metals such as iron that can modulate the pro-oxidative Fenton reaction. Such compound could also feed the deposition of oxidized polyphenols along the stylet track, as shown by in the interaction between *M. persicae* and potato (Kerchev *et al.*, 2012). The apparent contradiction between the transcriptomic and metabolomic data may come from the activation kinetics of the shikimate pathway. Indeed, we observed an overall repression of the pathway in Rubira 48 hpi, while aromatic amino acids clearly accumulated as well as some phenylpropanoids. Niu *et al.* (2018) showed a slight induction of shikimate pathway genes in the first hours after infestation of «Fen shouxing», but 3 hpi repression was gradually set up, until obtention of a gene expression profile close to that seen in Rubira 48 hpi.

An alternative or complementary explanation to aromatic amino acid increase would be the already mentioned putative activation of proteolysis/autophagy in infested tissues. Furthermore, overexpression of *CAD4*, whose preferred substrate is p-coumaryl aldehyde, suggests an enhancement of lignin synthesis. Increased prunasin and its caffeoyl derivative may also play a role in resistance, as suggested by the *in vitro* suppressive effect of prunasin on the duration of ingestion phase of bird cherry-oat aphid (*R. padi*), whose primary host is bird cherry (*Prunus Padus*), rich in cyanogenic glycosides (Halarewicz and Gabryś, 2012). On top of a direct toxic effect of cyanogenic glycosides, their turnover has also been shown to contribute to SA biosynthesis in peach (Diaz-Vivancos *et al.*, 2017), thereby possibly reinforcing defense signalling.

Finally, the detection of AABA and sarcosine in the samples, reported here for the first time to our knowledge, opens original investigation perspectives. These molecules are rarely monitored and could only be detected here by the use of a chemical derivatization-based profiling method.

# Chapitre 4

---

Conséquences d'un apport exogène de  
pipécolate sur l'infestation et le  
métabolisme du pêcher

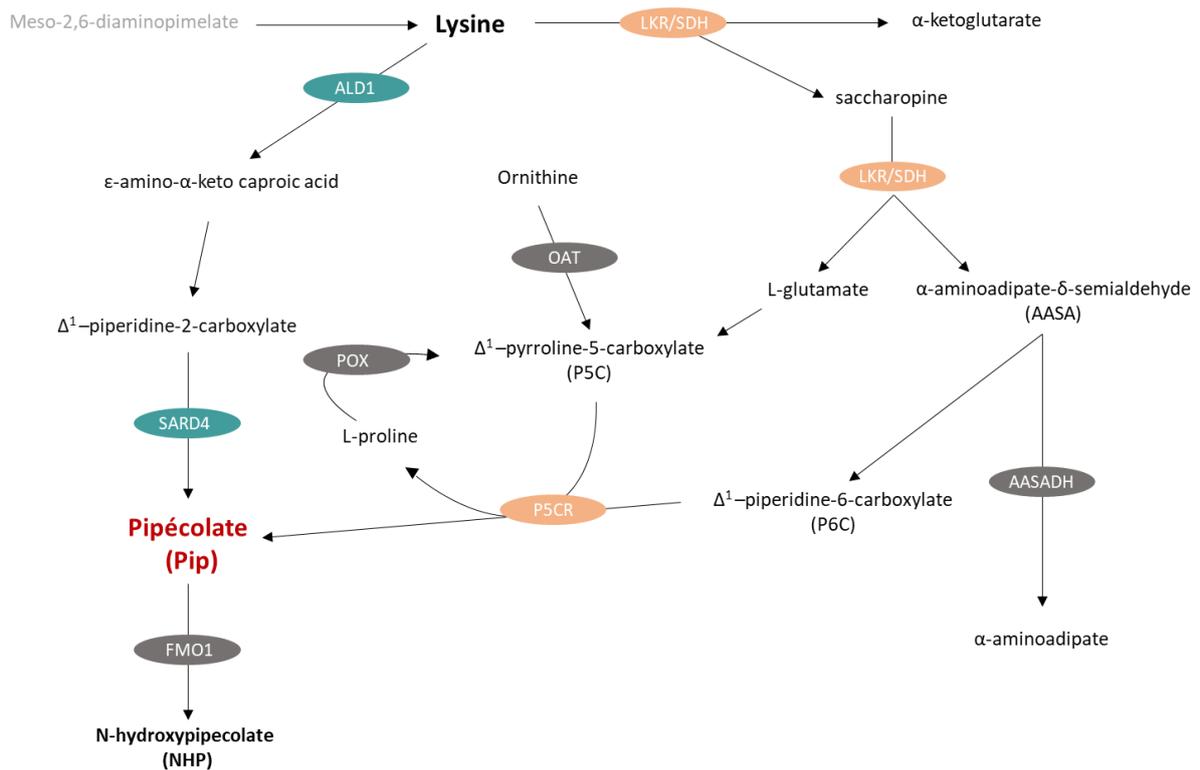


Figure 33 : **Etapes du catabolisme de la lysine conduisant à la synthèse de pipécolate.** Le catabolisme de la lysine contrôlé par ALD1 et aboutissant à la synthèse du pipécolate est illustré en bleu. La synthèse du pipécolate impliquant la formation de saccharopine en tant qu'intermédiaire est illustrée en orange. ALD1 : AGD2-like defense response protein 1 ; SARD4 : SAR déficient 4 ; FMO1 : Flavin-containing monooxygenase 1 ; P5CR : Pyrroline-5-carboxylase reductase ; OAT : Ornithine aminotransferase ; POX : Proline dehydrogenase ; AASADH : α-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase ; LKR/SDH : Lysine ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase

## 1. Introduction

### 1.1. Les pipécolate et N-hydroxypipécolate, composants mobiles de la SAR

Le pipécolate (Pip), acide aminé non protéinogène issu du catabolisme de la L-lysine, est un important régulateur de l'immunité végétale (Návarová *et al.*, 2012; Hartmann *et al.*, 2018). Sa biosynthèse et celle de son dérivé hydroxylé le N-hydroxypipécolate (NHP) ont récemment été élucidées chez *Arabidopsis* (Hartmann et Zeier, 2018) (Figure 33). Deux voies du catabolisme de la L-lysine peuvent conduire à la synthèse de Pip. La première implique l'aminotransférase AGD2-like defense response protein (ALD1) qui utilise la lysine comme substrat pour générer des intermédiaires cycliques déhydropipécoliques (DP) et l'acide  $\delta$ 1-pipéridine-2-carboxylique (P2C). Ce dernier est ensuite réduit en Pip par la réductase SAR-deficient 4 (SARD4). Enfin, la flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1) intervient dans l'hydroxylation de Pip en NHP (Hartmann et Zeier, 2018). La seconde voie, partageant des points communs avec celle mise en évidence chez les animaux, débute par la condensation de la lysine et  $\alpha$ -ketoglutarate en saccharopine, catalysée par la Lysine ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase (LKR/SDH) (Arruda et Barreto, 2020). La saccharopine est ensuite hydrolysée pour former de l' $\alpha$ -aminoadipate semialdéhyde (AASA) et du glutamate. L'AASA peut finalement se cycliser spontanément en  $\Delta$ 1-pipéridine-6-carboxylate et être utilisé par la  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate réductase pour produire le Pip (Figure 33).

L'activation des voies de biosynthèse de Pip et l'accumulation de Pip ont été révélées en réponse à des agents pathogènes chez diverses espèces végétale, par exemple chez l'orge (*Hordeum vulgare*; Lenk *et al.*, 2019), le tabac (*Nicotiana tabacum*; Vogel-Adghough *et al.*, 2013) et le soja (*Glycine max*; Aliferis *et al.*, 2014). Chez *Arabidopsis*, l'infection par *Pseudomonas syringae* induit la surexpression de *ALD1* qui s'accompagne d'une accumulation de Pip dans les feuilles inoculées et dans les feuilles distales du site d'infection (Návarová *et al.*, 2012). En outre, le *knock out* de *ALD1* engendre une chute des niveaux de Pip qui aboutit à l'abolition de la résistance basale et de la SAR.

Cependant, les déficiences de *ald1* sont corrigées par un apport exogène de Pip à des doses physiologiques ce qui signifie que le Pip est un élément clé dans l'établissement de la SAR et de la réponse immunitaire (Cecchini *et al.*, 2015). En revanche, le traitement Pip ne permet pas de restaurer la résistance et la SAR chez les mutants *fmo1*, ce qui indique que le Pip doit être hydroxylé pour induire ces mécanismes (Chen *et al.*, 2018). Pip et NHP agissent donc comme des régulateurs critiques des réponses immunitaires locales et systémiques chez *Arabidopsis*.

Plus récemment, des recherches indiquent que le NHP et le SA, autre important régulateur de la SAR, peuvent fonctionner en synergie dans la régulation de l'immunité des plantes et la mise en place de la SAR. Les gènes de biosynthèse de ces composés figurent d'ailleurs parmi les gènes liés à la SAR les plus fortement régulés en cas d'infection. Ainsi, deux nœuds de régulation communs de la biosynthèse de SA et NHP ont été révélés. Les protéines Enhanced disease susceptibility 1 (EDS1) et Phytoalexin deficient 4 (PAD4) œuvrent dans la régulation positive des boucles d'amplifications de la biosynthèse de SA et de NHP. Ces deux partenaires favorisent à la fois l'expression de l'Isochorismate synthase (*ICS1*), nécessaire à la synthèse de SA mais également celle de *ALD1* et *FMO1*, et ce indépendamment de la présence de SA (Joglekar *et al.*, 2018). De même, les facteurs de transcription SAR-DEFICIENT-1 (SARD1) et CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60-LIKE G (CBP60g) provoquent une accumulation de SA et NHP en ciblant les promoteurs des gènes responsables de leur biosynthèse (Huang *et al.*, 2020). Ainsi, l'action combinée SARD1/CBP60g favorise l'expression de *EDS1* et de *PAD4* qui peuvent en retour réguler positivement l'expression de ces facteurs de transcription (Sun *et al.*, 2015; Hartmann et Zeier, 2019). Dans le même sens, une application exogène de NHP entraîne une augmentation de l'expression de *ICS1* ce qui suggère que le NHP régule positivement la biosynthèse de SA (Yildiz *et al.*, 2021). La forme hydroxylée du Pip, plus que le Pip lui-même, semble donc être un acteur de la signalisation longue distance capable d'interagir avec d'autres voies de régulation de la SAR. Dans ce contexte, Schnake *et al.*, (2020) ont caractérisé l'effet d'une application exogène de NHP sur les réponses de défense de différentes espèces végétales (*A. thaliana*, *N. tabacum*, *Cucumis sativus* et *Brachypodium distachyon*) confrontées à des infections bactériennes et fongiques.

Quelles que soient les espèces étudiées, le traitement NHP a permis de réduire les symptômes d'infection et de limiter la croissance et le développement des agents pathogènes ce qui indique que NHP peut agir comme stimulateur de la résistance au niveau local et systémique. A ce jour, seules quelques études ont montré l'implication de la voie de biosynthèse de ce composé dans la réponse aux insectes. La réponse d'*Arabidopsis* à la ponte du lépidoptère *Pieris brassicae*, insecte broyeur, implique l'activation de la SAR à travers l'induction de *ALD1* et *FMO1* (Hilfiker *et al.*, 2014). En outre, cette réponse s'accompagne d'un amorçage puissant des gènes de défense qui permet à la plante de réduire la performance de *P. syringae* lors d'une infection secondaire. Enfin, la détection de l'oviposition par la plante peut induire un signal SAR inter-plante dépendant de *ALD1* et *FMO1* qui va entraîner une accumulation de SA dans les plantes réceptrices du signal (Orlovskis et Reymond, 2020). Ces données illustrent donc la part importante que représentent Pip et NHP dans la résistance des plantes à des bioagresseurs d'origine différentes.

## 1.2. Implication du pipécolate dans la résistance des plantes aux pucerons

Bien qu'aucune étude n'ait exploré précisément le rôle du Pip dans la résistance des plantes aux pucerons, il existe certaines preuves de son induction lors d'une infestation. Koch *et al.*, (2020) ont noté une augmentation du niveau de Pip chez *Panicum virgatum*, le millet vivace, après 5 jours d'infestation par les pucerons *S. graminum* ou *Sipha flava*. Cette élévation est accompagnée d'une surexpression des gènes en amont de la biosynthèse du Pip: *ALD1* et *LKR/SDH*. De plus, une analyse par ionisation laser assistée par matrice (MALDI-MS) supporte l'idée d'une accumulation de Pip localisée au niveau du site d'infestation chez le soja en réponse à *Aphis glycines* (Klein *et al.*, 2015).

Les résultats présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit ont révélé la participation potentielle du Pip dans la résistance de Rubira à *M. persicae*. Ces résultats ont mis en évidence au niveau transcriptomique, la surexpression des gènes appartenant aux deux voies de biosynthèse de Pip ; *ALD1*, *SARD4* et *FMO1* ainsi que *LKR/SDH*, *P5CR* et l' $\alpha$ -aminoadipic semialdehyde dehydrogenase (*AASADH*) qui catalyse la conversion du  $\alpha$ -aminoadipate- $\delta$ -semialdehyde en aminoadipate, uniquement chez le génotype résistant.

Le profilage métabolomique est venu conforter ces résultats en montrant une multiplication par 7 de la teneur en Pip chez Rubira après infestation.

De même, des produits intermédiaires de cette voie de biosynthèse, comme l'aminoacide, sont accumulés. Enfin, le suivi en cinétique de l'infestation a souligné une forte similitude dans les profils d'accumulation du Pip et du SA, qui sont les 2 composés clés dans la mise en place de la SAR. Le Pip, qui intervient dans les réponses de défenses basales de diverses espèces végétales en réponse à divers parasites, pourrait également être un acteur de la résistance à *M. persicae* contrôlée par le gène *Rm2* chez le pêcher.

## 2. Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse est donc qu'une accumulation de Pip au sein de la plante va induire un ensemble de modifications moléculaires, notamment métabolique, pouvant avoir un impact négatif sur *M. Persicae* et participer ainsi à la résistance conférée par *Rm2*. Il s'agit en complément de l'approche descriptive présentée précédemment, de tester expérimentalement l'impact du Pip dans la résistance du pêcher à *M. persicae* par (i) l'apport exogène de Pip sur le génotype sensible au puceron, afin de déterminer si cet apport seul peut induire une résistance partielle chez le génotypes sensible et (ii) par inhibition par « Virus Induced Gene Silencing » (VIGS) de la voie de biosynthèse du Pip via l'extinction transitoire de *ALD1*, afin d'observer si cette inhibition compromet la résistance de Rubira.

L'approche par VIGS a été initiée grâce à une collaboration avec Nicolas Navrot à l'IBMP de Strasbourg, équipe Evolution et diversité du métabolisme des plantes. Pour l'extinction de la voie du Pip nous avons sélectionné le vecteur dérivé du PNRSV (*Prunus Ring Spot Virus*) développé par Cui et Wang (2017) pour l'utilisation du VIGS chez les *Prunus*. Deux tentatives d'extinction ont été menées, en ciblant comme gène témoin celui de la phytoène desaturase (PDS). L'extinction transitoire de ce gène doit provoquer un phénotype de blanchissement au niveau des feuilles, qui permet d'évaluer visuellement la réussite du VIGS. Les deux tentatives d'extinction ont échoué et nous avons décidé d'arrêter ces essais. Cependant nous donnons en Annexe 19 les séquences de la *PDS* et de *ADL1* que nous avons dessinées pour l'extinction par VIGS.

Ce chapitre porte donc essentiellement sur la réponse du génotype sensible à l'infestation après apport exogène de Pip et son effet sur le puceron. Pour caractériser cet effet, nous avons étudié le comportement de fuite des pucerons et développement des colonies aphidiennes.

En parallèle, les plantes traitées ou non et infestées ou non ont fait l'objet d'un profilage métabolique. La démarche a consisté à établir d'une part un profil métabolique sans *a priori* des métabolismes primaire et secondaire afin de mettre en évidence des marqueurs spécifiques des réponses de défense de la plante induits par le Pip et à mesurer d'autre part les teneurs en acides aminés, susceptibles d'être directement impactés par l'apport d'un acide aminé non protéinogène comme le Pip. Enfin, nous avons initialement envisagé un sondage par qRT-PCR de l'expression de certains gènes cibles dont l'expression différentielle a été mise en évidence dans le chapitre 3 ; les gènes codant pour les PR-proteins *PR-1* et *PDF2.1* afin de déterminer une éventuelle induction de la signalisation SA ou JA, les gènes de biosynthèse du Pip (*ALD1*, *SARD4*, *LKR/SDH*), du NHP (*FMO1*) et de la lysine (*LYSA2*) ainsi que la *CALS2* (callose synthase) et *BRI1* (réponse aux brassinostéroïdes). La faible masse d'échantillon récoltée et la multiplication des analyses métabolomiques, qui nécessite une quantité d'extrait végétal conséquent, n'ont finalement pas permis de réaliser ce sondage.

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Matériel végétal

La mise en place et la validation des protocoles expérimentaux ont été réalisées uniquement sur GF305. L'expérience finale a été réalisée sur les 2 génotypes GF305 et Rubira mais seul GF305 a subi le traitement au Pip. La perlite qui est un matériau neutre a été choisie comme substrat de culture pour améliorer l'absorption du Pip par les racines et limiter la dégradation ou rétention de la molécule par le microbiote du terreau. Les graines stratifiées des 2 génotypes ont été semées dans la perlite et cultivées en chambre climatisée à 22°C avec une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit pendant 6 semaines. Les plantes ont été fertilisées 3 fois par semaine avec l'engrais N/P/K/Mg 4/2/6/2 Plantin® (PLANTIN SARL, France) et une solution de fer à 1 g/L a été appliquée 1 fois par semaine à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de culture suite à l'apparition de symptômes de chlorose ferrique. Les plants ont été disposés dans la chambre climatisée de façon à avoir un éclairage homogène pour chaque modalité.

### 3.2. Matériel animal

La colonie de pucerons *M. persicae* utilisée dans cette expérience provenait d'une nouvelle lignée clonale Mp07 obtenue à partir d'un individu collecté en 2021 dans un verger expérimental de pêcher (INRAE, Avignon, France), la lignée précédente Mp06 ayant subi une baisse importante de fécondité et un comportement alimentaire anormal (alimentation sur les tiges et non sur les feuilles). La colonie est élevée sur des jeunes plants de GF305 dans une pièce climatisée à 22°C avec une photopériode de 16 h / 8 h. L'élevage a été maintenu par transfert de femelles aptères virginipares tous les 15 jours sur de jeunes plants de GF305 en croissance.

### 3.3. Mise au point et validation du protocole expérimental

Le mode d'administration, le temps d'exposition au traitement et la concentration de Pip à appliquer ont été choisies à la suite de 2 expérimentations indépendantes sur GF305.

La première expérience a consisté à administrer la solution de Pip sur les plants de GF305 par arrosage ou infiltration des feuilles sous l'apex *via* une seringue. 10 mL de solutions de Pip à deux concentrations différentes ; 1 mM et 10 mM ont été testées pour les deux modes de traitements ce qui correspond à un apport de 10 µmol et 100 µmol de Pip respectivement. L'apex de chaque plant a été récolté 24 h ou 48 h après traitement pour le dosage du Pip endogène par GC-MS. L'eau a été utilisée comme témoin négatif pour les 2 méthodes d'administration. L'apport par arrosage et le temps d'exposition de 24 h au traitement ont été retenus pour la suite des expérimentations car la combinaison de ces deux modalités induisait le moins de variabilité dans les teneurs apicales de Pip.

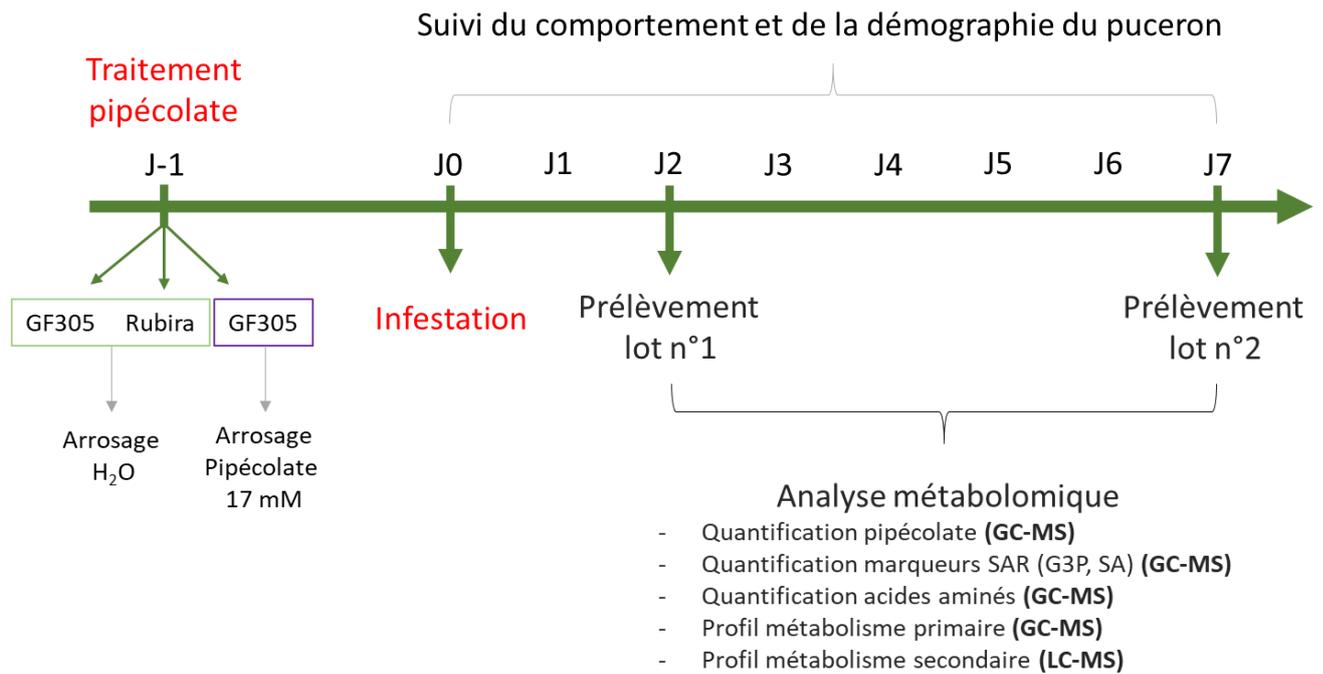


Figure 34 : Schéma de l'expérimentation menée pour tester l'effet d'un apport du pipécolate sur le métabolome de GF305 et sur le comportement et la démographie du puceron en comparaison avec la réponse de résistance observée chez Rubira (non traité).

La deuxième expérience visait à ajuster la concentration de la solution de Pip afin d'apporter la molécule à des concentrations physiologiques dans les plantes sensibles. L'objectif était de se rapprocher au maximum des teneurs induites par l'infestation chez Rubira, d'une part en administrant une quantité suffisante pour activer les cibles du Pip et d'autre part en évitant un apport trop élevé de Pip qui pourrait (i) engendrer des effets physiologiques non désirés comme l'activation de voies de dégradation ou un stockage passif du Pip dans des compartiments inappropriés tels que la vacuole afin de maintenir une homéostasie au sein de la plante et (ii) modifier la valeur nutritionnelle de la plante en particulier dans ses teneurs en azote et altérer l'équilibre C/N. Trois solutions de Pip à des concentrations de 7 mM, 13 mM et 17 mM ont été administrées par arrosage sur des plantes de GF305 en comparaison d'un témoin eau. Les apex ont été prélevés 24 h après le traitement et la teneur en Pip a été mesurée par analyse GC-MS puis comparée à celle obtenue chez le génotype résistant Rubira après infestation (chapitre 3). La concentration à 17 mM de Pip a permis d'obtenir la valeur la plus proche de celle mesurée chez Rubira (1,4  $\mu\text{mol/g}$  MF pour GF305 traité Pip et 1,27  $\mu\text{mol/g}$  MF pour Rubira).

### 3.4. Dispositif expérimental retenu

Les plantes de GF305 ont été traitées par un apport de 10mL de la solution de Pip à 17 mM (2 g/L) ou par 10 mL d'eau (témoin négatif). Les plantes de Rubira ont été uniquement arrosées avec de l'eau. 24 h après les traitements, 10 femelles adultes synchronisées de *M. persicae* ont été déposées sur la moitié des plantes de chaque modalité. Après 48 h d'infestation, un premier lot d'apex a été prélevé afin de caractériser au niveau métabolomique l'effet du Pip couplé à l'effet de l'infestation. Après 7 jours, les pucerons adultes et les larves produites ont été dénombrés sur le lot de plantes restant, puis les apex ont également été prélevés pour analyse (Figure 34).

L'échantillonnage, l'extraction des métabolites, l'analyse GC-MS non ciblée ainsi que la quantification des teneurs en acides aminés par LC-MS ont été réalisées comme décrits dans les matériels et méthodes du chapitre 3. De même, l'analyse ciblée des teneurs en Pip et composés associés ; SA, NHP, acide aminoadipique et saccharopine a été menée par GC-MS comme précédemment. La quantification a été effectuée à partir d'une gamme de dilution en cascade pour chaque standard avec des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  à 0.015  $\mu\text{M}$ .

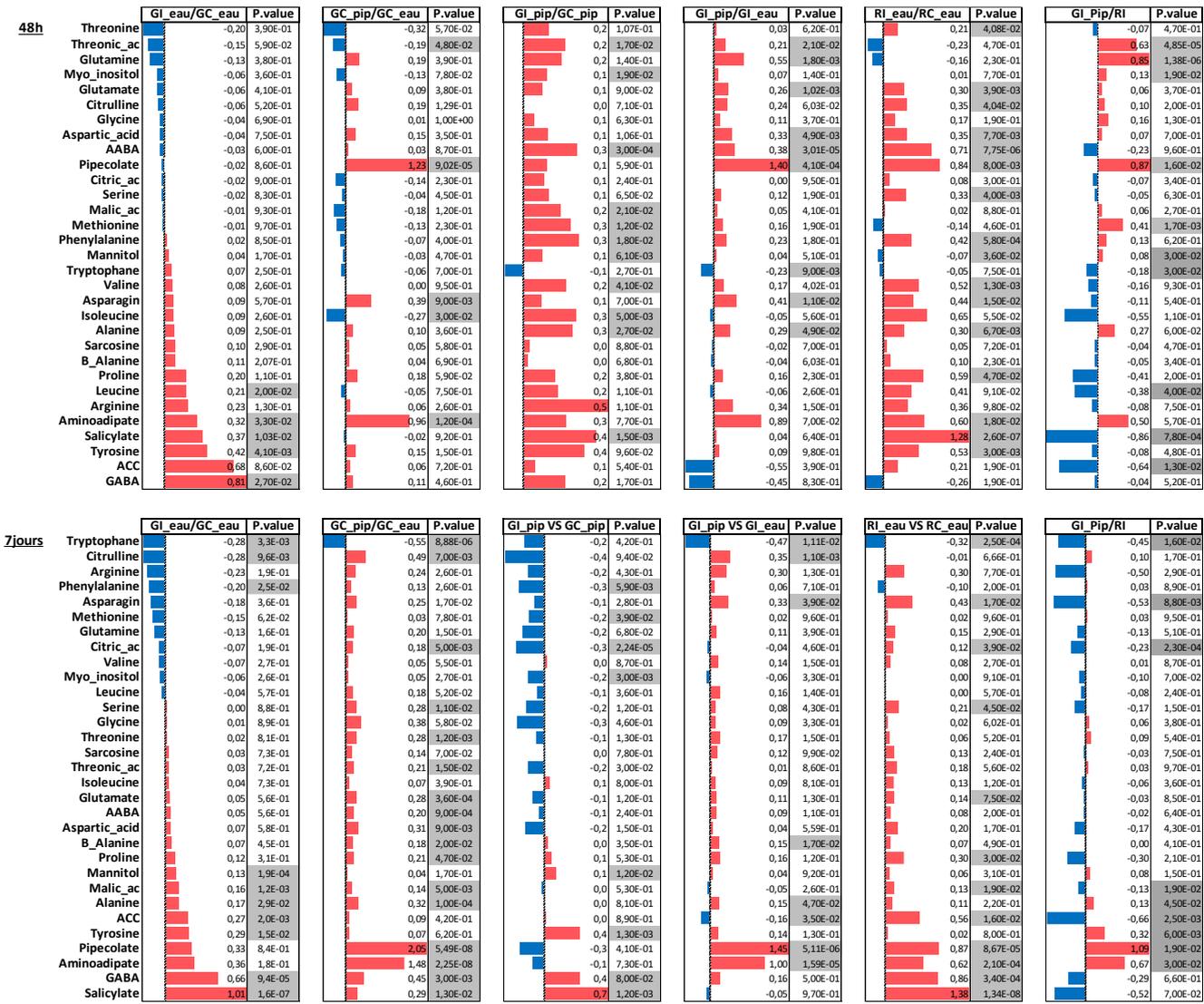


Figure 35 : Ratio d'accumulation des métabolites primaires selon les modalités comparées 48h (en haut) et 7 jours (en bas) post infestation. Le ratio Log2 de la comparaison des modalités deux à deux a été représenté sous forme de barre qui indique un ratio positif (rouge) ou négatif (bleu). Les p.value indiquent la significativité des données d'après un test Kruskal Wallis et test post-hoc de Conover.

Le standard de NHP a été aimablement fourni par le Pr. Jürgen Zeier et le Dr. Michael Hartmann (Institute for Molecular Ecophysiology of Plants, Düsseldorf, Germany).

Les analyses du métabolisme secondaire ont été réalisées avec un système UPLC Acquity I-Class (Waters, Mildorf, MA) couplé à un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (QTOF) Synapt G2-Si (Waters, Mildorf, MA) équipé d'une source d'ionisation par électro-nébulisation (ESI). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne LC Acquity 1,8  $\mu\text{m}$  HSS T3 (100 x 2,1 mm, Waters, Californie, États-Unis). La phase mobile était constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), tous deux contenant 0,1 % d'acide formique. Un microlitre d'échantillon a été injecté avant d'exécuter le gradient de solvant : 1 % de B pendant 1,5 min, puis jusqu'à 99 % de B en 16,5 min, suivi de 2,15 min à 99 % de B, puis retour aux conditions initiales en 0,75 min (durée totale d'exécution 20 min). La colonne a été maintenue à 45 °C avec un débit de 0,4 mL/min. La température de la source était réglée à 120 °C et la température de désolvatation à 450 °C. La tension capillaire était réglée à 0,8 kV et la tension du cône à 40 V. L'azote était utilisé comme gaz de séchage et de nébulisation, avec un débit de gaz de 50 L/h et un débit de gaz de désolvatation de 650 L/h. L'expérience a été réalisée en ionisation négative et positive, avec une résolution de 40 000, en utilisant une acquisition indépendante des données (MSe centroïde), avec une rampe d'énergie de collision de 20 V à 30 V. Les spectres de masse ont été enregistrés à 0,1 seconde par balayage avec une plage de balayage de 100 à 1500 m/z.

### 3.5. Analyse statistique

Les données de GC-MS et LC-MS ciblées ont été confrontées par les tests de Kruskal Wallis et test post-hoc de Conover avec ajustement de Bonferroni pour distinguer les groupes statistiques. Les données issues de l'analyse LC-MS non ciblée ont été traitées à l'aide du logiciel « ProgenesisQ1 » (Waters) qui suit les étapes d'importation, d'alignement, de détection des pics et d'identification de composants. Les données ont été filtrées à partir de 3 critères : Anova avec une p.value  $\leq 0,05$ , Max fold change  $\geq 2$  et un pourcentage de covariance (%CV)  $\leq 30$ . Une ACP a été générée par le logiciel à partir des données filtrées.

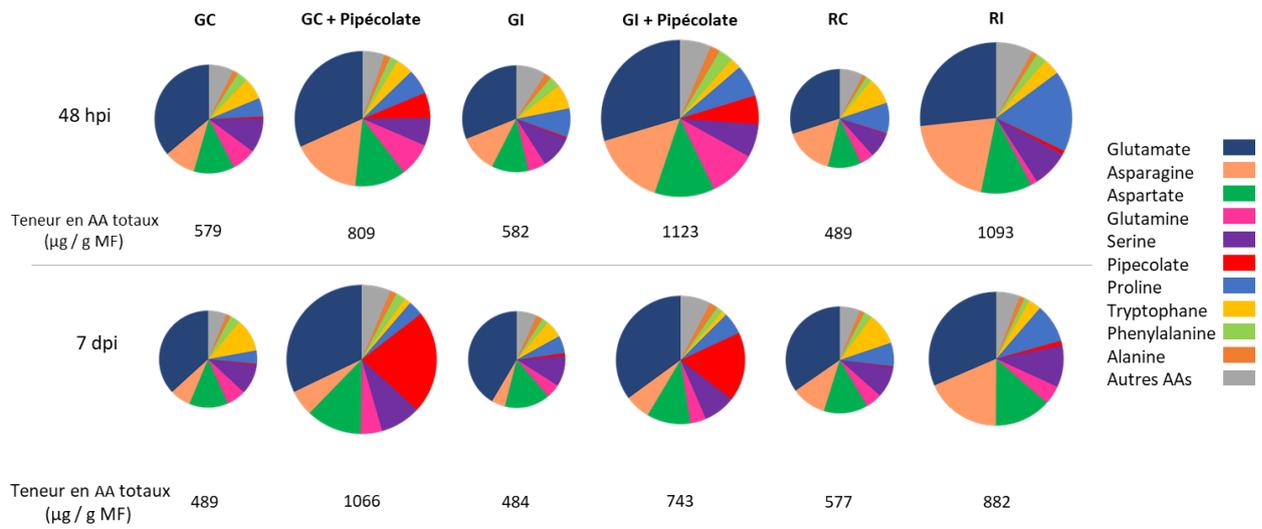


Figure 36 : Pools des acides aminés dans les différents génotypes en fonction des traitements. Rubira (RC : contrôle, RI : infesté) GF305 (G : contrôle, GI : infesté, GC\_pip : pipécolate contrôle, GI\_pip : pipécolate infesté). Le diamètre des cercles est proportionnel à la teneur totale en AA et les sections du cercle indiquent la proportion de chaque acide aminé dans le pool total selon le code des couleurs présenté à droite.

## 4. Résultats

### 4.1. Effets de l'infestation sur les profils métaboliques de GF305 et Rubira

La comparaison des réponses à l'infestation du génotype sensible et résistant en l'absence de traitement met en exergue des points communs entre les deux génotypes. Ainsi, les teneurs en tyrosine, aminoacide et acide salicylique augmentent significativement 48h après l'infestation, de même que celles de l'arginine et la leucine dans une moindre mesure (non significatif) (Figure 35). Ces résultats diffèrent de ceux présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit qui avaient alors mis en évidence une accumulation de ces composés uniquement chez le génotype résistant infesté. De plus, l'origine de l'accumulation de l'acide aminé chez le génotype sensible infesté soulève des interrogations puisque ce composé dérive de la dégradation de la lysine *via* la voie de la saccharopine qui aboutit à la synthèse de Pip, or ce dernier n'est pas accumulé 48 hpi. Ces données ont également mis pour la première fois en évidence l'accumulation significative du GABA, qui est spécifique de la réponse du génotype sensible à 48 h. De surcroît, d'un point de vue quantitatif, le profil général d'accumulation des acides aminés après l'infestation diffère fortement entre les deux génotypes puisque le pool d'AA totaux au sein du génotype résistant est multiplié par 2,2 alors qu'il ne varie pas chez le génotype sensible. Cette augmentation du pool total est principalement due à l'accumulation de l'asparagine, du glutamate et également de façon inattendue à la proline (Figure 36).

Cependant les réponses du génotype résistant restent globalement les mêmes que celles décrites dans le chapitre précédent avec une augmentation commune de l'acide salicylique et du Pip, qui suggère une activation de la SAR, une accumulation significative de la valine, tyrosine, phénylalanine, serine, AABA et thréonine et une diminution des teneurs en sorbitol, méthionine et glutamine. Quelques différences notables sont à souligner pour la proline, la citrulline, le glutamate et l'acide aspartique qui s'accumulent après l'infestation alors que leurs teneurs ne variaient pas dans l'expérimentation précédente, voire diminuaient dans le cas du glutamate.



Figure 37 : Plants de GF305 âgés de 6 semaines cultivés sur perlite (à gauche) et sur terreau (à droite).

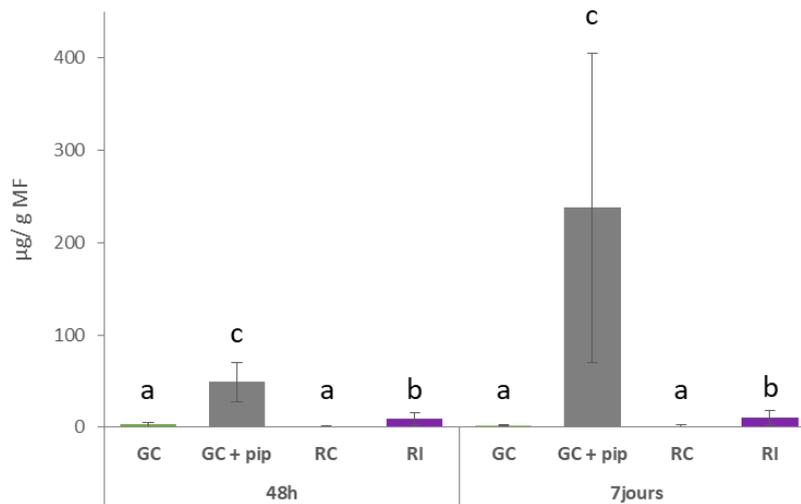


Figure 38 : Teneur en pipécolate dans les apex de GF305 et Rubira 48h et 7j après l'infestation. GC : GF305 traitement eau ; GC+Pip : GF305 + pipécolate (170µmol) ; RC : Rubira traitement eau non infesté ; RI : Rubira traitement eau + infestation par *M. persicae*. Les différences significatives selon le test Post-Hoc de Conover sont indiquées par les lettres (a,b,c).

Ces différences sont vraisemblablement en partie la conséquence du changement de substrat opéré dans cette expérimentation puisque la perlite, substrat neutre qui retient peu l'eau, ne peut fournir les mêmes ressources que le terreau à la plante, ce qui pourrait avoir pour effet d'altérer les réponses des deux génotypes à l'infestation. D'ailleurs, les plantes cultivées sur perlite étaient moins développées et présentaient certaines variations de couleur au niveau des apex (rougeâtre) par rapport aux plantes sur terreau (Figure 37).

#### 4.2. Modification du profil métabolique de GF305 en réponse à l'apport exogène de pipécolate

Avant de commenter les modifications du profil métabolique du génotype sensible engendrées par l'apport exogène de Pip, il est nécessaire de prendre en compte les teneurs en Pip endogène mesurée après l'administration du traitement. Ainsi, les teneurs en Pip dans les apex sont 17 fois (49  $\mu\text{g/g}$  MF) et 111 fois (238  $\mu\text{g/g}$  MF) supérieures dans les plantes du génotype sensible préalablement traitées après 72 h et 8 jours respectivement (48h et 7 j post-infestation) par rapport aux plants traités par l'eau (Figure 38). Malgré les essais préliminaires qui ont orienté le choix de la concentration du traitement Pip à 17 mM (2 g/L), les teneurs obtenues sont bien au-delà des valeurs physiologiques de la plante et très éloignées des teneurs mesurées dans le génotype résistant infesté, d'environ 9  $\mu\text{g/g}$  MF. De plus, les teneurs en Pip dans les plantes traitées sont très variables ce qui semble indiquer que l'absorption de ce composé n'est pas homogène entre les plantes. Enfin, l'accumulation excessive après 7 jours peut être provoquée par l'arrosage programmée des plantes, qui a permis la re-solubilisation des molécules de Pip piégées dans la perlite, ou peut également correspondre au délai de migration du composé jusqu'à l'apex. La quantité de traitement utilisée ne permet donc pas de reproduire la teneur en Pip observée chez le génotype résistant infesté et risque au contraire de provoquer des réactions non souhaitées chez la plante qui pourraient altérer sa réponse à *M. persicae*.

Cependant des effets remarquables du Pip sont tout de même notables, en particulier sur les acides aminés. D'une manière générale, l'apport de Pip a entraîné une augmentation de 29 % du pool d'AA (Figure 36). Cette augmentation est due au Pip pour 20 % et aux AA principaux Asn (34 %), Glu (21 %), Asp (12 %) et Gln (10 %) (Figure 39).

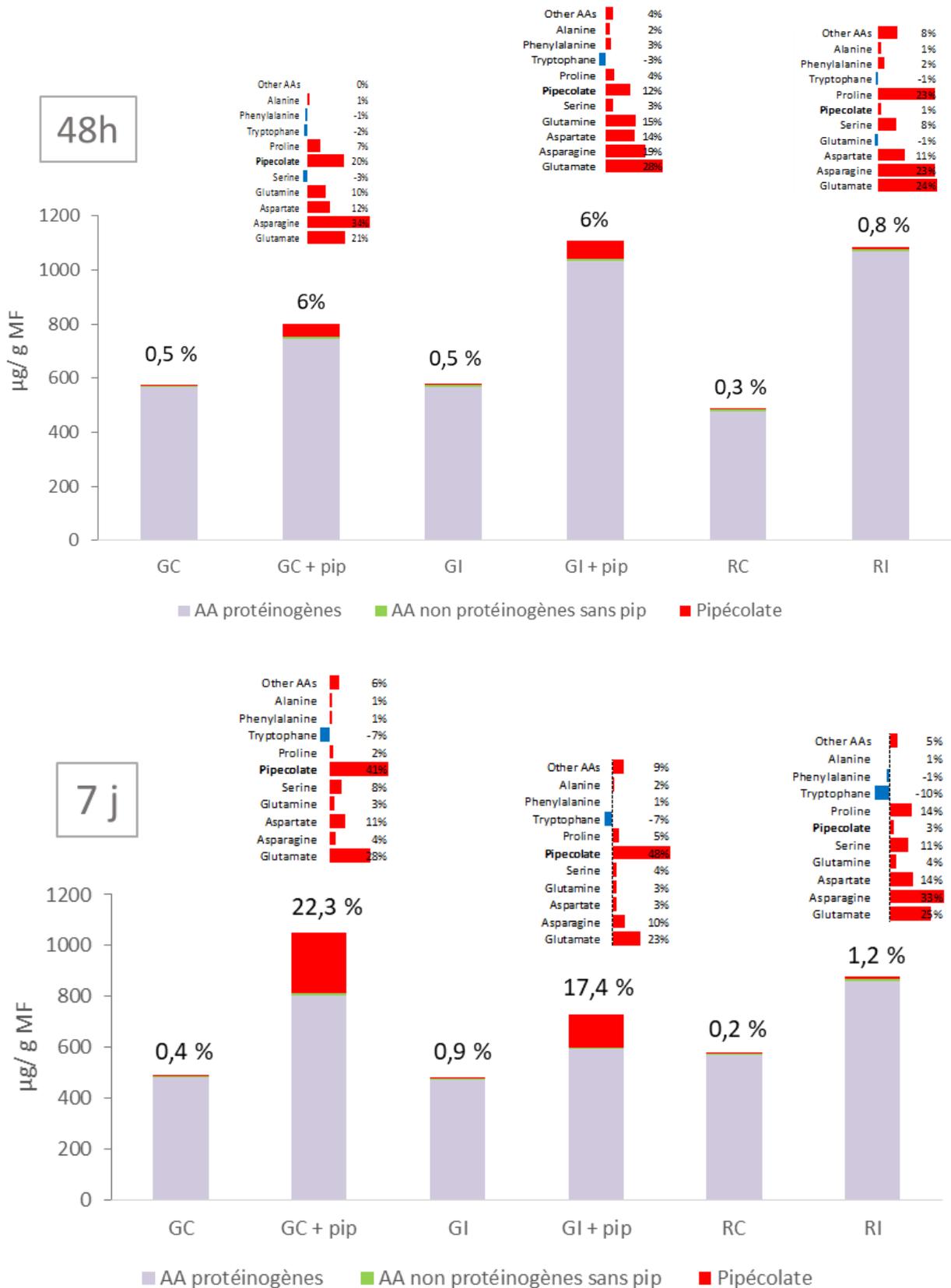


Figure 39 : Teneur en acides aminés protéinogènes, non protéinogènes et en pipécolate 48 h et 7 jours après infestation. Les valeurs au-dessus des barres indiquent la part du pipécolate en pourcentage des AA totaux. Les 3 histogrammes représentent la variation en pourcentage de la part des AAs majoritaires dans le pool total d'AAs liée chez GF305 au traitement pipécolate (GC+Pip versus GC et GI+Pip versus GI) ou chez Rubira à l'infestation (RI versus RC).

48 hpi, le Pip a particulièrement provoqué une diminution des teneurs en thréonine, isoleucine et acide thréonique et une augmentation de l'asparagine. En revanche, la proline ainsi que l'acide aminoadipique, deux produits résultant du catabolisme de la lysine *via* la voie de la saccharopine ont été accumulés (Figure 35).

7 jours après l'infestation, au moment où la teneur en Pip était en large excès au sein du génotype sensible, d'importantes modifications du métabolisme primaire ont été relevées. En effet, l'apport de Pip a induit une accumulation de 20 des 31 composés quantifiés (Figure 35).

Parmi ces composés, les teneurs en citrulline, GABA et aminoadipate ont fortement augmenté. De surcroît, et contrairement à ce qui a été observé 48 hpi, le SA est également accumulé dans GF305 traité au pipécolate. En revanche, le tryptophane est l'unique composé dont les teneurs ont été réduites après le traitement, alors que le Pip n'a pas eu d'effet sur les 2 autres acides aminés aromatiques, phénylalanine et tyrosine (Figure 35). Enfin, la quantification globale des acides aminés a montré une augmentation de 55 % du pool d'AA 7 jours post-infestation, presque 2 fois supérieure à celle mesurée 48 hpi (Figure 36). Le Pip, qui représente alors 22.3 % du pool d'AA totaux, participe pour 41 % à cette augmentation (Figure 39). Ces données confirment que l'absorption racinaire de Pip et/ou sa migration vers l'apex se poursuit vraisemblablement au-delà de 48h. De plus, elles fournissent une illustration du chamboulement métabolomique que peut provoquer le Pip sur la plante en l'absence d'infestation.

L'analyse du métabolisme secondaire sans *a priori* par LC-MS a permis d'observer le profil général des modifications engendrées par le traitement Pip sur GF305 48 hpi et 7 jours post-infestation. Nous avons mis en évidence 31 ions discriminant les plantes témoins des plantes traitées 48 hpi, ce qui représente seulement 0,8 % de l'ensemble des ions détectés. 7 jours après l'infestation, 9 % des ions détectés discriminent les 2 conditions ce qui confirme que la réponse de la plante au traitement Pip se prolonge dans le temps. Cependant, l'analyse en composantes principales de ces mêmes données montre que le traitement au Pip n'a pas eu d'effet significatif sur le métabolisme secondaire global au sein du génotype sensible après 48h ou 7 jours (Figure 40). Néanmoins, des observations au cas par cas des ions discriminants ont permis d'identifier certains métabolites affectés par le traitement.

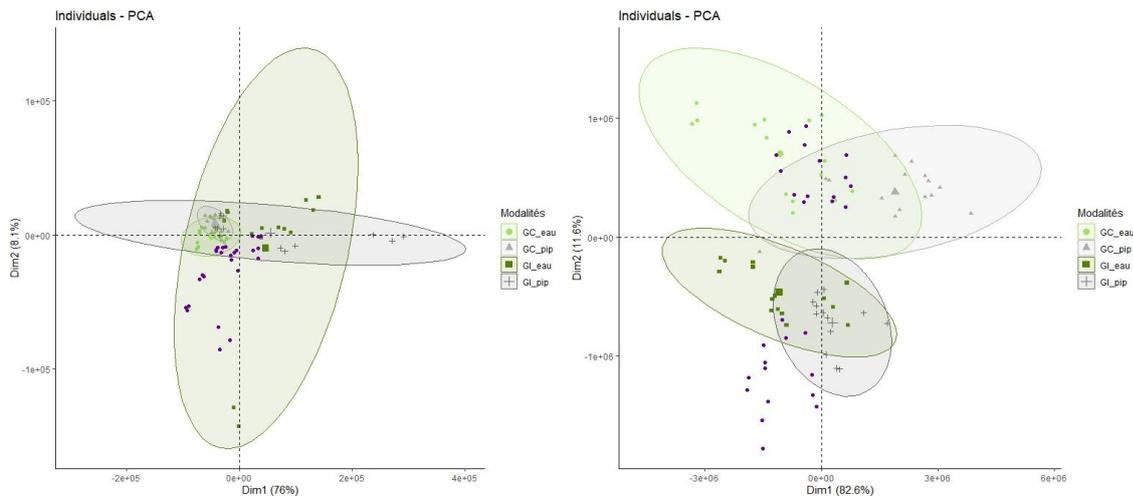


Figure 40 : Analyse en composantes principales des ions discriminants identifiés via LC-MS/QTOF dans les apex de GF305 traités avec H<sub>2</sub>O ou pipécolate puis exposés ou non à *M. persicae*. Prélèvement des apex après 48h (A) et 7 jours (B) d'infestation. Les points violets représentent les ions discriminants des modalités RC et RI, deux modalités inclus en tant qu'individus supplémentaires. Chaque barycentre est indiqué par la forme géométrique relative à chaque modalité. GC\_eau = GF305 non traité contrôle : vert clair ; GC\_pip = GF305 traité au pipécolate contrôle : vert foncé ; GI\_eau = GF305 non traité infesté : gris clair ; GI\_pip = GF305 traité au pipécolate et infesté : gris foncé.

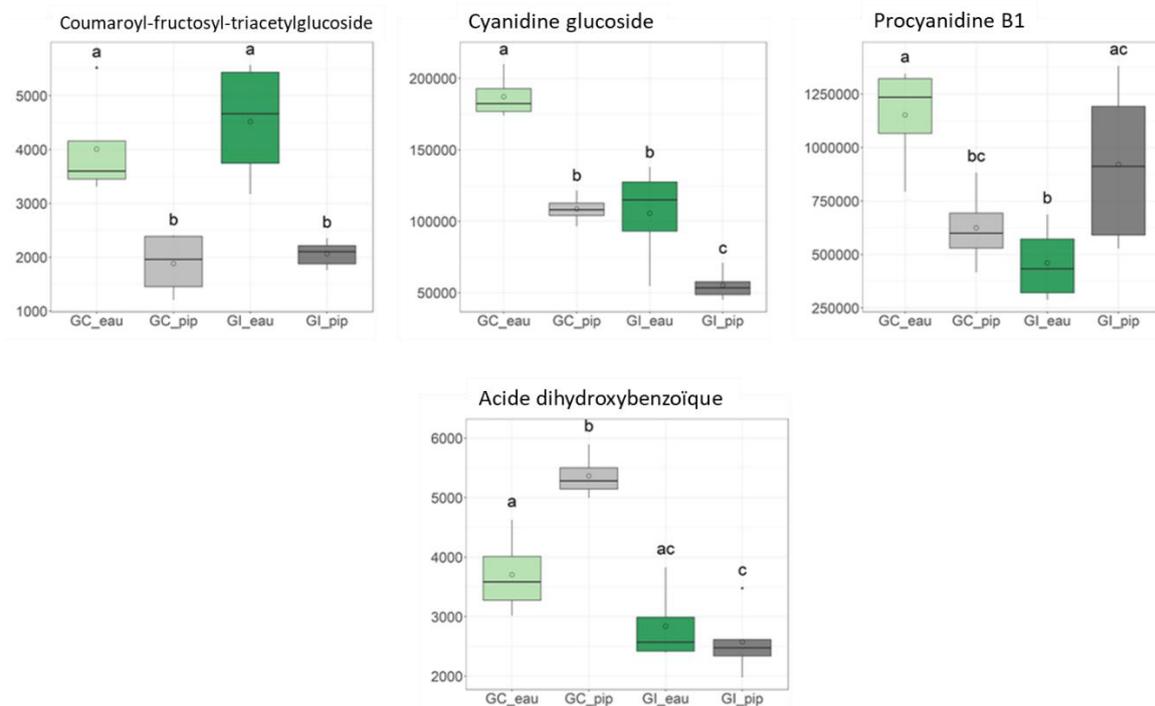


Figure 41 : Métabolites discriminants identifiés après 7 jours d'infestation. Les différences entre les conditions sont indiquées par des lettres selon un test post-hoc de Conover après un test de Kruskal Wallis (valeur  $p < 0,05$ ). GC\_eau = GF305 non traité contrôle : vert clair ; GC\_pip = GF305 traité au pipécolate contrôle : vert foncé ; GI\_eau = GF305 non traité infesté : gris clair ; GI\_pip = GF305 traité au pipécolate et infesté : gris foncé.

Après un temps d'exposition de 7 jours, nous avons pu observer 2 groupes de métabolites distincts (Figure 41) : la procyanidine B1, la cyanidine-glucoside et le coumaroyl-diacétylfructosyl-iacétylglucoside dont les teneurs ont été réduites par le traitement et l'acide dihydroxybenzoïque qui au contraire s'accumule.

#### 4.3. Modification du profil métabolique de GF305 en réponse à la combinaison de l'apport exogène de pipécolate et de l'infestation par *M. persicae*.

L'apport exogène de pipécolate sur les plantes du génotype sensible a initié la fuite significative de quelques femelles adultes dans les 24 h suivant l'infestation. Cet effet n'a pas perduré dans le temps et le nombre d'adultes sur les plantes traitées s'est stabilisé à partir de 48 h (Figure 42A). De manière surprenante, le traitement au pipécolate a favorisé la production de larves sur le génotype sensible après 72 h d'infestation (Figure 42B). La comparaison de ces résultats avec les observations recueillies en parallèle sur le génotype résistant, qui manifeste clairement une résistance vis-à-vis de *M. persicae* se traduisant par une fuite rapide des adultes et une ponte très limitée, prouve que l'apport exogène de pipécolate n'est pas suffisant pour induire la résistance chez le génotype sensible. Au contraire, il semblerait que ce traitement ait un effet bénéfique sur l'activité de ponte.

Les réponses métabolomiques de Rubira à l'infestation sont également différentes de celle de GF305 traité au pipécolate (GI\_Pip/RI) (Figure 35). Chez Rubira, l'infestation engendre la réduction des teneurs en acide thréonique, glutamine et méthionine alors qu'ils s'accumulent chez GF305 traité au pipécolate. En revanche, l'infestation favorise l'accumulation de leucine, SA et ACC chez Rubira, ce qui n'est pas le cas chez GF305 traité au pipécolate. Cette comparaison confirme que l'apport de pipécolate chez GF305 ne permet pas d'obtenir un profil métabolique proche de celui observé chez Rubira infesté. Cependant le pipécolate provoque des changements au sein de GF305, il est donc intéressant d'étudier ces changements lorsque les deux stimuli ; traitement et infestation, sont combinés.

L'infestation par *M. persicae* des plantes de GF305 préalablement traitées au pipécolate (GI\_Pip/GC\_Pip) a multiplié par 1,4 les teneurs en AA totaux au sein des plantes (GI\_Pip : 1123 µg/g MF et GC\_Pip : 809 µg/g MF) (Figure 36) qui se traduit par l'accumulation de la

plupart des métabolites primaires mesurés même si des différences significatives n'ont été relevées

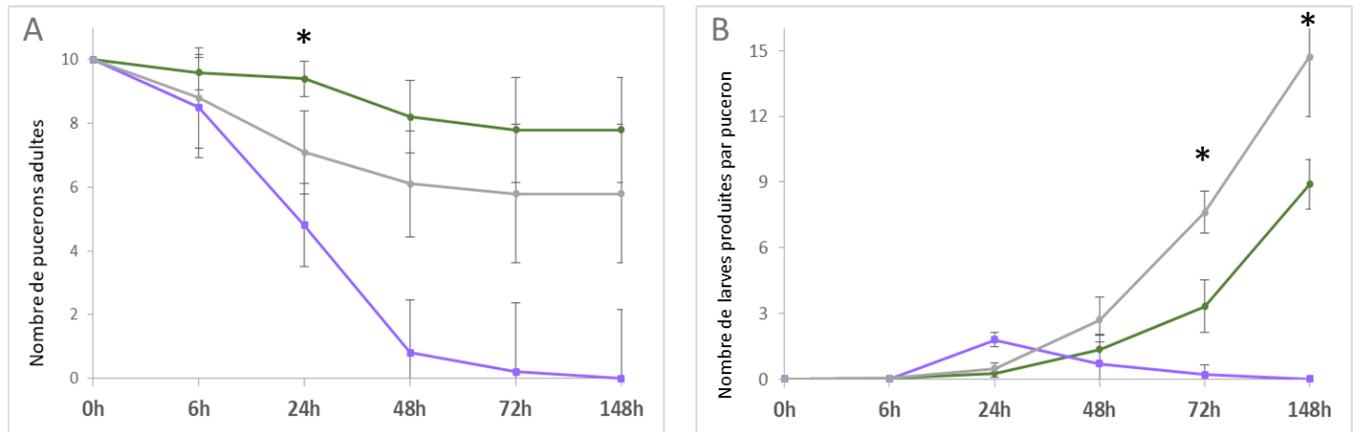


Figure 42 : **Comportement et fécondité de *M. persicae* après traitement au pipécolate.** Evolution sur 7 jours du nombre de pucerons (A, 10 pucerons déposés) et du nombre de larves produites par adulte (B) sur GF305 témoin (rond vert), GF305 traité au pipécolate (rond gris) et Rubira résistant (carré violet). Les différences significatives entre le génotype sensible avec et sans traitement selon le test de Mann Whitney sont indiquées ( $p.value < 0.01$  \*)

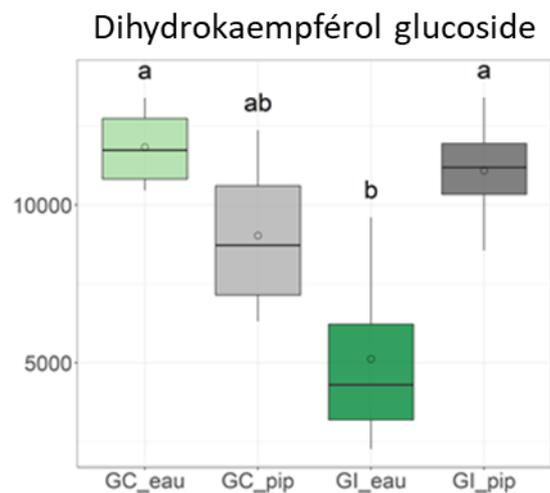


Figure 43 : **Variation de la teneur en dihydrokaempférol glucoside suite à l'infestation de GF305 traité au pipécolate.** Les différences entre les conditions sont indiquées par des lettres selon un test post-hoc de Conover après un test de Kruskal Wallis (valeur  $p < 0,05$ ). GC\_eau = GF305 non traité contrôle : vert clair ; GC\_pip = GF305 traité au pipécolate contrôle : vert foncé ; GI\_eau = GF305 non traité infesté : gris clair ; GI\_pip = GF305 traité au pipécolate et infesté : gris foncé.

que pour 11 d'entre eux ; l'acide thréonique, le myo-inositol, AABA, l'acide malique, la méthionine, la phénylalanine, le mannitol, la valine, l'isoleucine, l'alanine et le SA. Au contraire, les teneurs en tryptophane ont été plutôt réduites et celle de la citrulline n'ont pas varié (Figure 35). Ce profil d'induction se rapproche de la réponse observée chez Rubira 48 hpi (RI/RC).

Toutefois, cet effet s'est atténué après 7 jours d'infestation puisque les plantes infestées présentent une teneur en AA totaux moindre (Figure 36). De plus, le profil d'accumulation des AA change radicalement à 7 jours puisque seulement 4 métabolites sont induits : Mannitol, Tyrosine, GABA et le SA de nouveau. A l'inverse, les teneurs en phénylalanine, méthionine, acide citrique et myo-inositol diminuent dans les plantes traitées au Pip après 7 jours d'infestation (Figure 35). Concernant le métabolisme secondaire, l'effet de l'infestation sur GF305 traité par le Pip est visible uniquement 7 jours post-infestation, avec deux groupes distincts sur le plan de l'ACP qui exprime 94.2 % de la variance totale du jeu de données (Figure 40). D'une manière plus ciblée, l'infestation a provoqué la réduction des teneurs en Cyanidin-glucoside et en DHBA (Figure 41).

Enfin, l'apport de Pip semble quelque peu modifier la réponse métabolique de GF305 au puceron (GI\_Pip/GI) puisqu'il permet de doubler les teneurs en AA totaux (1123  $\mu\text{g/g}$  MF contre 582  $\mu\text{g/g}$  MF) 48 hpi (Figure 36) en favorisant en particulier l'accumulation de glutamine et glutamate, mais aussi de l'asparagine, aspartate, de l'alanine et de l'AABA. En revanche, une réduction significative de la teneur en tryptophane est notable dans ces conditions (Figure 35). Cet effet s'estompe après 7 jours d'infestation excepté pour l'asparagine, l'alanine et le tryptophane qui conserve les mêmes profils d'accumulation. Par contre, les teneurs en ACC sont cette fois significativement réduites ce qui fait suite à la tendance observable 48 hpi (Figure 35). Cette modification de la réponse métabolique ne se répercute pas sur le métabolisme secondaire global puisque GI\_Pip et GI ne sont pas discriminés sur les plans des ACP après 48 h et 7 jours d'infestation (Figure 40). Néanmoins, l'étude au cas par cas des métabolites identifiés montre tout de même une teneur en dihydrokaempférol-glucoside supérieure chez GI\_Pip par rapport à GI 48 hpi (Figure 43), de même que pour la procyanidin B1 7 jours après l'infestation. Par contre, l'apport de Pip n'est pas favorable à l'accumulation du coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside et de la cyanidin-glucoside chez les plantes de GF305 infestées (Figure 41).



Tableau 2: Méthodes d'apport et effets de traitements exogènes de pipécolate ou de NHP mentionnés dans la littérature sur différents pathosystèmes.

Pathosystème	Traitement	Réponses observées	Références
Arabidopsis / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	NHP 1mM par infiltration	Induction systémique de l'expression de marqueurs de la SAR (PR1; PR2; PR5; ALD1; SAG13; ICS1; SARD4; FMO1) Réduction symptômes nécrotiques formés par Psm Réduction croissance bactérienne	Chen et al., 2018
Arabidopsis / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>	D,L-Pip 1 mM par arrosage	Intensification expression ALD1, FMO1 Amorçage expression PR1 et production de camalexine	Bernsdorff et al., 2016
Arabidopsis / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>	D,L-Pip 0,5 mM par arrosage	Amorçage biosynthèse SA et camalexine Surexpression ALD1, FMO1 et PR1 : amorçage de la SAR Réduction croissance bactérienne Réduction des symptômes foliaires	Návarová et al., 2012
Arabidopsis / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>	NHP 1mM par infiltration	Réduction symptômes nécrotiques formés par Psm Réduction croissance bactérienne	Cai et al., 2021
Orge / <i>Xanthomonas translucens</i> Orge / <i>Blumeria graminis</i>	NHP 30µmol par arrosage	Réduction croissance bactérienne ( <i>X. translucens</i> ) Réduction croissance fongique et expansion des symptômes ( <i>B. graminis</i> ) Amorçage accumulation oxyde nitrique et anion superoxide (O <sub>2</sub> -)	Lenk et al., 2019
Tabac / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	D,L-Pip 1 mM par arrosage	Réduction croissance bactérienne Absence de symptômes foliaires Amorçage de l'accumulation de SA et nicotine	Vogel-Adghough et al., 2013
Concombre / <i>Podosphaera xanthii</i> Concombre / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> (Psl)	D,L-Pip 1, 10, 100 et 1000 µM dans le système d'hydroponie	Réduction de l'infection par <i>P. xanthii</i> et Psl Effet concentration (maximum d'effet atteint à partir de 10 µM) Réduction des symptômes foliaires lors de l'infection par <i>P. xanthii</i> et Psl Pas d'effet toxique direct du pipécolate sur les pathogènes (test <i>in vitro</i> ) Amorçage accumulation SA et gènes liés à sa signalisation (PR1, PR2, COI1, NPR1) Pas d'effet sur l'ascomycète <i>F. oxysporum</i> <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	Pazarlar et al., 2021
Concombre / <i>Fusarium oxysporum</i>	D,L-Pip 1, 10, 100 et 1000 µM dans le système d'hydroponie	Pas d'effet sur l'ascomycète <i>F. oxysporum</i> <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	
Arabidopsis / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>	NHP 1 mM par vaporisation	Diminution par 50 de la croissance bactérienne (même effet que l'arrosage)	
Tabac / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> ou <i>Maculicola</i>	NHP 1 mM par arrosage	Diminution de la croissance bactérienne	
Concombre / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	NHP 1 mM par injection dans la tige	Diminution par 100 du nombre de bactérie sur les feuilles inoculées Diminution des symptômes jaunâtres et chlorotiques foliaires	Schnake et al., 2020
Brachypodium distachyon / <i>X. translucens</i> ou <i>Magnaporthe oryzae</i>	NHP 1 mM par infiltration	Réduction par 10 du nombre de bactérie <i>X. translucens</i> et des symptômes nécrotiques Atténuation des symptômes de lésions nécrotiques induits par <i>M. oryzae</i>	

## 5. Discussion

### 5.1. L'apport exogène de pipécolate ne permet pas d'induire une résistance vis-à-vis de *Myzus persicae*

L'apport exogène de Pip par voie racinaire a entraîné une forte accumulation de la molécule dans les apex (50 µg/mg MF) qui s'est accentuée après 7 jours (210 µg/mg MF) ce qui révèle l'efficacité de l'absorption par le système racinaire et un transport de la molécule dans l'ensemble de la plante. Ce mode d'administration avait déjà été utilisé dans des travaux précédents sur *Arabidopsis*, le tabac ou l'orge et avait prouvé son efficacité dans la réduction des symptômes provoqués par des champignons et bactéries (Tableau 2). Cependant, les mécanismes d'absorptions du Pip *via* les racines et de transport n'ont pas été clairement décrits, même si Hu *et al.*, (2016) ont identifié Pip comme un constituant du phloème du concombre.

Les concentrations en Pip au sein des apex de GF305 sont largement supérieures à la concentration physiologique mesurée 48 hpi chez Rubira. Néanmoins, l'infestation des plantes traitées Pip a déclenché une réponse métabolique chez GF305 proche de celle observée chez Rubira, avec cependant une moindre amplitude. Dans cette situation, le pipécolate semble donc avoir induit l'accumulation de certains AA. Parmi eux l'accumulation d'AABA, précurseur de l'acide ophtalmique, un biomarqueur du stress oxydatif analogue du glutathion (Servillo *et al.*, 2018) est très marquée ce qui pourrait indiquer que *M. persicae* est capable d'initier une réponse de défense dans le cas d'un pré-traitement par le Pip *via* la production d'un stress oxydatif, comme c'est le cas chez le génotype résistant (chapitre 3).

Malgré tout, ces changements n'ont pas permis la mise en place d'une réponse de défense efficace contre *M. persicae* puisque fuite limitée des adultes a été noté sur GF305 traité au Pip. Au contraire, ce traitement a favorisé le développement de la colonie puisque GF305 traité abritait 2 fois plus de larves que les plantes non traitées après 7 jours d'infestation. Ce comportement diffère par rapport à celui observé sur le génotype résistant puisqu'une fuite des adultes et l'arrêt de la ponte après 48 h d'infestation correspondent aux évènements associés à la résistance médiée par le gène *Rm2*, comme nous l'avons démontré chapitre 3.

L'inefficacité du traitement pour induire la résistance à *M. persicae* pourrait s'expliquer par l'absence d'accumulation, chez le génotype de pêcher sensible 48 hpi, de marqueurs de la SAR normalement inductible par le pipécolate tel que le Glycérol-3-phosphate (G3P) (Wang *et al.*, 2018a). De même, le SA qui est une hormone de défense liée au mécanisme d'induction de la SAR et qui partage des voies de régulation communes avec pipécolate grâce aux protéines PAD4 et EDS1 (Joglekar *et al.*, 2018), n'était pas accumulé. Ceci démontre une incapacité du pipécolate à induire des réponses de défense auxquelles il est associé chez d'autres espèces végétales (Tableau 2). De plus, l'analyse sans *a priori* du métabolisme secondaire 48 hpi a mis en évidence l'induction par l'apport exogène de pipécolate d'un acide dihydroxybenzoïque (DHBA) qui correspond à l'une des principales formes inactives du SA, en particulier le 2,5-DHBA et le 2,3-DHBA. La biosynthèse de ces composés fait intervenir les enzymes S3H/DLO1 et S5H/DMR6 qui utilisent le SA comme substrat, ce qui entraîne une réduction du pool de SA au sein de la plante (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017).

Par conséquent, même si Yildiz *et al.* (2021) ont démontré qu'un traitement au NHP sur *Arabidopsis* induit l'expression des gènes de biosynthèse et l'accumulation de SA et si toutes les études ciblant ces deux composés décrivent une amplification mutuelle en raison de l'existence de régulateurs communs du SA et du pipécolate tels que les facteurs de transcription SARD1/CBP60 ainsi que EDS1 et PAD4 (Shields *et al.*, 2022), dans notre expérience l'induction de DHBA et l'absence d'accumulation du SA 48 hpi suggèrent que l'ajout en large excès du pipécolate pourrait négativement réguler l'accumulation du SA. De plus, l'accumulation significative du SA après 7 jours de traitement pourrait davantage être liée au stress provoqué par les teneurs excessives de pipécolate dans les apex que par l'action de cette molécule elle-même dans la signalisation des défenses. Le SA pouvant être induit par une multitude de facteurs biotiques et abiotiques (Khan *et al.*, 2015; Saijo et Loo, 2020), il n'est pas non plus exclu que les conditions particulières de culture des plantes en perlite aient engendré cette accumulation. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par le profil d'accumulation différentiel de la proline dans cette expérience par rapport aux résultats obtenus sur terreau (chapitre 3). En effet, la proline est ici fortement accumulée chez *Rubra* infesté alors qu'aucune variation significative des teneurs de cet AA n'ont été relevés dans la précédente étude (Annexe 16).

Plusieurs études ont montré qu'un environnement stressant provoquait la surproduction de la proline au sein de la plante, qui peut agir à la fois comme antioxydant, intervenir dans la stabilisation des structures subcellulaires comme les membranes ou encore dans le maintien de l'équilibre osmotique (Hayat *et al.*, 2012).

Dans le cas de cette expérience une analyse de l'expression de certains gènes liés à la SAR ; *PAD4*, *EDS1*, *SARD1*, *CBP60g*, *ICS1* pour le lien Pip/SA, *DIR1* et *AZI1* pour le G3P, permettrait de déterminer si (i) le traitement au pipécolate chez le pêcher ne suffit pas à induire la SAR contrairement ce qui a été démontré chez d'autres espèces végétales, (ii) l'excès de pipécolate provoque l'inverse des effets attendus ou (iii) la culture sur un milieu pauvre comme la perlite interfère avec les propriétés élicitrices du pipécolate. Néanmoins, nos données montrent que dans nos conditions l'apport exogène de pipécolate n'induit pas la réaction d'antixénose caractéristique de la résistance médiée par *Rm2*.

## 5.2. L'efficacité du pipécolate serait dépendante du pathosystème étudié

Les résultats obtenus montrant l'inefficacité du pipécolate dans la mise en place des défenses de la plante lors d'un stress biotique ne corroborent pas les récentes études qui décrivent le pipécolate et sa forme hydroxylée (NHP) comme des régulateurs de la SAR et des signaux immunitaires mobiles essentiels à la mise en place d'une résistance en réponse à des agents pathogènes bactériens ou fongiques chez certaines espèces végétales (Návarová *et al.*, 2012; Abeysekara *et al.*, 2016; Schnake *et al.*, 2020) (Tableau 2). Par exemple, Lenk *et al.*, (2019) ont observé une réduction de la croissance de *Xanthomonas translucens* et *Blumeria graminis* couplée à une induction d'oxyde nitrique (NO) après l'application de 30  $\mu\text{mol}$  de pipécolate par irrigation ce qui indique que le pipécolate induit une réponse immunitaire innée chez l'orge à travers le *priming* de NO et l'accumulation de ROS. De même, l'application de 10 mL d'une solution de pipécolate à 1 mM dans le substrat de culture de plants de tabac a initié une réaction hypersensible (HR) sur les feuilles infectées par une souche compatible de *Pseudomonas syringae* (Vogel-Adghough *et al.*, 2013). En outre, ce même traitement sur *Arabidopsis* a induit une forte réponse transcriptionnelle des gènes associés à la SAR et le *priming* de la signalisation dépendante de SA qui ont conduit à la réduction de la croissance de *Pseudomonas syringae* (Bernsdorff *et al.*, 2016).

Les concentrations de traitements utilisés ne peuvent expliquer ces différences puisque les teneurs de pipécolate endogènes mesurées dans ces études correspondent à celles obtenues dans cette expérimentation. Par exemple, sur tabac l'apport de 10 mL de pipécolate à 1 mM, correspondant à 1/10<sup>ème</sup> de la dose apportée sur les plants de pêcher de cet essai a permis d'accumuler 7 µg Pip/g MF (Vogel-Adghough *et al.*, 2013). Bernsdorff *et al.*, (2016) ont également noté une accumulation de 14 µg Pip/g MF et 70 µg Pip/g MF respectivement 24 h et 48 h après le traitement au pipécolate couplé à l'inoculation de *P. syringae*. En revanche, l'utilisation du pipécolate plutôt que du NHP, considéré comme la forme active de la molécule dans les réponses de défense (Chen *et al.*, 2018) ne semblent pas outre mesure impacter l'efficacité du traitement.

Il est vrai que l'administration du pipécolate par les racines ne permet pas de simuler une accumulation systémique de la molécule comme observée lors de l'attaque d'un bioagresseur (Návarová *et al.*, 2012), puisque dans le cas de l'arrosage, le pipécolate provient des racines et non d'une partie infectée. L'infiltration du pipécolate au niveau de l'apex, utilisé par Chen *et al.*, (2018) pour démontrer le caractère mobile du NHP et l'induction de la SAR par cette molécule, pourrait compenser ce biais. Cependant, ce mode d'administration induit des lésions importantes au niveau des feuilles inoculées susceptibles d'altérer la réponse de la plante ou le comportement du puceron.

Il est possible que la localisation du pipécolate dans la plante après absorption par les racines impacte différemment les bioagresseurs en fonction de leur mode de nutrition. Les pucerons sont des insectes piqueurs-suceurs qui utilisent leur stylet pour atteindre le phloème par voie apoplastique. La sécrétion de salive gélifiante forme une gaine autour du stylet lors de sa progression jusqu'au système vasculaire qui limite le contact du puceron avec le milieu intra et extracellulaire (Mondal, 2020). Au contraire, le cycle d'infection des bactéries et champignons phytopathogènes tels que *Pseudomonas*, *Xanthomonas* ou *Blumeria* alterne entre une phase épiphyte, durant laquelle les agents pathogènes colonisent principalement la surface des feuilles, et une phase nécrotrophique où ils se multiplient dans l'apoplasme pour les bactéries (Mensi, 2013) et de manière intracellulaire en pénétrant au travers des parois pour les champignons grâce notamment aux appressoria (Lambertucci *et al.*, 2019).

Ils prélèvent alors les ressources carbonées présentes dans ces compartiments et provoquent, dans le cas des nécrotrophes, la destruction des tissus. Ravageurs et agents pathogènes ont donc un mode de nutrition très différents ; les pucerons vont être en contact avec le contenu des cellules uniquement lors de leur brève phase d'exploration alors qu'au contraire les bactéries et champignons tentent de coloniser cette espace.

D'après la localisation des gènes de biosynthèse du pipécolate ; *ALD1* et *SARD4*, on suppose que Pip serait synthétisé dans les chloroplastes (Sharma *et al.*, 2013; Cecchini *et al.*, 2015), puis transporté vers le cytoplasme par le transporteur Enhanced Disease Susceptibility 5 (EDS5) pour former du NHP grâce à FMO1 (Zhang et Robertus, 2002; Huang *et al.*, 2020). Ainsi, les bactéries et champignons serait plus susceptibles d'être confrontés au pipécolate que les pucerons qui ne colonisent pas l'intérieur des cellules.

Néanmoins, comme l'accumulation de pipécolate n'est pas due à l'induction de sa voie de biosynthèse dans notre expérimentation mais à un apport exogène, il n'est pas possible d'affirmer ici que ce composé soit uniquement présent dans l'espace intracellulaire. Les connaissances au sujet des transporteurs de Pip sont encore limitées mais il n'est pas exclu qu'un transport apoplastique de ce composés puisse avoir lieu, comme ça a été montré pour le SA (Lim *et al.*, 2016).

Des éléments de réponses pourraient être apportés par l'utilisation de la technique d'imagerie MALDI-MS qui a permis la localisation du pipécolate foliaire après infestation par les pucerons (Klein *et al.*, 2015). Exploiter cette technique pour déterminer la localisation tissulaire du pipécolate après apport exogène donnerait une nouvelle dimension aux données recueillies dans cet essai et pourrait fournir des explications permettant de comprendre les différences d'effets observées sur des bioagresseurs distincts. Cette méthode pourrait être combinée à l'immunohistochimie qui permettrait de localiser le pIP au niveau cellulaire et de déterminer si le Pip peut entrer en contact avec le stylet du puceron lors de sa progression vers le phloème. Enfin, il serait intéressant de tester, en parallèle du puceron, le traitement sur un autre parasite du pêcher afin de déterminer si une réponse de défense est déclenchée et si le problème d'efficacité du traitement peut provenir du puceron (système d'alimentation, adaptation à GF305...).

### 5.3. L'apport exogène du pipécolate provoque des changements importants dans le métabolome susceptibles de modifier la valeur nutritionnelle du génotype sensible vis-à-vis du puceron.

L'apport exogène d'une molécule azotée telle que le pipécolate modifie le statut azoté de la plante sensible puisque les plants traités ont 28  $\mu\text{g/g}$  MF de N supplémentaire (0,0028 %) en l'absence d'infestation et 15  $\mu\text{g N/g}$  MF (0,0015 %) en présence de *M. persicae*. L'azote étant un élément limitant dans le régime alimentaire des pucerons (Dadd et Krieger, 1968 ; Ponder *et al.*, 2000), cet apport a pu affecter positivement la dynamique de la population de pucerons en augmentant la valeur nutritionnelle de la plante, ce qui expliquerait l'augmentation du nombre de larves 72 h après le traitement du génotype sensible. En ce sens, Sauge *et al.*, (2010) ont démontré sur le modèle *P. persica/M. persicae* qu'il existait une concentration optimale de N pour le développement du puceron. Alors qu'une fertilisation des pêchers avec un niveau supra-optimale de N a réduit la population de Myzus, l'une des concentrations intermédiaires de N (6 mM d'azote) a significativement favorisé l'infestation. De plus, la plus faible teneur en N dans les plantes infestées traitées Pip par rapport aux plantes témoins traitées Pip peut indiquer une éventuelle modification des flux de nutriments et en particulier une modification de l'allocation de l'azote dans la partie apicale en réponse aux pucerons (Girousse *et al.*, 2005). Cependant, il n'est pas exclu que ces variations proviennent de la consommation du pipécolate par le puceron. Pour vérifier cela, un examen des teneurs en pipécolate dans le puceron serait nécessaire.

Les analyses métabolomiques ont montré que l'apport de pipécolate par les racines a fortement affecté le métabolisme primaire, le métabolisme secondaire ayant montré très peu de variations en réponse aux traitements malgré l'augmentation des teneurs en phénylalanine, précurseur des composés phénoliques. Ces modifications concernaient surtout le profil et l'équilibre des acides aminés au sein de la plante. Ainsi, d'une manière générale, l'apport exogène de pipécolate a doublé le pool d'AA totaux chez GF305, en affectant davantage les teneurs en glutamine, asparagine, glutamate et acide aspartique. De manière intéressante, l'augmentation commune de ces acides aminés a été démontrée chez le piment (*C. annuum*) en réponse à *M. persicae* (Florencio-Ortiz *et al.*, 2021b), chez *V.faba* infesté par *A. pisum* dans une interaction compatible (Leroy *et al.*, 2011) mais aussi en condition de stress hydrique (Lugan *et al.*, 2010).

Cependant, outre la glutamine et l'asparagine qui sont les principaux acides aminés convoités par le puceron, qu'il échange avec son symbiote *Buchnera* (Douglas *et al.*, 2001) pour les convertir en acide glutamique et acide aspartique, d'autres acides aminés pour lesquels l'accumulation lors de l'infestation a été favorisée par le traitement ont été décrits comme favorables aux pucerons. Par exemple, l'alanine a été identifiée comme un phagostimulant pour *A. fabae* (Leckstein et Llewellyn, 1974) et l'augmentation des teneurs en valine a été corrélée avec l'abondance de *R. padi* chez la *Festuca Schedonorus arundinaceus* (Ryan *et al.*, 2014).

Ces composés ont d'ailleurs tous été détectés dans la sève phloémienne de diverses espèces végétales et sont donc susceptibles d'entrer en contact avec le puceron (Dinant *et al.*, 2010). De même, il semblerait que le pipécolate réduise la teneur en GABA, marqueur spécifique de la réponse à l'infestation du génotype sensible 48 hpi. Sachant que ce composé est un neurotransmetteur inhibiteur des systèmes nerveux des invertébrés dont la toxicité directe contre le puceron *Sitobion avenae* a été démontré (Cao *et al.*, 2014a), la réduction de la teneur en GABA est une autre conséquence du traitement qui pourrait favoriser l'infestation. Il semblerait donc que les changements métaboliques provoqués par le pipécolate sur le génotype sensible jouent plutôt en faveur du puceron ce qui expliquerait la forte augmentation du nombre de larves au cours de l'expérimentation.

Finalement, ces expériences ont permis de démontrer que l'application exogène de Pip au niveau racinaire provoque une accumulation excessive de Pip au sein de la plante, qui engendre des modifications du profil des acides aminés pouvant être favorables aux pucerons. Il est donc possible que le pipécolate en large excès (i) soit en partie métabolisé par la plante, ce qui engendrerait la libération d'atomes d'azote qui pourraient être recyclés dans la synthèse de nouveaux AA ou (ii) induise une protéolyse qui conduirait à l'accumulation d'acides aminés. L'augmentation par 2,5 des teneurs en Asp et de la Gln, tous deux liés au transport de l'azote dans les plantes (Lam *et al.*, 1996) ainsi que l'étude de Sauge *et al.*, (2010), qui a démontré une augmentation des concentrations en acides aminés dans de jeunes plants de pêchers après une fertilisation azotée viennent renforcer l'idée que l'azote est au moins en partie responsable des réponses du génotype sensible au traitement.

L'évaluation de l'activité enzymatique de la nitrate réductase, qui catalyse la réduction du nitrate en  $\text{NH}_2$  pour la production des protéines ou l'analyse de l'expression des gènes liés

au protéasome et au système d'ubiquitination apporterait certaines réponses pour comprendre l'origine de l'accumulation des acides aminés après l'apport exogène de pipécolate. De même, il serait possible de déterminer si l'azote consommé pour la synthèse des acides aminés provient du pipécolate exogène en utilisant une solution de traitement contenant du pipécolate marqué. Les analyses métabolomiques permettraient ensuite de quantifier les acides aminés contenant de l'azote marqué et donc issus de la dégradation du pipécolate.

#### 5.4. Limites du protocole d'expérimentation

L'ensemble de ces données fournit les premiers éléments de compréhension des effets du pipécolate sur la résistance du pêcher à *M. persicae*. Cependant, l'analyse métabolomique a des limites et il semble difficile d'associer clairement les changements observés au pipécolate lui-même ou au stress provoqué par l'ajout d'une molécule exogène azotée ce qui oblige une interprétation des résultats avec prudence. De plus, les conditions expérimentales n'étaient pas optimales. En effet, l'essai a été réalisé sur la perlite, un milieu pauvre qui peut induire un stress nutritionnel chez la plante malgré la ferti-irrigation mise en place et donc engendrer des variations importantes dans les réponses de la plante au traitement et/ou à l'infestation. Le manque d'information sur l'expression des gènes lié au cycle azoté et au recyclage de l'azote rend également certaines interprétations délicates. D'autres analyses sont donc nécessaires pour compléter ces résultats.

La répétition de l'essai sur un milieu nutritif adéquat au développement de la plante comme le terreau semble dans un premier temps indispensable et permettra d'obtenir des plants vigoureux sans carence nutritive. Cette éventualité avait été écartée dans un premier temps du fait de l'utilisation de perlite ou vermiculite dans la littérature sur le pipécolate, mais également à cause de la présence potentielle de microorganismes dans ce substrat, susceptible de dégrader le pipécolate. Cependant, des essais préliminaires en 2022 ont montré une bonne pénétration du pipécolate par les racines de pêchers cultivés sur terreau.

L'essai devra être répété en ajoutant une nouvelle modalité de traitement par un second acide aminé de structure proche du pipécolate afin de véritablement dissocier l'effet propre au pipécolate de celui provoqué par l'apport d'une source azotée au sein de la plante. Cependant, nous sommes conscients que chaque acide aminé possède ces propriétés physico-chimiques et qu'il sera donc difficile de s'affranchir de ses effets propres lors de l'interprétation des résultats. De même, les concentrations des traitements devront être diminuées pour éviter le stress lié à l'excès d'un composé. Des conditions de culture plus favorables au développement des plantes, un ajustement des méthodes de traitement ainsi qu'une analyse de l'expression de gènes clés liés à la SAR ainsi qu'au recyclage de l'azote sont les corrections à apporter lors de la mise en place du nouveau plan expérimental.

# Chapitre 5

---

Tentative de localisation  
tissulaire et cellulaire de l'acide  
3,5-dicaféoylquinique dans les  
tissus aériens du pêcher

## 1. Introduction

### 1.1. Les composés phénoliques comme phytoalexines

Les plantes disposent d'un système de défense complexe qui comprend (i) la synthèse constitutive de composés toxiques : les phytoanticipines et (ii) la synthèse induite de composés ayant une activité antibiotique contre un large éventail d'organismes : les phytoalexines. Dans de nombreux cas, les phytoalexines sont déjà présentes au sein de la plante en faible proportion et leur accumulation est renforcée lors des réactions de défense. Un nombre important de ces composés a été identifié dans des plantes d'intérêt économique et ces dernières sont généralement considérées comme des marqueurs de résistance chez ces espèces végétales (Ahuja *et al.*, 2012).

Dans le cas d'interaction plantes-pucerons, ces molécules peuvent agir en tant qu'agents répulsifs et de dissuasion alimentaire pour limiter l'installation des colonies ou en tant que molécule aphicide, provoquant la mort du puceron lors de l'ingestion. Par exemple, l'alcaloïde camalexine, phytoalexine ayant fait l'objet de nombreuses études chez les Brassicacées en réponse à des agents pathogènes, est également accumulée chez *A. thaliana* en réponse à *B. brassicae* et influence négativement la valeur sélective (*fitness*) de l'insecte (Kuśnierczyk *et al.*, 2008). De manière intéressante, la défense d'*Arabidopsis* contre les pucerons fait également appel à des phytoanticipines. Cette plante, et les brassicacées en général, possèdent des cellules spécialisées dans le stockage des glucosinolates, qui sont activés par la myrosinase lors d'une rupture des tissus et génèrent des composés toxiques. Plusieurs études ont démontré l'importance de ces composés dans la défense d'*Arabidopsis* contre *M. persicae* (Kim et Jander, 2007; de Vos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008) ce qui atteste de l'arsenal diversifié que peut posséder une plante pour répondre à un même type d'agresseur.

De même, les composés phénoliques sont très souvent impliqués dans les réponses de défense contre les pucerons. Par exemple, le soja sensible à *Aphis glycines* Matsumura accumule des niveaux élevés de plusieurs composés phénoliques de la classe des isoflavones ;

daidzéine, formononétine et génistéine dans les feuilles après une infestation à long terme (21 jours) mais seule la daidzéine a montré un effet dissuasif sur *A. glycines* lors des tests de choix (Hohenstein *et al.*, 2019). L'analyse de la distribution de ces composés par MALDI-MS a démontré qu'ils s'accumulent préférentiellement à proximité des nervures sans être toutefois localisés dans les tissus vasculaires. Il semblerait qu'une accumulation au niveau du parenchyme ou des cellules épidermiques soit privilégiée dans les feuilles lors de l'infestation (Hohenstein *et al.*, 2019). Dans la même idée, Wojcicka (2010) a comparé une lignée de triticales non transgénique à une lignée transgénique qui accumule davantage de composés phénoliques et démontré que la concentration en phénols totaux et en *o*-dihydroxyphénols dans les feuilles et les épis était négativement corrélée à la densité des populations de *S. avenae* et *R. padi*. La présence abondante des composés phénoliques dans les lignées transgéniques a donc réduit la performance des pucerons, en particulier la fécondité et le développement larvaire. Des quantités élevées de flavonoïdes comme des dérivés de la quercétine ou isorhamnétines glycosilées sont également impliquées dans les mécanismes de résistance des lignées de niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.) à *A. fabae* (Lattanzio *et al.*, 2000). En outre, des cultivars de noisetiers résistants à *Myzocallis coryli* Goetze présentaient des teneurs en acide gallique et acide caféique 1,5 fois plus élevées que les cultivars sensibles (Gantner *et al.*, 2019).

Cependant, parmi les composés phénoliques, l'accumulation de l'acide chlorogénique (5-CQ) en réponse à l'herbivorie semble être une réponse commune à de nombreuses espèces végétales (Kundu et Vadassery, 2019). Ainsi, l'acide cryptochlorogénique (4-CQ), isomère du 5-CQ a été identifié comme l'acteur principal de la résistance du pommier *Malus domestica* au puceron *Dysaphis plantaginea*. De plus, Leiss *et al.*, (2009) ont montré un effet néfaste du 5-CQ sur l'alimentation des Thrips, qui sont des insectes piqueurs suceurs au même titre que les pucerons. Cet effet serait dû aux propriétés prooxydante du 5-CQ qui pourrait s'oxyder en chlorogénoquinone et se lier aux acides aminés libres et aux protéines afin de réduire leur biodisponibilité ou leur digestibilité (Felton *et al.*, 1992).

## 1.2. L'acide 3,5-dicaféoylquinique comme potentiel facteur de résistance à *Myzus persicae*

Chez Rubira, les équipes de l'INRAE Avignon ont montré dans une étude par électropénétrographie (EPG) que *M. persicae* présentait une difficulté à localiser les cellules criblées du phloème, ce qui se traduit par une phase d'exploration prolongée avec des pénétrations répétées et une réduction de la phase d'absorption de la sève (Sauge *et al.*, 1998a). Ces résultats suggèrent donc la présence potentielle d'un facteur de résistance intra ou extracellulaire sur le trajet emprunté par le stylet pour atteindre le phloème, potentiellement un composé ayant des propriétés répulsives ou toxique vis-à-vis du puceron.

Les travaux de caractérisation fonctionnelle menés par l'INRAE sur la résistance conférée par *Rm2*, ont mis en évidence que *M. persicae* provoque chez Rubira après 48 h d'infestation un bouleversement métabolique (Poëssel *et al.*, 2006) qui impacte notamment les teneurs en composés phénoliques dans les organes infestés par *M. persicae* (Poëssel *et al.*, 2002). Les teneurs en acide 3,5-dicaféoylquinique (3,5-diCQ, dénommé aussi acide isochlorogénique A), un dérivé du 5-CQ (aussi nommé acide 5-caféoylquinique), augmentent nettement après infestation alors que celles du 5-CQ ne varient pas. Niu *et al.*, (2018) ont également mis en évidence l'expression différentielle de nombreux gènes associés aux voies métaboliques des phénylpropanoïdes et flavonoïdes et ont donc présentés ces composés, ainsi que les acides dicaféoylquiniques comme l'une des réponses de défense les plus importantes pour les pêchers contre *M. persicae*.

Les résultats présentés dans le chapitre 3 corroborent ces travaux et montrent très clairement des différences à la fois constitutives mais aussi induites par l'infestation dans la composition en polyphénols entre les génotypes sensibles et résistants. Parmi ces polyphénols les diCQ ont des teneurs plus élevées chez GF305 par rapport à Rubira en l'absence d'infestation. Cependant, l'infestation provoque leur accumulation uniquement chez Rubira. Il est donc possible que parmi ces composés figure un ou des facteurs de résistance présumés, responsables du comportement alimentaire défaillant de *M. persicae*. Cette hypothèse est d'autant plus raisemblable que chez la laitue, une activité plus importante de la PAL et des teneurs plus élevées en 3,5-diCQ sont associées à la résistance contre le puceron *Pemphigus ursarius*.

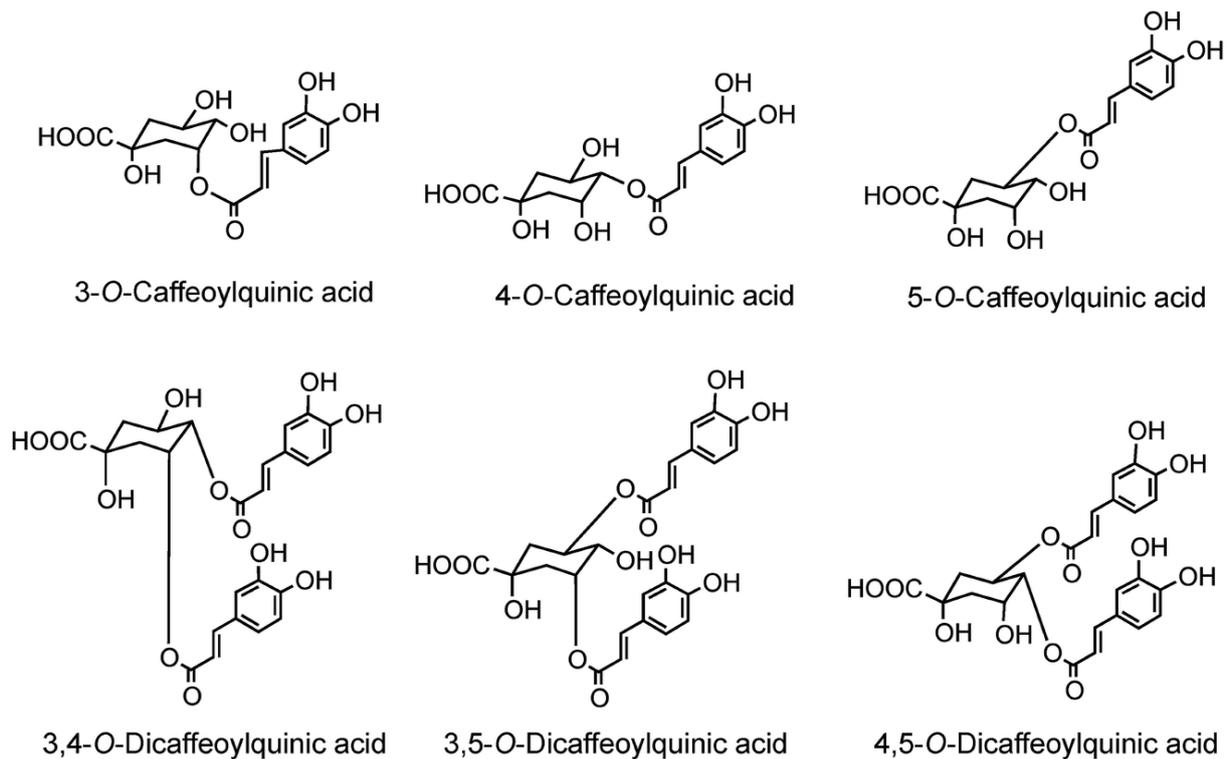


Figure 44 : Structure du 5-CQ, du 3,5-diCQ, et de leurs isomères respectifs (Clifford et al., 2017).

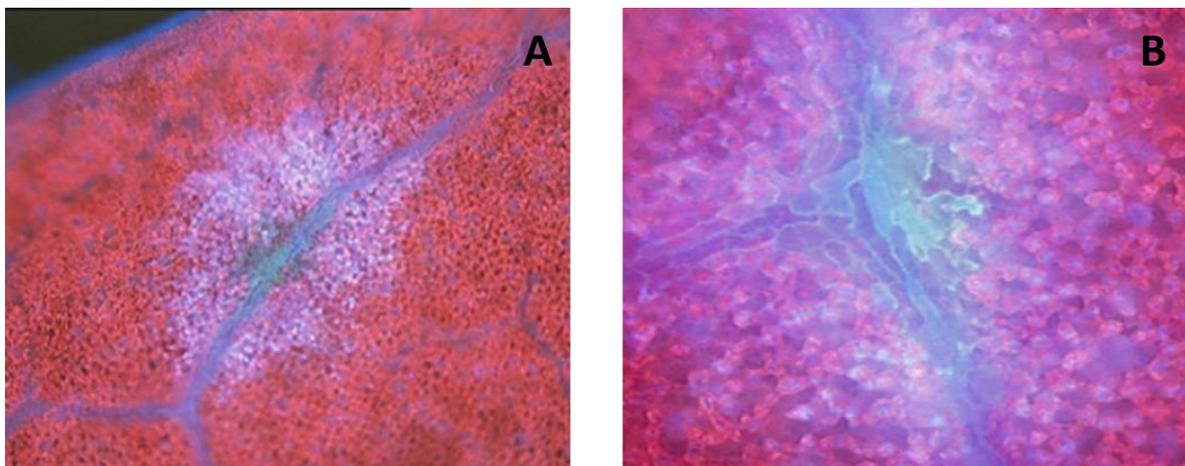


Figure 45 : Observation en microscopie optique à épifluorescence de l'autofluorescence autour des sites de piqûres des feuilles de *Rubra* infestées par *M. persicae*. Cette fluorescence est caractéristique des dérivés caféiques (Poëssel et al., communication personnelle). A : grossissement x40 ; B : grossissement x400

Ainsi, parmi les multiples polyphénols induits par l'infestation chez Rubira, le 3,5-diCQ semble être un bon candidat. Les équipes de l'INRAE Avignon ont étudié par des tests nutritifs l'activité biologique vis-à-vis des pucerons du 5-CQ, du 3,5-diCQ et de leurs isomères. Elles ont mis en évidence par des tests de choix l'activité phagoréulsive de ces composés sur toutes les espèces de pucerons testées dont *M. persicae*, *A. pisum*, *M. euphorbiae* et *A. gossypii*. En revanche, seul le 3,5-diCQ et ses isomères présentent une forte toxicité pour ces mêmes espèces, mise en évidence par une mortalité larvaire élevée sur milieu nutritif contenant cette molécule. Les propriétés aphicides des acides dicaféoylquiniques ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (Poëssel *et al.*, 2009). Enfin, les propriétés aphicides de 2 régio-isomères du 3,5-diCQ présents naturellement chez le pêcher à des concentrations plus faibles (3,4-diCQ et 4,5-diCQ ; Figure 44) ont été évaluées et ont confirmé leur caractère toxique et répulsif pour les espèces de pucerons précédemment mentionnées. Ainsi, quelle que soit la position des groupements caféoyls sur la molécule, les 3 isomères ont des effets similaires (com. pers. Poëssel., 2010). D'ailleurs, le 3,5-diCQ ainsi que son analogue structural l'acide dicaféoyltartrique ou acide chicorique sont actuellement développées par l'INRAE en tant que biopesticides (Lavoir *et al.*, com. pers). Un projet Ecophyto, «DicaBio» (Valorisation des acides dicaféoylquiniques et dicaféoyltartriques comme substances naturelles de biocontrôle), labellisé par le pôle Terralia a été mené par 4 Unités de l'INRAE Avignon en partenariat avec une entreprise phytopharmaceutique française pour développer ces molécules naturelles dans cet objectif (Siegwart *et al.*, 2022 en préparation).

Dans une autre approche histo-cytologique, l'apparition d'une autofluorescence caractéristique des acides caféiques dans les parois des cellules autour des sites de piqûre chez Rubira (Figure 45) suggère une accumulation locale de ces composés autour du site de piqûre par *M. persicae*. Cette hypothèse est d'autant plus probable que la défense chez le génotype résistant se manifeste par des réactions locales prononcées (réactions hypersensible, lésions nécrotiques) (Kfoury et Massonié, 1995). Enfin, ce phénomène pourrait également expliquer l'absence d'effet du 3,5-diCQ chez le génotype sensible qui s'accumule pourtant à des teneurs très proches (chapitre 3). Néanmoins, les modalités précises de l'accumulation du 3,5-diCQ et son rôle dans la résistance du pêcher à *M. persicae* conférée par *Rm2* restent à établir.

La voie de biosynthèse de ce composé n'est pas clairement élucidée, notamment l'étape finale de sa formation à partir du 5-CQ. Une acyltransférase de la famille des GDSL-lipase catalysant cette réaction a été récemment caractérisée chez la patate douce (Sissi *et al.*, 2020). Des gènes candidats de cette même famille GDSL-lipases ont été également découverts chez le pêcher pour le contrôle des teneurs en 3,5-diCQ (Poëssel, communication personnelle).

## 2. Hypothèse & objectifs

Le 3,5-diCQ est présent à la fois chez GF305 et Rubira en teneur équivalente dans les apex et bien qu'il s'accumule davantage dans le génotype résistant après infestation (chapitre 3), il est vraisemblable qu'une localisation spécifique de ce composé chez Rubira après infestation autour des sites de pénétration des stylets soit un facteur déterminant dans la résistance. Cependant, seules des démarches préliminaires avaient été menées pour localiser précisément ce composé et l'associer aux tentatives infructueuses de nutrition de *M. persicae* chez Rubira. Ainsi, une étude de la distribution du 3,5-diCQ à l'échelle des organes, des tissus puis des cellules a été mise en place afin examiner certaines hypothèses.

Sachant que *M. persicae* se nourrit préférentiellement sur les jeunes feuilles en croissance et établi son site de piqûre essentiellement au niveau des nervures, un dosage quantitatif du 3,5-diCQ, de son précurseur 5-CQ et de leurs isomères respectifs a été réalisé en LC-MS dans les tiges, limbes et nervures des feuilles apicales de Rubira. Ces teneurs ont été comparées aux teneurs mesurées dans GF305 et également confrontées aux concentrations létales déterminées lors des tests de nutrition *in vitro* (Poëssel *et al.*, 2009).

Les analyses par EPG ont démontré une incapacité du puceron à initier sa phase de succion du phloème sur le génotype résistant, ce qui peut indiquer la présence d'un facteur de résistance dans la sève phloémienne ou dans le trajet du stylet jusqu'au phloème (Sauge *et al.*, 1998a). Pour aborder cette question, des tentatives de localisation tissulaire du 3,5-diCQ sur des coupes transversales de tige et de feuilles de Rubira sain et infesté ont été entreprises par imagerie MALDI-MS.

Cependant, aucun résultat n'a pu être obtenu puisque l'acquisition des données a échoué en raison de problèmes d'ionisation des molécules cibles et d'une limite de détection trop élevée.

La distribution cellulaire du 3,5-diCQ a été analysée par une approche d'immunohistochimie sur des coupes d'apex pré- et post-infestation et confrontée à la littérature concernant le trajet des stylets des pucerons lors de l'infestation sur des géotypes différant par leur niveau de résistance (Hewer *et al.*, 2011). L'approche immunohistochimique a d'ores et déjà fait ses preuves pour localiser des métabolites secondaires végétaux ; elle a par exemple été employée avec succès par van Breda *et al.*, (2013) pour localiser la caféine dans le système vasculaire de jeunes feuilles de *Camellia sinensis*. De même, Xu *et al.*, (2016) ont généré un anticorps monoclonal contre les catéchines galloylées, métabolites secondaires du théier, et mis en évidence une localisation vacuolaire de ces composés. Cependant, l'un des défis de cette étude a été d'évaluer la spécificité de l'anticorps puisque le pêcher contient les isomères du 3,5-diCQ et que le 5-CQ est le monomère du 3,5-diCQ, les deux composés sont donc structurellement très proches.

Ce chapitre va donc présenter dans un premier temps la répartition des pools de 3,5-diCQ dans les différents organes de la plante puis se concentrer sur les démarches expérimentales mises en place pour évaluer la spécificité des anticorps utilisés en immunohistochimie.

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Quantification du 3,5-diCQ et isomères par LC-MS

Les teneurs en acide 3,5-diCQ, 5-CQ ainsi que les teneurs relatives de leur régio-isomères (3,4-diCQ ; 4,5-diCQ ; acide néochlorogénique (3-CQ) ; 4-CQ) ont été mesurées en l'absence ou présence de pucerons dans les tiges, limbes et nervures centrales des jeunes feuilles de l'apex de GF305 et de Rubira, à raison de 5 plants par modalité. Les prélèvements ont été effectués 48 h après l'infestation.

Les extractions ont été réalisées selon le protocole décrit chapitre 3 et une gamme d'étalonnage du 3,5-diCQ et du 5-CQ de 0,078  $\mu\text{M}$  à 500  $\mu\text{M}$  a été produite. Les échantillons ont été analysés par LC-MS avec la méthode MRM développée pour les composés phénoliques (Chapitre 3). La significativité des différences observées a été évaluée par le test de Kruskal Wallis et le test post-hoc de Conover pour une comparaison des données 2 à 2.

## 3.2. Evaluation de la spécificité des anticorps

### 3.2.1. Test d'immunoprécipitation

Les anticorps primaires ciblant le 5-CQ et le 3,5-diCQ ont été synthétisés à partir des standards purs des molécules (fournisseur) par le laboratoire Davids Biotechnologie (Allemagne) et l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488F ciblant les anticorps primaires a été obtenu auprès de Sigma Aldrich (Allemagne). Le 5-CQ et le 3,5-diCQ étant des molécules très proches ne différant que par la présence d'un groupement caféoyl supplémentaire sur le 3,5-diCQ, la spécificité des 2 anticorps primaires devait être testée. Dans un premier temps, des tests de Mancini et d'Ouchterlony axés sur le principe d'immunoprécipitation par diffusion sur gélose ont été réalisés mais n'ont pas abouti, probablement à cause des concentrations des solutions d'antigènes et d'anticorps non suffisantes pour ce type de technique.

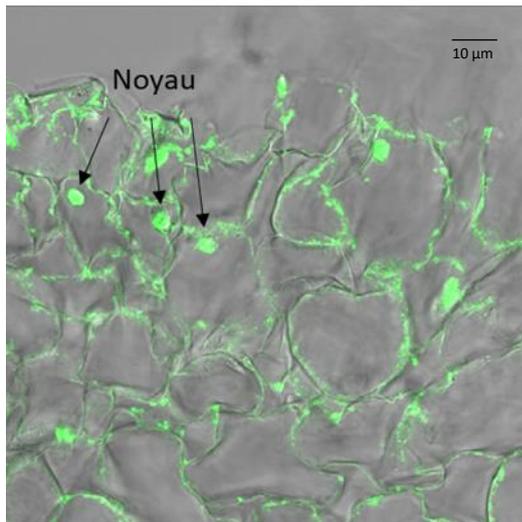
### 3.2.2. Test d'immunomarquage sur matrice neutre

Plusieurs essais basés sur l'immunomarquage ont donc été entrepris sur diverses matrices. D'abord, une membrane en Nylon Hybond imbibée d'une solution très concentrée de 3,5-diCQ a été utilisée. L'observation de la membrane au microscope à épifluorescence a confirmé la présence de la molécule sur la membrane. Pour l'immunomarquage, cette membrane a été incubée dans une solution de BSA 4% (pH 7,4) afin de bloquer les sites non-spécifiques de liaison aux anticorps pendant 1h à température ambiante, puis incubée dans la solution d'anticorps primaire à 20  $\mu\text{g/ml}$  pendant 12 h à 4°C. Après trois rinçages de 10 min dans le PBS 0,01 M, la membrane a été incubée dans l'anticorps secondaire conjugué au fluorochrome Alexa 488 à 4  $\mu\text{g/ml}$  pendant 45 min puis rincée trois fois au PBS. L'immunomarquage a finalement été vérifié par microscopie confocale en utilisant le laser 488, qui excite à la longueur d'onde 488 nm correspondant au fluorochrome de l'anticorps secondaire, et comparée au marquage d'une membrane sans dépôt préalable de 3,5-diCQ.

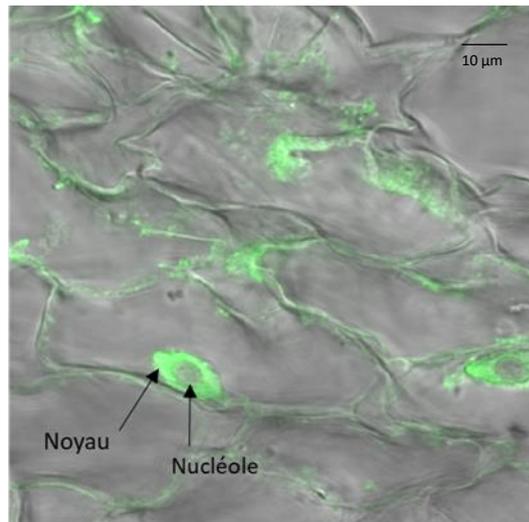
Quelques marques intenses étaient visibles sur la membrane imbibée de 3,5-diCQ mais les lavages effectués lors de l'immunomarquage ont progressivement lessivé la solution de 3,5-diCQ. De plus, la membrane en nylon Hybond fluorescence naturellement dans le vert, comme l'anticorps secondaire utilisé ce qui a compliqué les observations. Cette solution n'a donc pas été concluante pour la suite.

### *3.2.3. Le basilic comme matrice végétale pour étudier la spécificité des 2 anticorps*

Les solutions de 3,5-diCQ et 5-CQ n'étant pas retenues sur une matrice neutre lors des lavages précédant l'immunomarquage, nous nous sommes donc concentrés sur la recherche d'espèces végétales pouvant être utilisées comme témoin et matrice naturelle pour la réception du 3,5-diCQ et 5-CQ. L'objectif était d'identifier une espèce ne contenant pas de 3,5-diCQ ni 5-CQ afin d'infiltrer mécaniquement ces composés, pour qu'ils soient diffusés dans les tissus végétaux et non lessivés lors du protocole d'immunomarquage. Une comparaison de l'immunomarquage des tissus infiltré et non infiltré par les solutions de 3,5-diCQ et 5-CQ permettrait d'évaluer la spécificité des anticorps pour chacune des deux molécules individuellement. Dans cette optique, une analyse de la présence de ces deux molécules ainsi que de leur régio-isomères et de certains analogues structuraux comme l'acide chicorique a été réalisée en LC-MS. L'extraction des composés phénoliques et la vérification de leur présence ont été réalisées, *via* la méthode MRM dédiée aux composés phénoliques décrite chapitre 3, sur des feuilles de pissenlit «Dent-de-lion», des feuilles de «Grand Basilic», des feuilles de piment du cultivar Habanero à 2 stades de maturité différents (jeune feuille apicale et feuille ancienne) et sur jeune feuille de tomate « Cœur de bœuf ». La feuille de basilic était le seul échantillon ne contenant aucune trace de 3,5-diCQ et 5-CQ ni de leur isomères respectifs, c'est pourquoi nous l'avons sélectionné comme matrice végétale pour la réception de ces molécules. Par ailleurs, nous avons montré la présence d'un analogue structural du 3,5-diCQ, l'acide dicaféoyltartrique (acide chicorique), dans les feuilles du basilic ce qui a également permis d'évaluer la spécificité de l'anticorps anti-3,5-diCQ vis-à-vis d'un analogue structural.



Racine de patate douce  
Marquage AC diCQ



Racine de patate douce  
Marquage AC diCQ

Figure 46 : Immunomarquage du diCQ de racines de patates douces avec l'anticorps 3,5-diCQ. Les coupes ont été observées en microscopie confocale avec le laser 488 qui fait apparaître les marquages des anticorps en vert. Les éléments fluorescents ont été superposés au cliché de la coupe sans fluorescence.



Figure 47 : Pièges à pinces. Les pièges à pinces permettent de séquestrer les pucerons au niveau de la surface de la feuille. Ils sont maintenus par un statif afin de ne pas déchirer ou plier la feuille sur laquelle ils sont placés. Une mousse entre les deux pinces permet de ne pas abimer la feuille et d'empêcher les pucerons et leurs larves de s'échapper. Les deux faces du piège présentent une ouverture équipée d'un filet insect-proof afin de garantir une bonne aération.

Des essais d'immunomarquage ont donc été effectués (i) sur des feuilles de basilic non infiltrées (témoin négatif) et (ii) sur des feuilles de basilic préalablement infiltrées avec une solution de 3,5-diCQ ou une solution de 5-CQ à 1 mM. Des racines de patates douces, organes contenant des teneurs importantes en 3,5-diCQ (Poëssel *et al.*, 2009) ont été utilisées comme témoin positif du marquage par les anticorps (Figure 46). Des sections de 1 cm<sup>2</sup> des feuilles de basilic et des racines de patate douce ont été découpées puis placées à la verticale dans des cubes d'agarose. Des coupes de 80 µm d'épaisseur de ces sections ont été réalisées à l'aide d'un vibratome puis plongées dans une solution de fixation (paraformaldéhyde 4% dans PBS à 0,01 M + 0,1% de tween) pendant 2 h sous vide. Les coupes ont été rincées dans une solution de PBS + Glycine 0,1 M pendant 15 min puis 2 fois dans une solution de PBS. Les étapes suivantes concernant le blocage des sites aspécifiques et l'incubation des solutions d'anticorps primaires et secondaires sont les mêmes que celles réalisées pour la membrane en nylon Hybron. L'immunomarquage des coupes de chacune des modalités étudiées a été vérifié par microscopie confocale avec une excitation à la longueur d'onde 488 nm.

En parallèle, une expérimentation a été menée sur des plants de pêchers pour déterminer la localisation cellulaire du 3,5-diCQ et 5-CQ avant et après infestation par *M. persicae*. Pour ce faire, des pièges à pinces ont été installés sur GF305 et Rubira (6 plants par génotype), avant l'infestation pour éviter des réponses liées au stress de la manipulation. Après 24 h, 15 pucerons ont été déposés dans la moitié des pièges de chaque génotype et le dépôt a été mimé avec un pinceau sur les plants non infestés (Figure 47). 48 h après infestation, des sections de 1 cm<sup>2</sup> ont été découpées dans les feuilles dans les régions insérées dans les pièges à pinces. La séquestration des pucerons dans une zone restreinte a permis de réduire la surface d'infestation afin de maximiser les chances d'observer un site de piqûre lors de l'analyse des coupes en microscope confocale. Les sections ainsi obtenues ont suivi le même protocole d'immunomarquage que décrit précédemment.

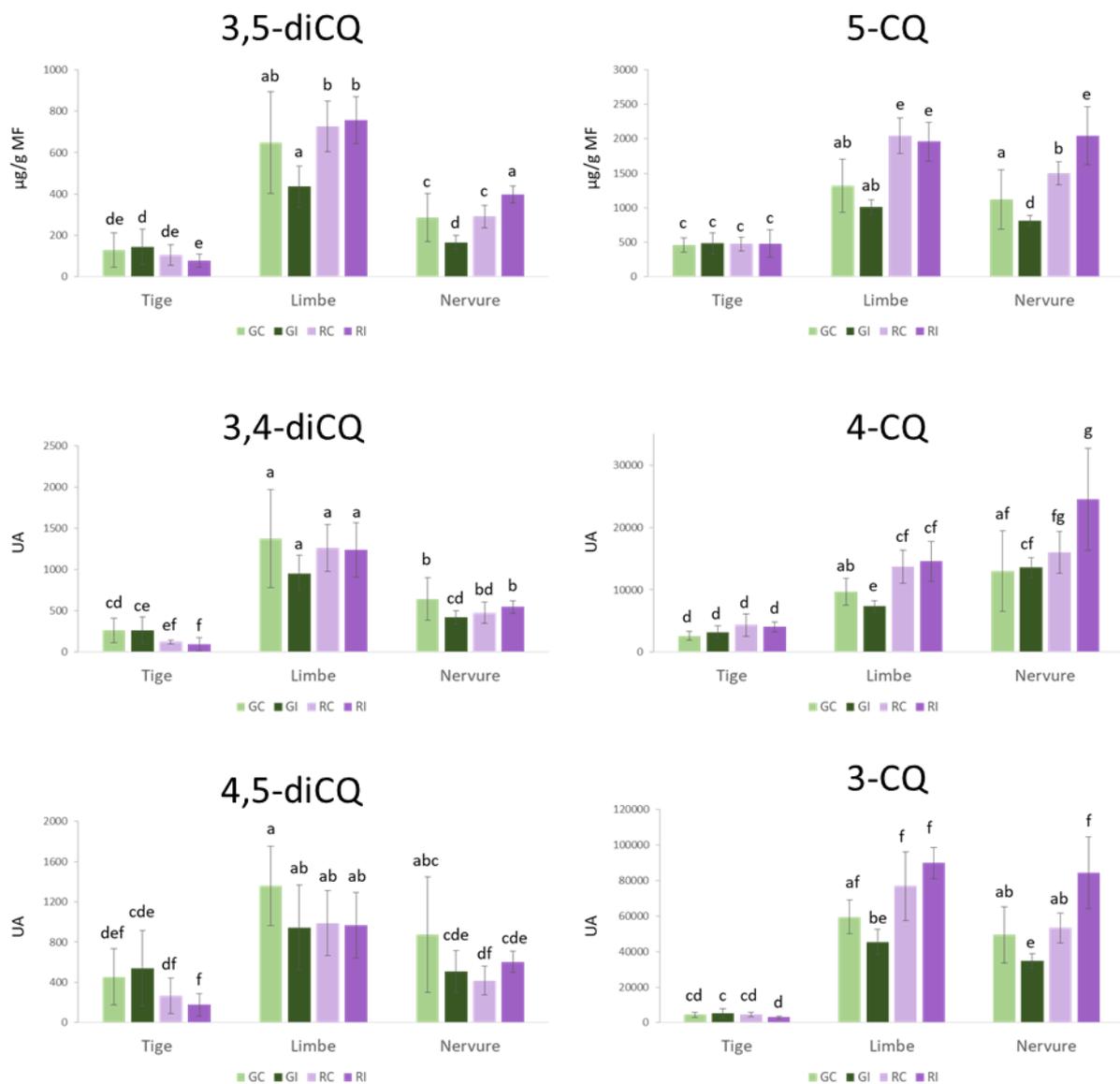


Figure 48 : Répartition du pool de 3,5-diCQ, de 5-CQ et de leurs isomères respectifs dans les différents organes apicaux en fonction du génotype et de l'infestation par *M. persicae*. Les teneurs en 3,5-diCQ et 5-CQ ont été quantifiées via une gamme d'étalonnage et sont exprimées en  $\mu\text{g/g MF}$ . Les valeurs des isomères des 2 molécules sont exprimées en aire sous la courbe afin de comparer les niveaux de ces composés dans les différentes modalités. Les différences significatives selon le test de Post-hoc de Conover sont indiquées par les lettres ( $p.\text{value} < 0,05$ ). GC : GF305 contrôle (vert clair) ; GI : GF305 infesté (vert foncé) ; RC : Rubira contrôle (violet clair) ; RI : Rubira infesté (violet foncé).

## 4. Résultats

### 4.1. Différences de teneurs en 3,5-diCQ et isomères à l'échelle des organes

L'évaluation des teneurs en 3,5-diCQ dans les différents organes a mis en évidence une teneur élevée de ce composé dans les limbes (jusqu'à 750 µg/g MF), 2 fois plus importante que celle mesurée dans les nervures centrales (300 µg/g MF en moyenne) et 6 fois supérieure à celle des tiges (120 µg/g MF en moyenne), quelle que soit la modalité étudiée. En revanche, l'infestation n'a d'effet sur les teneurs en 3,5-diCQ qu'au sein des nervures avec une accumulation significative (RI/RC = 1,36) de ce composé chez Rubira et une réduction des teneurs chez GF305 (GI/GC = 0,57) (Figure 48).

De plus, en considérant que les teneurs en eau dans les jeunes organes en croissance sont généralement de l'ordre de 90 %, il est possible d'estimer la concentration du 3,5-diCQ dans les apex du génotype résistant infesté à environ 11 mg/L. Cette concentration est 11 fois inférieure à la dose répulsive (128 mg/L) révélée par les tests de choix *in vitro* et 90 fois inférieure à la dose ayant engendré 100 % de mortalité *in vitro* (1,03 g/L) lors des tests de toxicité (Poëssel *et al.* 2009 ; Figure 49, Figure 50).

Il est également intéressant de noter une tendance de réduction des teneurs en 3,5-diCQ dans les limbes du génotype sensible après infestation, allant de pair avec celle observée dans les nervures. Ces différences pourraient donc être en partie responsables du comportement alimentaire distinct de *M. persicae* sur les 2 génotypes de pêchers. De plus, la comparaison des aires sous la courbe des régio-isomères du 3,5-diCQ ; le 3,4-diCQ et 4,5-diCQ en fonction des modalités étudiées indiquent un changement dans la teneur de ces molécules proche de celui du 3,5-diCQ, malgré des différences non significatives lors des comparaisons non infesté/infesté. Le 5-CQ, affiche quant à lui des variations similaires au 3,5-diCQ uniquement dans les nervures, bien que les teneurs soient plus élevées dans les limbes.

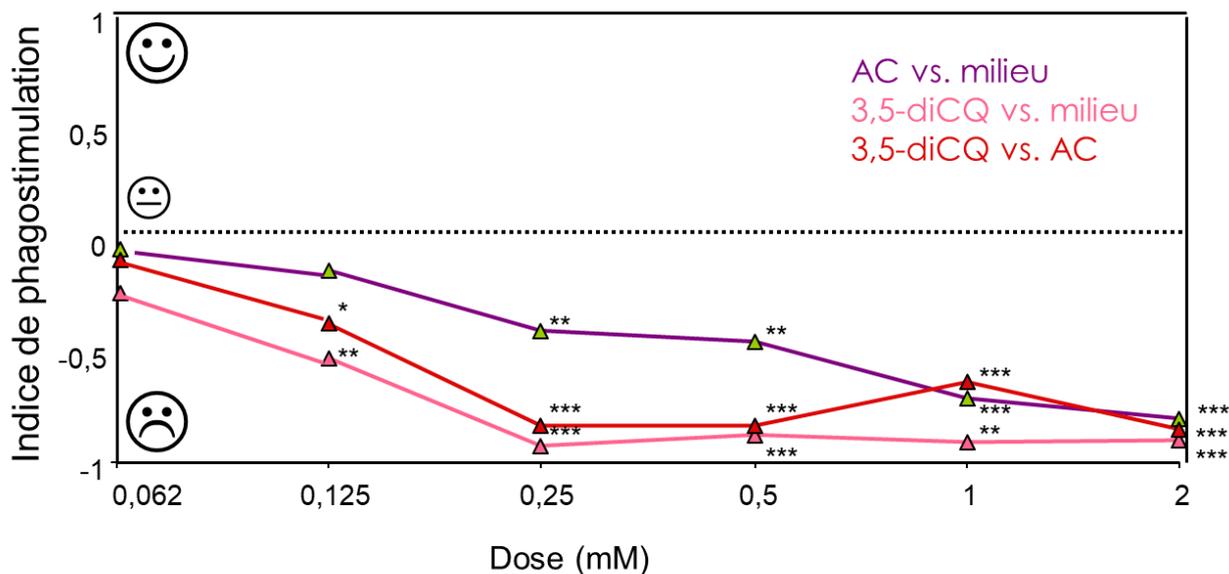


Figure 49 : **Evaluation des propriétés répulsives du 3,5-diCQ et du 5-CQ vis-à-vis de *M. persicae*.** Les propriétés répulsives des deux composés ont été évaluées en mesurant l'indice de phagostimulation vis-à-vis de *M. persicae* lors de tests de choix. Les différences significatives selon le test de Wilcoxon sont indiquées par les astérisques (\*  $p.value < 0,05$ ; \*\*  $p.value < 0,01$ ; \*\*\*  $p.value < 0,001$ ).

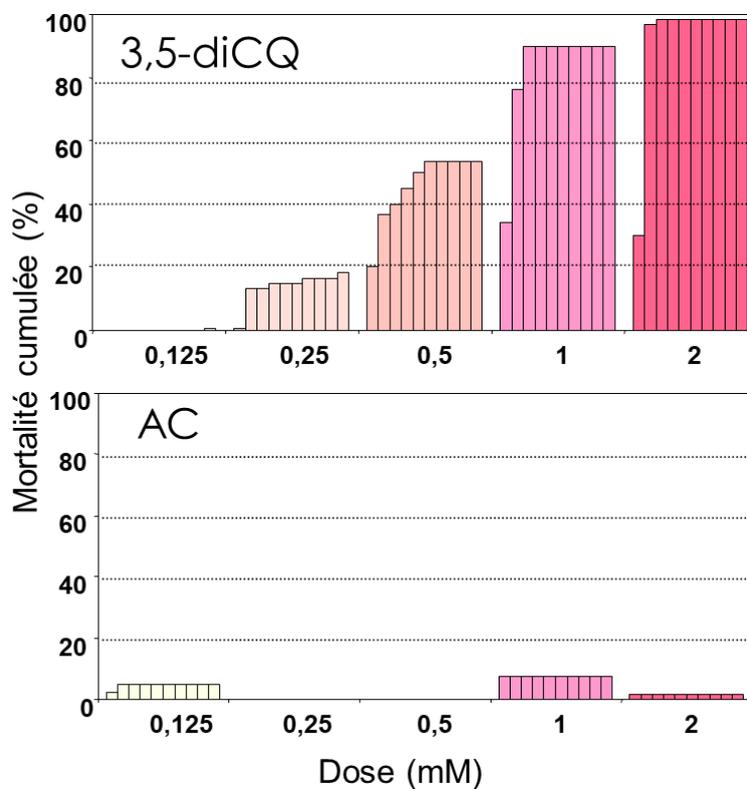


Figure 50 : **Evaluation de la toxicité du 3,5-diCQ et 5-CQ pour *M. persicae*.** L'évaluation de la mortalité larvaire cumulée de *M. persicae* a été réalisée sur milieu nutritif contenant des doses de 3,5-diCQ et 5-CQ de 0,125 mM à 2 mM.

Cependant, ces teneurs sont 2,5 fois plus importantes que celles du 3,5-diCQ dans les limbes et 5 fois plus importantes dans les nervures, ce qui pourrait indiquer qu'un pool important de 5-CQ est présent constitutivement pour la biosynthèse du 3,5-diCQ. Enfin, comme le 3,5-diCQ et ses régio-isomères, 3-CQ et 4-CQ montrent les mêmes tendances globales que le 5-CQ.

#### 4.2. Spécificité des anticorps produits pour les acides caféoylquiniques

L'immunomarquage par l'anticorps 5-CQ et 3,5-diCQ des feuilles de basilic infiltrées par les solutions de 5-CQ ou 3,5-diCQ montre la non-spécificité des anticorps vis-à-vis de ces deux molécules. En effet, nous observons un marquage par les anticorps anti-3,5-diCQ et anti-5-CQ de leur molécule cible respective après leur infiltration dans les feuilles, ce qui confirme bien l'efficacité de ces anticorps et du protocole de marquage utilisé (Figure 51). Cependant, lorsque l'on croise l'utilisation des anticorps (anticorps anti-3,5-diCQ sur feuille infiltrée 5-CQ et inversement) on obtient un marquage équivalent qui révèle le manque de spécificité de ces anticorps pour les molécules cibles pour lesquelles ils ont été fabriqués. En revanche, l'immunomarquage des feuilles non infiltrées (Figure 52) a permis d'une part de confirmer l'absence de 3,5-diCQ et 5-CQ dans le basilic et de montrer que les anticorps ne se lient pas avec l'acide dicaféoyltartrique, analogue structural du 3,5-diCQ, présent en abondance dans la plante. Le 3,5-diCQ et le 5-CQ sont donc certainement trop proches structurellement pour accrocher spécifiquement les anticorps, l'hypothèse étant alors que la zone de liaison antigène-anticorps se trouverait au niveau de la liaison caféoyl-quinone.

La spécificité des anticorps n'ayant pas été validée, l'utilisation de l'immunohistochimie pour déterminer la localisation du 3,5-diCQ seul au niveau cellulaire est donc inenvisageable. Toutefois, l'immunomarquage par ces anticorps réalisé dans un second temps sur des feuilles de pêcher peut livrer des informations concernant la localisation globale des dérivés caféoylquiniques dans cette espèce chez Rubira et GF305. Les marquages aux anticorps révélés dans le génotype sensible et résistant en présence ou absence de *M. persicae* (Figure 53 et Figure 54) ne montrent pas de différences flagrantes entre les 2 génotypes ni même entre les conditions d'infestation, que ce soit au niveau de la localisation

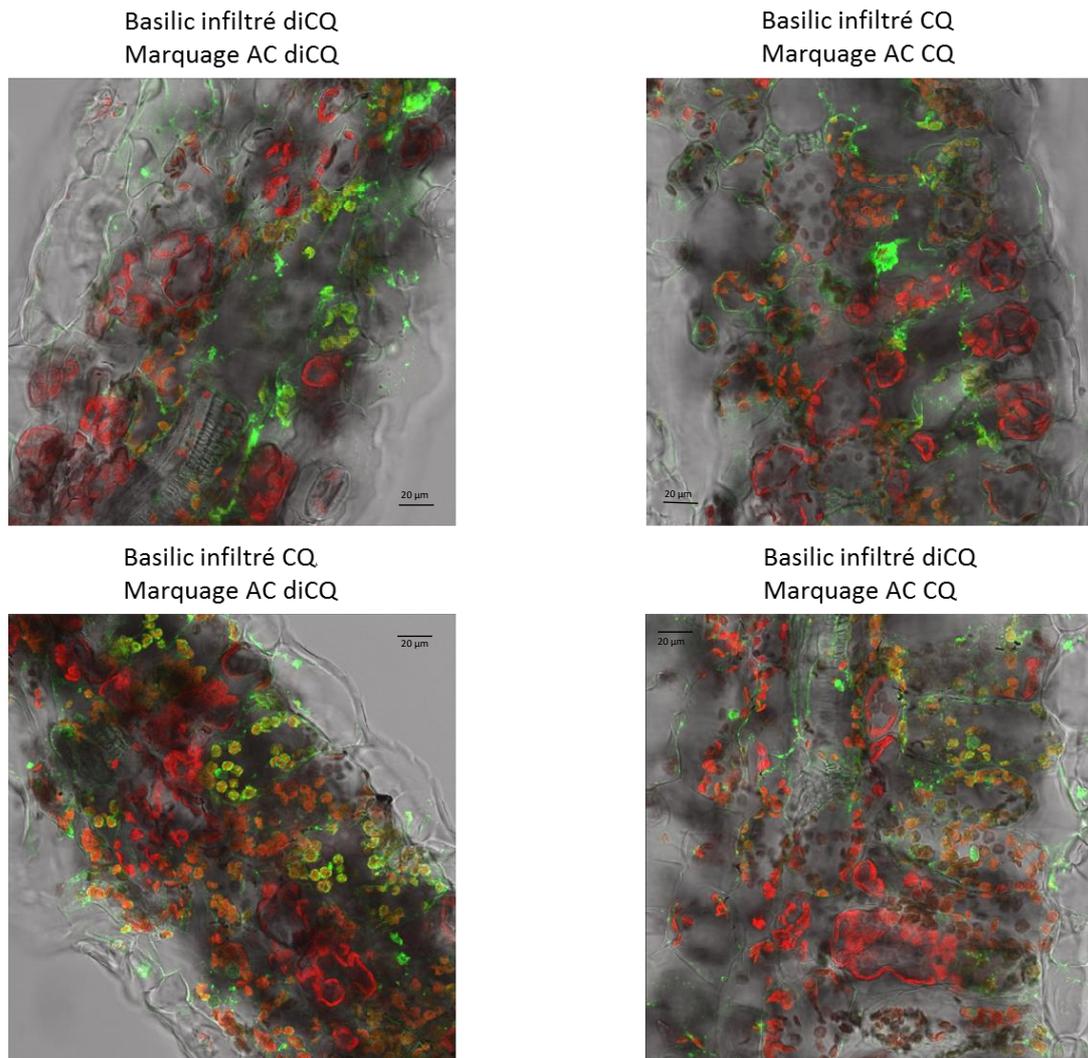


Figure 51 : Immunomarquage des feuilles de basilic préalablement infiltrées par une solution de 3,5-diCQ ou de 5-CQ. Les coupes ont été observées en microscopie confocale avec le laser 488 qui fait apparaître les marquages des anticorps en vert. La coloration rouge correspond à l'autofluorescence de la chlorophylle entre 650 et 700 nm. Les éléments fluorescents ont été superposés au cliché de la coupe sans fluorescence.

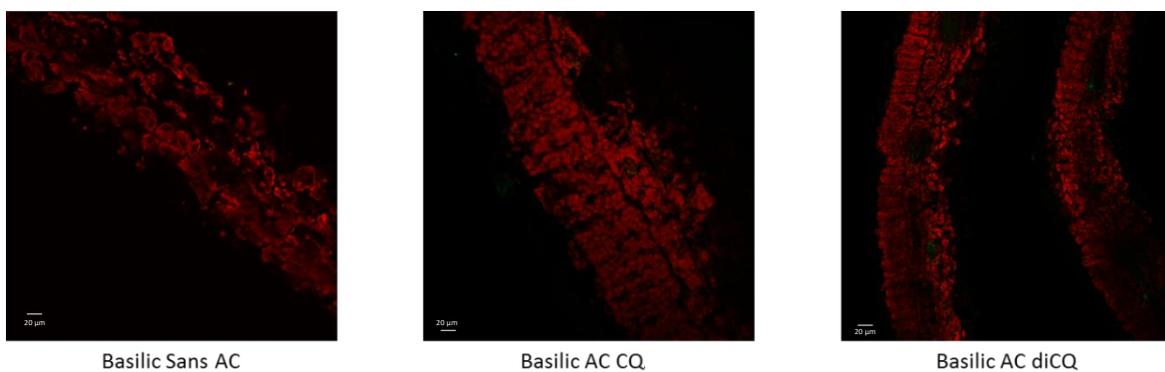


Figure 52 : Immunomarquage de feuilles de basilic avec les anticorps 3,5-diCQ et 5-CQ. Les coupes ont été observées en microscopie confocale avec le laser 488 après immunomarquage. La coloration rouge correspond à l'autofluorescence de la chlorophylle émise entre 650 et 700 nm.

ou de l'intensité du signal. Il n'est évidemment pas exclu que la non-spécificité des anticorps masque certaines données significatives. Néanmoins, d'une manière générale, il semblerait que ces composés s'accumulent préférentiellement dans le cytoplasme des cellules épidermiques. De plus, l'aspect granuleux du marquage au niveau de ces cellules indique la présence éventuelle de vésicules riches en ces composés. La nature de ces vésicules reste indéterminée, mais ces signaux se rapprochent de ceux mesurés chez *Coffea canephora*, qui montraient une concentration importante de 5-CQ et mangiférine dans des vésicules au niveau des cellules épidermiques (Talamond *et al.*, 2015). Enfin, la superposition du marquage des anticorps avec le signal émis par la chlorophylle (rouge) souligne l'absence des molécules ciblées au niveau des cellules chlorophylliennes, ce qui renforce l'idée d'une compartimentation spécifique de ces composés.

## 5. Discussion

### 5.1. Accumulation préférentielle du 3,5-diCQ et de ses régio-isomères dans le système vasculaire des jeunes feuilles apicales de Rubira.

La composition et les teneurs en composés secondaires dans chaque organe de la plante vont dépendre des conditions physiologiques et environnementales dans laquelle elle se trouve mais varient également en fonction de son stade de développement. Par exemple, l'accumulation de métabolites secondaires dans les jeunes feuilles est récurrente et généralement associée aux stratégies de défense contre les herbivores puisque le taux d'attaques sur les jeunes organes en croissance est souvent plus important que sur les feuilles matures : c'est la théorie de la « défense optimale » (Gherlenda *et al.*, 2016 ; Barto et Cipollini, 2005; Hunziker *et al.*, 2021). Ainsi, l'espèce *Inga umbellifera*, une fabacée tropicale originaire d'Amérique, accumule des niveaux importants de flavanoïdes, et des tannins dans ses plus jeunes feuilles. Ces niveaux diminuent ensuite dans les feuilles plus matures (Brenes-Arguedas *et al.*, 2006). De même, Valares Masa *et al.*, (2016) ont montré que le type d'organe et leur maturité influencent significativement la quantité de métabolites secondaires. Chez *Cistus ladanifer*, les quantités de flavonoïdes et diterpènes totaux sont plus élevées dans les jeunes feuilles que dans les feuilles matures et dans les tiges. Pourtant, cette théorie s'oppose à

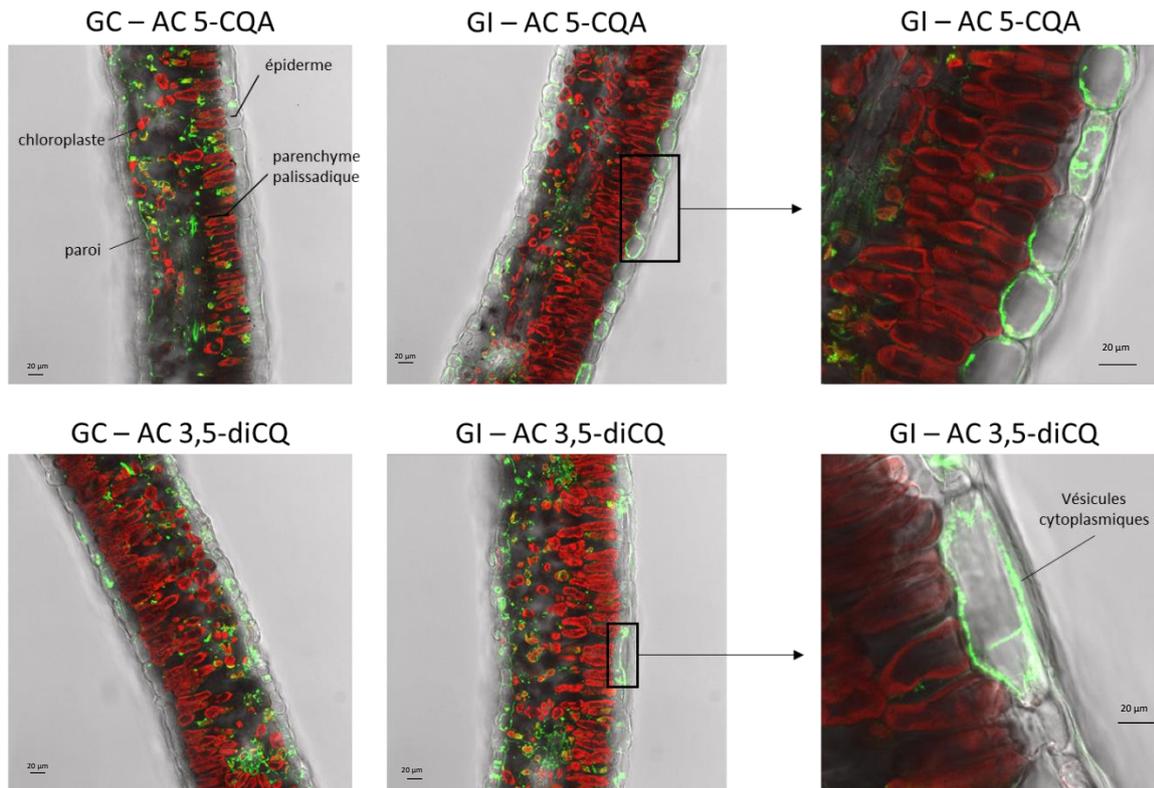


Figure 53 : Immunomarkage des feuilles de pêcher du génotype sensible avec ou sans infestation. Les coupes ont été observées avec le laser 488 qui fait apparaître les marquages des anticorps en vert. Les parties rouges correspondent à l'autofluorescence de la chlorophylle entre 650 et 700 nm. Les éléments fluorescents ont été superposés au cliché de la coupe sans fluorescence.

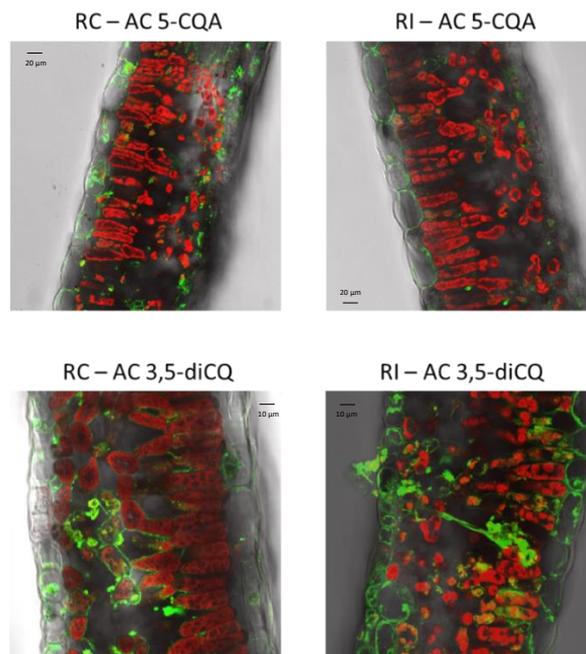


Figure 54 : Immunomarkage des feuilles de pêcher du génotype résistant avec ou sans infestation. Les coupes ont été observées avec le laser 488 qui fait apparaître les marquages des anticorps en vert. Les parties rouges correspondent à l'autofluorescence de la chlorophylle entre 650 et 700 nm. Les éléments fluorescents ont été superposés au cliché de la coupe sans fluorescence.

l'hypothèse de l'équilibre croissance-différenciation qui prédit cette fois que les organes matures, à croissance lente disposent d'un pool de ressources alloué à la défense plus important et auraient donc un niveau de défense supérieur (Barto et Cipollini, 2005). D'autres composés comme les tannins condensés ou les lignines, considérés comme des défenses constitutives sont effectivement davantage présents dans les feuilles matures (Coley, 1988) et diminuent l'attractivité de ces organes pour les herbivores.

Dans ce contexte, l'accumulation importante de 3,5-diCQ dans la zone apicale du pêcher à des teneurs d'environ 1 mg/g MF chez les génotypes sensibles et résistants non infestés, de 0,75 mg/g MF chez le génotype sensible infesté à 1,2 mg/g MF chez le résistant après infestation, pourrait donc être une conséquence évolutive de la pression exercée par *M. persicae* ou d'autres bioagresseurs sur *P. persica*, comme Ehrlich et Raven, (1964) l'ont proposé dans leur modèle de co-évolution basé sur l'interaction entre certains papillons phytophages et leur plantes hôtes. D'ailleurs, outre le 3,5-diCQ, les teneurs exceptionnellement élevées en Prunasine, de l'ordre de 150 mg/g MS (Sauge *et al.*, 2010) pourraient également être une conséquence de ce processus. Néanmoins, l'augmentation des teneurs en 3,5-diCQ après infestation dans le génotype résistant suggèrent davantage une réponse induite plutôt qu'une défense constitutive comme il est question dans le modèle de co-évolution d'Ehrlich et Raven.

La mesure des teneurs du 3,5-diCQ, de son précurseur le 5-CQ, et de leurs régio-isomères dans différents organes apicaux (tige, nervure centrale, limbe) a permis d'ajouter une nouvelle dimension aux données précédemment recueillies qui vont dans le même sens que les résultats acquis dans l'approche métabolomique : des composés potentiellement actifs dans la défense diminuent après infestation chez GF305 alors qu'ils augmentent chez Rubira. Nos données mettent en évidence une augmentation des teneurs en 3,5-diCQ, 5-CQ et leurs isomères dans les nervures du génotype résistant infesté uniquement, alors que le contraire a été observé chez le génotype sensible. La première hypothèse découlant de ces observations semble donc s'orienter vers une accumulation de ces composés dans le système vasculaire après infestation, potentiellement au niveau de la sève phloémienne puisqu'elle est davantage convoitée par le puceron. Ainsi, de par ses propriétés répulsives, ce composé une fois ingéré par le puceron pourrait provoquer une inhibition potentielle de protéines cibles,

une saturation des peroxydases et catéchol oxydases de l'intestin (Peng et Miles 1991), ou encore la perturbation de la microflore intestinale, voire de l'endosymbiote des pucerons *B. aphidicola* qui serait délétère pour le puceron.

Cette hypothèse est conforme aux données de plusieurs études qui attestent de la présence de composés phénoliques dans le système vasculaire des plantes. Par exemple, Schmid *et al.*, (1984) ont localisé des polyphénols par microscopie électronique à transmission (TEM) au niveau de la membrane du cytoplasme des tubes criblés. D'autres travaux ont lié la présence de certains composés phénoliques du phloème à des réactions de défense. Brignolas *et al.*, (1995) a montré que l'inoculation de l'Épicéa de Norvège (*Picea abies*) par le champignon *Ophiostoma polonicum* induit un changement radical de la composition des vaisseaux de phloème. Ainsi, une accumulation de (+)catéchine intervient rapidement après l'inoculation au détriment de la synthèse de d'isorhapontine puis les polyphénols glycosides diminuent dans les jours qui suivent l'infection au profit des aglycones, composés insolubles qui présentent un pouvoir fongicide important. De même, chez le manioc (*Manihot esculenta Crantz*), la rutine et deux kaempferol-glycosides sont transloqués dans la sève phloémienne lors d'une attaque de la cochenille (*Phenacoccus manihoti* Matt. Ferr) et sont ingérés par cet insecte phloémophage (Calatayud *et al.*, 1994).

Enfin, la localisation potentielle de 3,5-diCQ dans le système vasculaire est cohérente avec le comportement alimentaire de *M. persicae* décrit par Sauge *et al.*, (1998a) sur le génotype de pêcher résistant Rubira porteur de *Rm2*, qui était d'incapable d'initier de longue phase d'absorption de la sève phloémienne et multipliait les tentatives de pénétration. De surcroît, la résistance contrôlée par *Rm2* provoque la fuite des pucerons plutôt que leur mort ce qui peut signifier que ce serait davantage le caractère répulsif du 3,5-diCQ qui pourrait agir plutôt que sa toxicité dans le comportement de fuite du puceron.

## 5.2. Un transport actif du 3,5-diCQ vers le site de piqûre ?

La synthèse induite de 3,5-diCQ autour des vaisseaux conducteurs lors de l'infestation est l'une des hypothèses qui pourrait expliquer le comportement alimentaire de *M. persicae*. Cette synthèse pourrait intervenir lors de la progression du stylet jusqu'au phloème

et, grâce aux propriétés antioxydante et chélatrice de cations du 3,5-diCQ, permettrait à la plante de bloquer le puceron avant qu'il ne puisse endommager le phloème. Par exemple, Will *et al.*, (2012) ont déterminé que le durcissement de la gaine salivaire sécrétée lors de la progression du stylet est dépendant de l'oxygène, probablement puisque la polymérisation des protéines de la gaine se fait par oxydation des groupes sulphyryl. La présence d'orthodiphénols comme le 3,5-diCQ dans les espaces intercellulaires empêcherait alors le durcissement de la gaine en réagissant avec l'oxygène pour la formation des quinones, ce qui limiterait la protection du stylet offerte par la gaine salivaire.

Cependant, il n'est pas exclu que l'augmentation des teneurs de ce composé dans les nervures soit uniquement la conséquence de son transport actif dans la sève phloémienne, afin de le rediriger spécifiquement vers le site de l'infestation. Les propriétés du 3,5-diCQ pourraient également exercer une action inhibitrice sur des protéines de la salive aqueuse injectée dans la sève phloémienne pour faciliter son absorption et neutraliser les défenses de la plante (Hewer *et al.*, 2011).

Ces deux possibilités de synthèse locale ou de transport peuvent être la conséquence directe de l'apparition des lésions nécrotiques caractéristiques de la réponse hypersensible mise en place chez le génotype résistant Rubira après infestation (Pascal *et al.*, 2002). En effet, la réponse hypersensible aboutit généralement à la destruction des cellules attaquées par un phénomène de mort programmée, dans le but de limiter l'alimentation des pucerons ou la propagation des agents pathogènes. Cette réaction est généralement associée à d'autres réponses de défense comme l'accumulation de composés phénoliques au niveau des zones endommagées. Vleeshouwers *et al.*, (2000) ont observé par microscopie électronique à balayage le dépôt de globules extracellulaires riches en composés phénoliques près des cellules présentant une HR. De plus, l'infiltration d'extraits de feuilles d'érable rouge contenant des concentrations importantes en polyphénols (31 g/L) dans des feuilles de tabac a provoqué l'apparition de lésions de type HR (Peghaire *et al.*, 2020). La synthèse locale ou la relocalisation du 3,5-diCQ vers les sites de piqûre grâce à la sève phloémienne doivent donc être étudiées afin de comprendre comment ce composé peut exercer son pouvoir aphicide avant que le puceron n'atteigne et n'endommage le phloème.

Ces résultats ont donc ouvert certaines pistes concernant le mode d'action éventuel du 3,5-diCQ et sa participation dans la résistance du pêcher à *M. persicae* mais la localisation

précise de ce composé par des techniques appropriées reste indispensable. L'immunomarquage n'ayant pas fonctionné du fait de la non spécificité des anticorps, d'autres techniques doivent être envisagées. Par exemple, la stylectomie, basée sur la collecte de sève phloémienne après section du stylet du puceron en phase d'absorption aurait pu être employée pour confirmer ou infirmer la présence du 3,5-diCQ dans le phloème. Cependant, l'utilisation de cette technique est limitée sur ce modèle expérimental puisque *M. persicae* ne parvient pas à s'installer sur le génotype résistant et prélève donc peu voire pas de sève. D'autres méthodes de collecte de sève qui n'ont pas recours à l'utilisation du puceron existent également comme celle basée sur le principe de la compression capillaire et de l'air (Li *et al.*, 2022) ou encore l'exsudation facilitée par l'EDTA mais elles comportent également des limites (taille du pétiole, interférence de l'EDTA avec la LC-MS, pollution par le relargage des contenus cellulaires des cellules lésées...).

Finalement, l'imagerie par Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI), qui a déjà prouvé son efficacité dans la localisation de certains composés phénoliques comme les anthocyanes à la périphérie de la fraise à des stades matures (Wang *et al.*, 2021b) ou les flavonols et dihydrochalcones dans le péricarpe des pommes « Golden Delicious » notamment (Franceschi *et al.*, 2012) pourrait être la méthode la plus adaptée et efficace pour la localisation *in situ* du 3,5-diCQ. Le recours à la spectrométrie de masse pourrait en effet permettre de discriminer ce composé de son précurseur le 5-CQ grâce à leur spectre distinct. Cependant, un ajustement de la méthode est nécessaire notamment au niveau (i) du choix des matrices utilisées puisqu'aucun signal n'a été détecté avec les matrices de 9-aminoacridine et de 2,5-DHBA pour le mode d'ionisation négatif et positif respectivement, (ii) de l'optimisation du dépôt de cette matrice, qui doit être homogène sur l'ensemble de la plaque MALDI et (iii) l'optimisation des coupes au cryotome qui doivent avoir un diamètre suffisamment important par rapport à la largeur du laser. Ce dernier paramètre a d'ailleurs mis en évidence la contrainte de réaliser du MALDI sur les tiges ou jeunes feuilles d'apex d'un diamètre inférieur à 1 cm. Opter pour une séquestration des pucerons sur un organe plus développé pourrait permettre de pallier à certaines de ces contraintes.

# Chapitre 6

---

Discussion générale et perspectives

Chez le pêcher, trois résistances à *M. persicae*, monogéniques dominantes et conférées par les gènes *Rm1*, *Rm2* et *Rm3* ont été identifiées dans la même région génomique au bas du chromosome 1 (Monet et Massonié, 1994; Lambert et Pascal 2011; Niu *et al.*, 2016; Pascal *et al.*, 2017). Ces gènes seraient vraisemblablement des récepteurs TIR-NBS-LRR (Pan *et al.*, 2022; Poëssel *et al.*, en cours de publication). Ils confèrent une forte résistance à *M. persicae* par un phénomène d'antixénose qui se traduit par la fuite rapide des pucerons et s'accompagne de nécroses localisées aux sites de piqûres caractéristiques d'une réaction hypersensible. L'objectif de notre travail était d'étudier l'expression de la résistance du pêcher à *M. persicae* par une approche intégrée de transcriptomique et de métabolomique et d'aboutir à une description quasi-exhaustive des fonctions biologiques activées ou réprimées par l'infestation. Notre démarche a consisté à comparer les réponses à l'infestation de deux génotypes de pêcher, GF305 sensible à *M. persicae* et Rubira porteur du gène de résistance *Rm2*. Nous avons concentré principalement notre étude sur le temps de 48 h après infestation qui correspond à la mise en place effective d'une résistance induite par *Rm2* (Sauge *et al.*, 2011).

L'intégration de deux approches omiques a jusqu'à présent été très peu exploitée pour caractériser la résistance des plantes aux pucerons contrôlée par un R gène (Zogli *et al.*, 2020). En effet, pour étudier la réponse du pêcher porteur du gène *Rm3* à *M. persicae*, Niu *et al.*, (2018) se sont essentiellement concentrés sur l'évaluation de la dynamique d'expression du transcriptome au cours de l'infestation. Quant à l'expression des résistances aux pucerons conférées par les gènes *Vat* chez le melon ou *Mi-1.2* chez la tomate, elle n'a pas été caractérisée par ce type d'approche. Nos données apportent donc une nouvelle dimension dans la compréhension des mécanismes de résistance des plantes aux pucerons sur un modèle d'intérêt agronomique majeur, l'interaction entre *M. persicae* et son hôte primaire le pêcher. Nos analyses ont mis en évidence une très forte réponse de Rubira à l'infestation qui s'oppose totalement à celle de GF305 chez qui, de très faibles changements ont été observés tant au niveau transcriptomique que métabolomique. Chez Rubira, l'analyse conjointe du transcriptome et du métabolome a permis de mettre en évidence l'activation ou la répression de certaines voies métaboliques clés comme l'induction de la voie des polyphénols et du pipécolate et la répression de voies liées au métabolisme des acides aminés.

Néanmoins les contraintes expérimentales (nombre limité de plantes, coût des analyses) ont restreint les analyses à un seul temps de prélèvement ce qui n'a pas permis de caractériser la cinétique d'induction des mécanismes de résistance en tenant en compte le décalage probable qui sépare la transcription des gènes et la synthèse de métabolites. Mais le plan expérimental proposé a permis de réaliser toutes les analyses sur les mêmes échantillons ce qui permet de confronter plus aisément les données obtenues par les deux approches omiques. De plus, nous avons choisi d'appliquer sur les données transcriptomiques des tris statistiques très contraints ( $MFC > 2$ ,  $p.value < 0.05$ ) afin de ne pas commenter de faux-positifs, il est donc probable que certains gènes aient été exclus des résultats bien qu'ils montrent des différences de niveau d'expression nettes entre les conditions. Une analyse avec différents niveaux d'exigence en termes de tri statistique, en particulier sur le *max fold change* permettrait de pallier à ce problème. En outre, l'alignement des reads obtenus en RNAseq a été effectué sur le génome de référence du pêcher qui diffère de celui de Rubira notamment par l'absence des gènes de résistances candidats pour *Rm2* et de toute la famille de TNL à laquelle *Rm2* appartient. Le génome de Rubira ayant été obtenu en long read au cours de la thèse par l'équipe du GAFL INRAe, il serait donc pertinent de réitérer l'alignement sur ce génome afin d'évaluer l'expression de *Rm2* et des autres TNL manquants. Enfin, d'autres approches complémentaires pourraient être engagées pour compléter cette étude telle qu'une analyse protéomique des réponses à l'infestation ou la cinétique d'émission d'éthylène, qui est un facteur important dans les interactions plantes/pucerons. Une précédente étude sur plusieurs accessions résistantes de pêcher avaient déjà montré un dégagement de composés volatiles, notamment le méthyl salicylate 48h après l'infestation (Staudt *et al.*, 2010).

Cependant nos résultats révèlent certains points clés de la réponse de Rubira porteur de *Rm2* à l'infestation qui seront discutés dans les paragraphes suivants :

- (i) L'activation conjointe des deux branches du système immunitaire des plantes : d'une part la résistance basale, PTI, et d'autre part la résistance forte, ETI.
- (ii) L'activation de gènes contrôlant l'accumulation des ROS, qui peut être corrélée à la mise en place d'une HR suggérée par les réactions locales à la piqûre chez Rubira.

(iii) La répression de nombreux gènes intervenant dans la division et la croissance cellulaire que l'on peut associer à la réduction de croissance observée chez Rubira en réponse à l'infestation. Cette réduction de croissance pourrait être imputée à l'expression de la résistance qui impose généralement un coût métabolique important.

## 1. Intégration des mécanismes de la résistance à *Myzus persicae* conférée par *Rm2* dans le modèle général de l'immunité des plantes

Les mécanismes de l'immunité des plantes ont d'abord été conceptualisés dans le modèle en zig zag de Jones et Dangl (2006), qui a posé les bases de notre interprétation actuelle des interactions plantes-agresseurs biotrophes (virus, champignons, bactéries, nématodes). Les interactions avec les insectes phloémophages tels que les pucerons, également biotrophes et disposant d'effecteurs capables de moduler voire d'éteindre les réponses de défense de la plante sont cependant très peu fréquemment incluses dans ce modèle, bien que les plantes-hôtes des insectes phloémophages possèdent aussi des gènes majeurs de résistance de type NLR. Les données recueillies au cours de notre travail apportent de éléments contribuant à l'intégration des interactions plante-puceron dans ce modèle d'immunité avec un couple associant *M. persicae*, une espèce de puceron polyphage et ravageur majeur des cultures, et son hôte primaire le pêcher porteur de résistances monogéniques dominantes les gènes *Rm*. Jusqu'à présent la plupart des études fonctionnelles se sont concentrées sur l'interaction de cette espèce de puceron avec *A. thaliana*, un hôte secondaire pour lequel on ne connaît pas de gène R.

Nous avons révélé chez Rubira 48 h après infestation l'implication de multiples mécanismes de défense induits à la suite d'un évènement unique : la détection de *M. persicae* par le produit du gène *Rm2*, vraisemblablement une protéine de reconnaissance NLR. Parmi ces mécanismes la surexpression d'environ 160 NLR sur 430 NLR dénombrés chez le pêcher (Jia *et al.*, 2015) suggère que Rubira pourrait recruter d'autres NLR pour renforcer la résistance à *M. persicae*. L'intervention de NLR auxiliaires au récepteur NLR principal est parfois nécessaire pour obtenir une réponse ETI robuste (Adachi *et al.*, 2019). Par exemple, chez *Oryza sativa*, les CNL RAG5 et RAG4 interagissent fonctionnellement et physiquement pour contrôler la résistance au champignon *Magnaporthe oryzae*.

En l'absence d'infection, RAG5 interagit avec le domaine Coiled-Coil de RAG4 et inhibe son activité. Lors de la reconnaissance de l'effecteur par RAG5, la répression de RAG5 sur RAG4 est levée ce qui permet d'induire une mort cellulaire programmée en réponse au champignon (Cesari *et al.*, 2014).

L'activation des NLR conduit à une cascade de signalisation, initiée en premier lieu par un influx calcique. Chez Arabidopsis, il a récemment été montré que la présence de l'effecteur AvrAC de *X. campestris* induit la formation d'un résistosome, par l'interaction du récepteur RLCK PLB2 avec le complexe formé du CNL ZAR1 et de RKS1, qui est finalement relocalisé au niveau de la membrane plasmique pour former un canal cationique perméable à  $Ca^{2+}$  grâce au domaine Coiled-Coil de ZAR1 (El Kasmi, 2021). Cet influx de calcium contrôlé par les NLR est un facteur majeur dans l'initiation de la mort cellulaire et la signalisation de la résistance, notamment au travers de l'activation des enzymes génératrices de ROS, Les NADPH-oxydases, et des cascades de signalisation liées aux protéines CDPK et MAPK (Kobayashi *et al.*, 2007; Seybold *et al.*, 2014). Vincent *et al.*, (2017) ont démontré des élévations rapides et localisées du  $Ca^{2+}$  autour des sites de piqûre chez Arabidopsis infesté par *M. persicae*. La surexpression de plusieurs capteurs de signaux calciques tels que les CPDK ou CBL et des homologues de ZAR1, RKS1 et PLB2 chez Rubira après l'infestation suggèrent qu'un mécanisme similaire se déclenche et que la résistance médiée par *Rm2* ne pourrait se mettre en place qu'avec une activation transcriptionnelle massive de cofacteurs protéiques modifiant la perméabilité membranaire.

Récemment, une publication de Ngou *et al.*, (2021), faisant suite à une série de travaux, a fait évoluer le modèle en zig zag initial de Jones et Dangl : plutôt qu'une activation distincte de la PTI et l'ETI par des récepteurs spécifiques, la réponse immunitaire reposerait sur une potentialisation mutuelle de ces deux voies. L'ETI déclenchée chez Arabidopsis par *P. syringae* induit ainsi l'expression de nombreux composants de la signalisation PTI tels que *BAK1*, *BIK1*, *MPK3* et *RbohD*. Cette induction permet notamment de renforcer le burst oxydatif par l'intermédiaire de *RbohD* et des *MAPK* afin d'initier la réaction HR caractéristique de l'ETI et de limiter l'invasion de l'agent pathogène (Ngou *et al.*, 2021).

Nos observations sont conformes à ce nouveau modèle puisque l'expression de plusieurs gènes codants pour les RLK et RPL, protéines réceptrices PRR spécialisées dans la reconnaissance de motifs moléculaires propres aux bioagresseurs (MAMPs, PAMPs, HAMPs) (Couto et Zipfel., 2016) suggèrent le déploiement de la PTI en parallèle de l'ETI chez Rubira. Nos résultats, obtenus 48h après l'infestation ne permettent néanmoins pas d'établir la cinétique d'activation de chacun de ces éléments, d'autant que si les signalisations calciques et oxydatives sont généralement maintenues dans le temps, Vincent *et al.*, (2017) ont montré qu'un pic d'induction est visible dans les minutes qui suivent le premier contact d'*Arabidopsis* avec *M. persicae*. Il est donc ici difficile d'affirmer *stricto sensu* qu'une potentialisation mutuelle de l'ETI et PTI a bien eu lieu. Pour approfondir cette hypothèse, une étude cinétique dès les premières minutes d'infestation paraît essentielle afin de suivre pas à pas l'enchaînement des mécanismes de l'ETI et de la PTI impliqués dans la réponse à *M. persicae*.

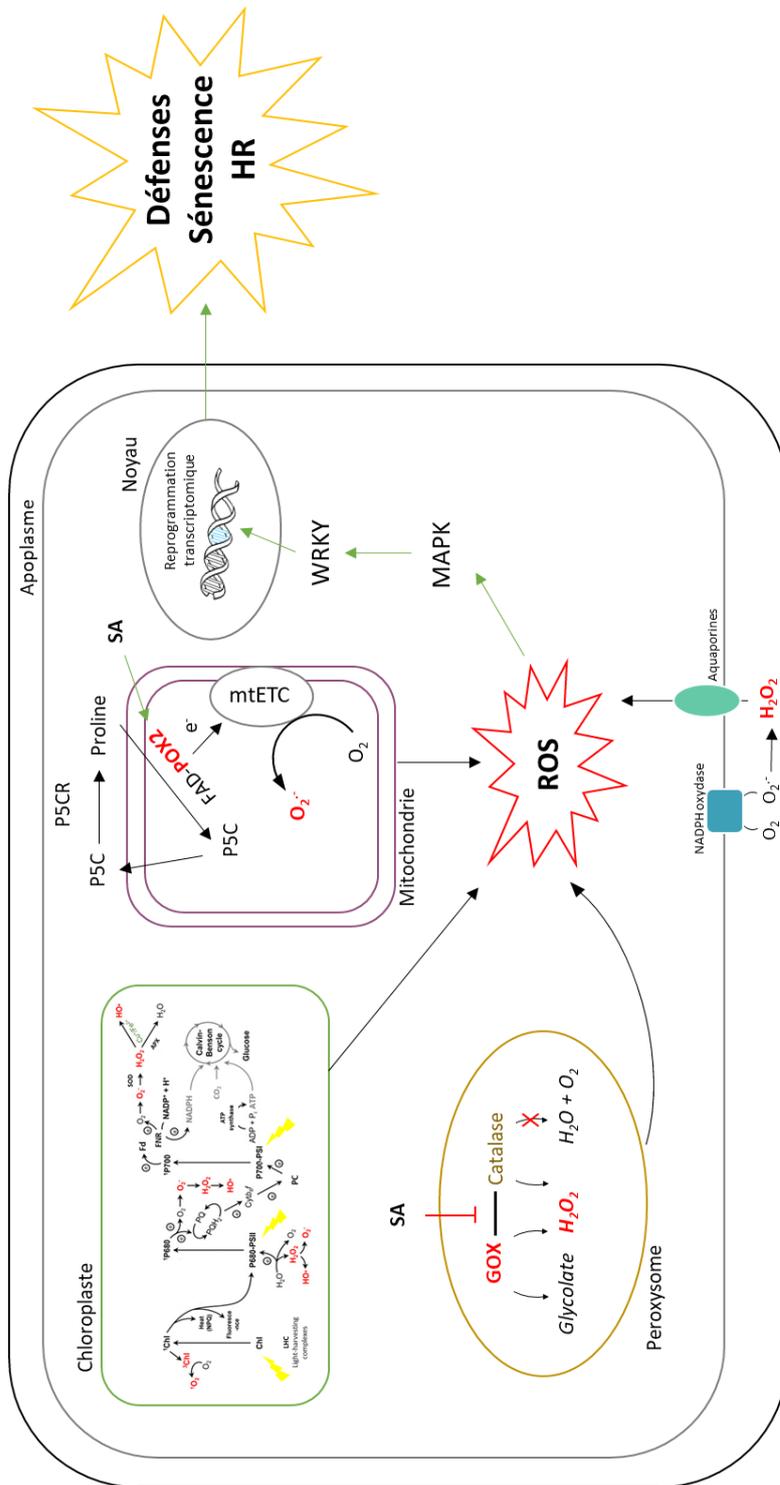
De plus, si l'ampleur des réponses transcriptomiques à l'infestation chez Rubira indique qu'un nombre élevé de mécanismes de défense sont enclenchés, il n'est pas certain que tous soient réellement nécessaires, ou même simplement fonctionnels contre *M. persicae*. Par exemple, la surexpression des gènes homologues de *FLS2*, qui assure une détection spécifique de la flagelline bactérienne n'est pas liée *a priori* à la défense contre les pucerons, à moins qu'elle ne soit la conséquence de la présence chez *M. persicae* de la bactérie endosymbiotique *B. aphidicola*. A cet égard Chaudhary *et al.*, (2014) ont mis en évidence l'initiation de réponse de défense par la protéine bactérienne GROEL issue de *Buchnera* et libérée *via* la salivation des pucerons. Ces insectes sont également des vecteurs de bactéries phytopathogènes et de virus qu'ils vont libérer dans les cellules végétales lors de la progression du stylet vers le phloème ou *via* l'excrétion de miellat. Stavrinides *et al.*, (2009) ont démontré la capacité de vectorisation des bactéries *Pseudomonas syringae* par le puceron du pois et de nombreux virus sont transmis par les pucerons comme le *Plum Pox Virus* transmis par *M. persicae* aux espèces du genre *Prunus* (Isac *et al.*, 1998). Dans ce cas, il est possible que la plante ait développé un réseau de plusieurs récepteurs capables de reconnaître le puceron mais également les agents pathogènes potentiels qu'il vectorise afin d'induire une combinaison de réponses de défenses efficaces contre ce panel d'agresseur.

D'ailleurs, des liens forts ont été mis en évidence entre la résistance aux pucerons et aux virus chez les melons possédant le gène de résistance *Vat* (Boissot *et al.*, 2016a ; Dogimont *et al.*, 2014). Le locus *Vat* réduit de manière drastique la colonisation des plantes par *A. gossypii* via le dépôt précoce de callose et lignine dans les parois cellulaires, la synthèse de polyphénols et une explosion micro-oxydative (Shinoda, 1993; Villada *et al.*, 2009) mais inhibe aussi l'infection des plantes par des virus non persistants transmis par *A. gossypii* comme CMV (*Cucumber mosaic virus*) ou WMV (*Watermelon mosaic virus*).

Par ailleurs, la surexpression de l'orthologue de CERK1 et de LYK5, dans la mesure où ces gènes assurent les mêmes fonctions chez *Arabidopsis* et le pêcher, suppose une reconnaissance de la chitine puisque ces deux kinases réceptrices sont essentielles à l'élicitation de la réponse d'*Arabidopsis* à la chitine (Cao *et al.*, 2014). Ce composé est un composant structurel de la paroi cellulaire des champignons mais est également un constituant du stylet des pucerons qui pourrait donc contribuer au déclenchement de certaines réponses observées chez Rubira. L'utilisation de mutant *Knock out* pour les homologues de *FLS2* et *CERK1* permettrait d'étudier l'implication et l'importance de ces récepteurs dans la réponse du pêcher à *M. persicae* et leur potentiel lien avec l'activation de *Rm2*. Ces expérimentations de transformation génétique sont cependant difficiles à exécuter étant donné le caractère récalcitrant du pêcher à la régénération *in vitro*.

## 2. La résistance à *Myzus persicae* semble impliquer l'accumulation de ROS issus de différents compartiments cellulaires.

Comme l'ont souligné Ngou *et al.* (2021), la potentialisation de la PTI par l'ETI vise notamment à renforcer le burst oxydatif, qui n'est pas suffisamment efficient lorsque l'ETI seule est activée. Bien qu'aucun dosage n'ait été effectué au cours de ce projet pour démontrer l'accumulation de ROS chez Rubira infesté et que les tentatives histochimiques de marquages de ces ROS n'ont pas été concluantes, de nombreux indices aux niveaux transcriptomique et métabolomique suggèrent l'implication des ROS dans la réponse de Rubira à *M. persicae* et sont cohérentes avec de précédentes études ayant souligné l'importance de la signalisation des ROS dans différents modèles d'interactions plante-pucerons (Goggin et Fischer., 2022; Pant et Huang., 2021).



**Figure 55 : Sources de production de ROS dans les différents compartiments cellulaires chez *Rubira infesté*.** Les ROS peuvent être produits dans les différents compartiments cellulaires et organites végétaux. Dans l'apoplaste, les NADPH oxydases membranaires vont catalyser la formation de  $O_2^{\bullet-}$  à partir d' $O_2$ , qui sera ensuite transformé en  $H_2O_2$  et transporté vers le cytoplasme *via* les aquaporines. Dans le peroxysome, la dissociation du complexe GOX-catalase médiée par le SA va inhiber la détoxification de  $H_2O_2$  issu de l'oxydation du glycolate par la GOX, ce qui va provoquer l'accumulation de  $H_2O_2$  peroxysomal. Dans les mitochondries, SA peut stimuler l'activité de la POX impliquée dans le cycle futile proline/P5C ce qui va augmenter le transfert d' $e^-$  de son cofacteur FAD vers la chaîne de transfert d'électrons mtETC et induire la production de  $O_2^{\bullet-}$ . Au niveau des chloroplastes, les ROS peuvent être générés par la sur-réduction de la chaîne de transport des électrons liée au stress photo-oxydatif. Le burst oxydatif une fois initié peut déclencher l'induction de la cascade de phosphorylation des MAPK et des facteurs de transcription (WRKY) qui va conduire à l'expression de la défense. GOX : Glycolate oxydase, POX2 : Proline déshydrogénase, SA : Acide salicylique, P5C : Pyrroline-5-carboxylate.

L'apoplaste et la membrane plasmique représentent le principal site de production des ROS lors d'un stress biotique, qui dépend notamment des homologues des NADPH oxydases, les RBOHs. Ces enzymes catalysent la formation de  $O_2^{\cdot-}$  dans l'apoplaste, qui est ensuite transformé de façon spontanée ou par l'action de la superoxyde dismutase (SOD) en  $H_2O_2$  (Qi *et al.*, 2017). Cette forme plus stable de ROS est capable de circuler vers le cytoplasme par le biais d'aquaporines qui facilitent le transport de petits composés à travers les membranes plasmiques ou les membranes des organites. Zhang *et al.* (2022a) ont montré que l'induction des MAPK lors des réponses de défense de *O. sativa* à *Xanthomonas oryzae* nécessite le transport de  $H_2O_2$  apoplastique vers le cytoplasme par l'aquaporine OsPIP2;2. Ainsi, la surexpression de *RBOHF* et de 2 aquaporines homologues de *PIP2-7* et de *NIP1-2* chez Rubira infesté suggère qu'un transport actif de l' $H_2O_2$  vers le cytoplasme pourrait avoir lieu pour initier les cascades de signalisation des MAPK (MAPK4, MEKK1, ...).

Cependant, nos données ont également mis en évidence l'induction chez Rubira des gènes codants pour *GOX* et *POX2*. De manière intéressante, ces deux gènes sont inductibles par le SA et sont susceptibles d'intervenir dans la génération des ROS au sein de deux compartiments cellulaires distincts. En effet, la photorespiration au sein des peroxyosomes génère un pool important de  $H_2O_2$  qui est, dans le cas d'une plante non stressée, finement contrôlé par la dynamique d'interaction GOX-catalase. Cependant, en condition de stress biotique médiée par l'hormone SA, une dissociation du complexe GOX-catalase a lieu, ce qui provoque une accumulation de  $H_2O_2$  peroxyosomal (Zhang *et al.*, 2016; Corpas *et al.*, 2020). En revanche, dans les mitochondries, le SA pourrait stimuler la transcription de *POX2*, une enzyme qui intervient dans le cycle futile proline/P5C et dont l'activité augmente le transfert d'électron de son cofacteur FAD vers la chaîne de transfert d'électrons et finalement  $O_2$ , ce qui entraîne la production de ROS mitochondriaux (Miller *et al.*, 2009).

La production de ROS peroxysonaux et mitochondriaux chez Rubira infesté pourrait donc résulter de l'accumulation de SA et s'additionner aux ROS produits par RbohF au niveau de la membrane plasmique pour provoquer un burst oxydatif suffisant pour la résistance de Rubira à *M. persicae* (Figure 55).

Enfin, les chloroplastes constituent un autre site majeur de production de ROS notamment en situation de stress. Cette production est généralement issue de la sur-réduction de la chaîne de transport des électrons liée au stress photo-oxydatif (Jamali Jaghdani *et al.*, 2021). Su *et al.* (2018) ont montré que la réduction de l'activité photosynthétique médiée par MPK3/MPK6 lors de l'infection de *Arabidopsis* par *Pst-AvRpt2* était responsable de la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de O<sup>2·-</sup> et que cet événement était nécessaire à la mise en place de l'ETI et lié à une réaction HR.

Même si les analyses transcriptomiques n'ont pas permis de déceler de signe d'une altération de l'activité photosynthétique ou de la chaîne respiratoire, la surexpression des orthologues des facteurs de transcription *MYB15* et *MYB44* qui induisent la fermeture des stomates sous le contrôle de l'ABA (Cominelli *et al.*, 2010) pourrait entraîner un possible dysfonctionnement de l'activité photosynthétique qui serait alors responsable du burst oxydatif chloroplastique. Les ROS sont également des inducteurs bien définis de la sénescence qui peuvent agir en synergie avec le SA dans le contrôle de ce processus (Zhang *et al.*, 2020). Dans nos données, l'expression de certains gènes (*SAG101*, *SAG20*, *ICL*) suggère l'initiation d'un état de sénescence, qui pourrait être relié à l'accumulation des ROS comme le suppose la surexpression de *WRKY53* qui est un régulateur positif de la sénescence inductible par les ROS. Cette hypothèse est cohérente avec la mortalité des pousses de l'accession «Fen shouxing» porteuse de *Rm3* en réponse à l'infestation de *M. persicae* (Niu *et al.*, 2018 communication personnelle). Ainsi, bien qu'il ne subsiste aucun individu de *M. persicae* sur Rubira au bout de 72 h, l'infestation a tout de même pu initier un processus de sénescence irréversible susceptible de se manifester au-delà de 7 jours. Il paraît donc nécessaire de suivre à long terme l'évolution de la sénescence sur Rubira.

Les données transcriptomiques et métabolomiques que nous avons obtenues suggèrent donc un rôle central des ROS dans le déploiement de la HR et l'activation d'autres mécanismes de résistance contrôlés par *Rm2* chez Rubira, avec l'induction simultanée de voies métaboliques génératrices de ROS issues de plusieurs compartiments cellulaires (figure 55). Un dosage des ROS par spectrophotométrie sur des échantillons prélevés en cinétique pourrait toutefois mieux nous renseigner sur l'ampleur du burst oxydatif mis en place chez Rubira au cours de l'infestation. Ce dosage pourrait être complété par une étude histochimique afin de localiser précisément les ROS au sein des cellules.

### 3. La résistance de Rubira à *Myzus persicae* a-t-elle un coût en matière de croissance ?

La mise en place d'une résistance, qui impose un coût métabolique important (Heil et Baldwin, 2002; Tian *et al.*, 2003; Kempel *et al.*, 2011), se produit généralement au détriment de la croissance. Ce compromis entre croissance et défense est le fait d'une reconfiguration des voies métaboliques, du protéome et d'une priorisation du flux de carbone et d'azote pour la production de composés de défense lorsqu'un état de stress est induit chez la plante (Züst et Agrawal, 2017; Figueroa-Macías *et al.*, 2021). Ainsi, une immunité constitutive chez *Arabidopsis* réduit la croissance et le rendement jusqu'à 90 % (Todesco *et al.*, 2010). De même, grâce à la création de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* différant uniquement par l'absence ou la présence du transgène NLR *RMP1*, Tian *et al.*, (2003) ont montré que la résistance conférée par le *RMP1* affectait la croissance et le rendement de la plante.

Ce coût métabolique semble se manifester chez Rubira qui affiche une répression d'un grand nombre de gènes intervenant dans les processus de division cellulaire et d'organogénèse, signe qu'un ralentissement de croissance se met en place, au profit, notamment, de la synthèse de composés phénoliques. Les pucerons se nourrissant préférentiellement sur des organes en croissance (Karley *et al.*, 2002), l'arrêt de croissance qui s'exprime ici pourrait donc être aussi un mécanisme de résistance et non pas uniquement la conséquence du coût de mise en place de la résistance. De plus, la diminution du pool de certains acides aminés comme la glutamine et méthionine, deux acides aminés essentiels pour *M. persicae* (Dadd et Krieger, 1968) et du sorbitol, qui est une source importante de carbone dans le phloème (Dominguez et Niittylä, 2022) indique que les principales sources de nutrition en carbone, azote et soufre du puceron ont été réduites chez Rubira ce qui réduit l'intérêt alimentaire de cette plante pour *M. persicae* et pourrait être une conséquence supplémentaire de sa fuite. Finalement, ce compromis croissance/défense exerce une double peine pour le puceron qui va d'une part être confronté aux mécanismes de défense mis en place par Rubira et d'autre part se trouver sur un hôte inhospitalier, incapable de lui fournir les ressources alimentaires nécessaires à son développement.

Pourtant, d'autres études suggèrent que le compromis entre croissance et défense serait plutôt le fait d'un antagonisme des voies de signalisation (Eichmann et Schäfer., 2015 ; Ortiz-Morea *et al.*, 2020). Par exemple, le SA, à travers sa signalisation, peut affecter la division et l'expansion cellulaire (Pokotylo *et al.*, 2022 ; Li *et al.*, 2022). Les BR sont aussi des régulateurs cruciaux de ce compromis à travers la cascade de régulation contrôlée par BAK1 (Lozano-Duran et Zipfel., 2015). Ainsi, l'expression différentielle de chacun des facteurs en aval de la régulation de BAK1 (Cf Figure 30 Chapitre 3), corecepteur à la fois de FLS2 vers la PTI et de BRI1 vers la signalisation des BR et de la croissance, tend vers une réduction du niveau des BR qui aboutirait donc à une répression de la croissance au profit de la résistance ce qui pourrait expliquer la répression des gènes impliqués dans les processus de croissance. Cependant, même si nous n'avons pu évaluer les teneurs en BR au cours de l'infestation, certaines preuves transcriptomiques telles que l'induction d'*EXORDIUM* indique une régulation positive de la signalisation des BR qui s'oppose alors au mécanisme contrôlé par BAK1. Ces résultats quelque peu ambivalents s'ajoutent aux questionnements soulevés par la mesure des paramètres de croissance qui ont uniquement montré une réduction de la longueur des entre-nœuds. Les autres paramètres de croissance mesurés : longueur de la dernière feuille étalée, nombre de nouvelles feuilles formées, nombre d'étage foliaire, étaient identiques entre le génotype sensible et résistant ce qui indique que l'organogénèse en particulier ne semble pas avoir été impactée par l'infestation ou que les observations ont été effectuées dans un temps trop restreint après le début de l'infestation pour pouvoir observer un impact phénotypique sur la plante.

Afin de confirmer l'impact de l'infestation sur la croissance de Rubira, des paramètres supplémentaires comme le plastochrone doivent donc être pris en compte sur une cinétique d'analyse supérieure à 7 jours afin que les modifications du fonctionnement métabolique de la plante lors de l'infestation aient le temps de se répercuter sur ses caractéristiques phénotypiques. Une évaluation sur plusieurs semaines permettrait également de comprendre l'impact du compromis croissance/défense sur l'intégrité de Rubira, puisque certaines de nos données tels que la surexpression de gènes de sénescence (*SAG101*, *SAG20*, *WRKY53*) présume l'initiation d'une sénescence. Au cours de précédentes expérimentations l'infestation de *M. persicae* a entraîné la mort de jeunes semis de Rubira (Poëssel *et al.*, communication personnelle).

De même, la résistance contrôlée par *Rm3* exerce une pression très forte sur la croissance du pêcher lors de l'infestation qui conduit, notamment en verger à la mort des plants résistants infestés et a amené à l'interdiction de la culture de pêchers portant ce gène en zone fortement contaminée par *M. persicae*. Enfin, BAK1 étant un élément central dans le contrôle de ce compromis en particulier à travers le contrôle de la signalisation BR, une expérimentation dans laquelle des BR sous forme de brassinolide seraient apportés par application exogène (Dhaubhadel *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2020) pour compenser un potentiel arrêt de croissance permettrait d'évaluer l'importance de ce phénomène dans l'expression de la résistance de Rubira à *M. persicae*.

L'ensemble de ces travaux a donc mis en évidence toute la complexité de la résistance de Rubira contrôlée par *Rm2*, qui fait intervenir des mécanismes de défense variés, signalisation hormonale, burst oxydatif, HR, synthèse de composés de défense. De plus, de nouveaux mécanismes encore jamais associés à la résistance des plantes aux pucerons ont été mis en évidence ici. C'est le cas notamment de la surexpression des gènes de biosynthèse du pipécolate et de son accumulation chez Rubira en réponse à *M. persicae*. L'accumulation de ce composé et du *N*-hydroxypipécolate, qui sont d'importants régulateurs de la SAR (Návarová *et al.*, 2012; Hartmann *et al.*, 2018) ont été révélées en réponse à des agents pathogènes chez diverses espèces végétales (Lenk *et al.*, 2019 ; Vogel-Adghough *et al.*, 2013) mais seul Koch *et al.* (2020) l'avaient précédemment mentionné en réponse aux pucerons chez *Panicum virgatum*. Ainsi, même si lors de notre expérimentation l'apport exogène de Pip sur GF305 n'a pas suffi à induire de résistance, cela ne retire en rien l'importance de ce composé dans la résistance contrôlée par *Rm2* et suggère la mise en place de la SAR chez Rubira infesté.

L'analyse conjointe et sans *a priori* du transcriptome et du métabolome est donc une étape essentielle dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance des plantes aux pucerons puisqu'elle apporte à la fois une vision globale des réponses de la plante mais permet aussi de mettre le doigt sur des facteurs encore non décrits jusqu'alors.

## Références

- Abeysekara NS, Swaminathan S, Desai N, Guo L, Bhattacharyya MK** (2016) The plant immunity inducer pipelicolic acid accumulates in the xylem sap and leaves of soybean seedlings following *Fusarium virguliforme* infection. *Plant Sci* **243**: 105–114
- Acosta IF, Farmer EE** (2010) Jasmonates. *Arabidopsis Book* **8**: e0129
- Adachi H, Derevnina L, Kamoun S** (2019) NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Curr Opin Plant Biol* **50**: 121–131
- Adhikari K, Edwards O, Wang S** (2012) The role of alkaloids in conferring aphid resistance in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Crop and Pasture Science*. **63(5)**:444-451
- Ahammed GJ, Li X, Zhang G, Zhang H, Shi J, Pan C, Yu J, Shi K** (2018) Tomato photorespiratory glycolate-oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production contributes to basal defence against *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Environ* **41**: 1126–1138
- Ahmad S, Veyrat N, Gordon-Weeks R, Zhang Y, Martin J, Smart L, Glauser G, Erb M, Flors V, Frey M, Ton J** (2011) Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant Physiol.* **157**, pp.317-327
- Åhman I, Kim S-Y, Zhu L-H** (2019) Plant Genes Benefitting Aphids—Potential for Exploitation in Resistance Breeding. *Front Plant Sci.* **10**: 1452.
- Ahmed N, Darshanee HLC, Khan IA, Zhang Z-F, Liu T-X** (2019) Host Selection Behavior of the Green Peach Aphid, *Myzus persicae*, in Response to Volatile Organic Compounds and Nitrogen Contents of Cabbage Cultivars. *Front Plant Sci* **10**: 79
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM** (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* **17**: 73–90
- Ahuja I, Rohloff J, Bones AM** (2010) Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy for Sustainable Development.* **30**, 311–348
- Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, et al** (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* **212–213**: 29–37
- Aliferis KA, Faubert D, Jabaji S** (2014) A Metabolic Profiling Strategy for the Dissection of Plant Defense against Fungal Pathogens. *PLoS One* **9**: e111930
- Alim'agri** (2018). Entrée en vigueur de l'interdiction des néonicotinoïdes le 1er septembre. <https://agriculture.gouv.fr/entree-en-vigueur-de-linterdiction-des-neonicotinoides-le-1erseptembre>
- Allan C, Morris RJ, Meisrimler C-N** (2022) Encoding, transmission, decoding, and specificity of calcium signals in plants. *J Exp Bot* **73**: 3372–3385
- Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, Yadav RC** (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol Mol Biol Plants* **19**: 307–321
- An C, Sheng L, Du X, Wang Y, Zhang Y, Song A, Jiang J, Guan Z, Fang W, Chen F, et al** (2019) Overexpression of CmMYB15 provides chrysanthemum resistance to aphids by regulating the biosynthesis of lignin. *Horticulture Research* **6**: 1–10
- de Angeli A, Thomine S, Frachisse J-M, Ephritikhine G, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Lett* **581**: 2367–2374
- Anwar A, Liu Y, Dong R, Bai L, Yu X, Li Y** (2018) The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: a review. *Biological Research* **51**: 46
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399

- Arruda P, Barreto P** (2020) Lysine Catabolism Through the Saccharopine Pathway: Enzymes and Intermediates Involved in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stress. *Front Plant Sci* **11**: 11: 587
- Atamian HS, Eulgem T, Kaloshian I** (2012) SIWRKY70 is required for Mi-1-mediated resistance to aphids and nematodes in tomato. *Planta* **235**: 299–309
- Auclair JL** (1967) Effects of pH and sucrose on rearing the cotton aphid, *Aphis gossypii*, on a germ-free and holidic diet. *J Insect Physiol* **13**: 431–446
- Ballhorn DJ, Reisdorff C, Pfanzen H** (2011) Quantitative effects of enhanced CO<sub>2</sub> on jasmonic acid induced plant volatiles of lima bean (*Phaseolus lunatus L.*). *Journal of Applied Botany and Food Quality* **84**: 65–71
- Bao Y, Song W-M, Pan J, Jiang C-M, Srivastava R, Li B, Zhu L-Y, Su H-Y, Gao X-S, Liu H, et al** (2016) Overexpression of the NDR1/HIN1-Like Gene NHL6 Modifies Seed Germination in Response to Abscisic Acid and Abiotic Stresses in Arabidopsis. *PLoS One* **11**: e0148572
- Barco B, Clay NK** (2020) Hierarchical and Dynamic Regulation of Defense-Responsive Specialized Metabolism by WRKY and MYB Transcription Factors. *Front Plant Sci* **10**: 1775
- Barto EK, Cipollini D** (2005) Testing the optimal defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*. *Oecologia* **146**: 169–178
- Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul VL, Crossthwaite AJ, Denholm I, Field LM, et al** (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neurosci* **12**: 51
- Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS** (2014) The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **51**: 41–51
- Beckers GJM, Spoel SH** (2006) Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol* **8**: 1–10
- Bekaert M, Edger PP, Hudson CM, Pires JC, Conant GC** (2012) Metabolic and evolutionary costs of herbivory defense: systems biology of glucosinolate synthesis. *New Phytol* **196**: 596–605
- van Bel AJE, Will T** (2016) Functional Evaluation of Proteins in Watery and Gel Saliva of Aphids. *Front Plant Sci*. **7**: 1840
- Bellande K, Bono J-J, Savelli B, Jamet E, Canut H** (2017) Plant Lectins and Lectin Receptor-Like Kinases: How Do They Sense the Outside? *Int J Mol Sci* **18**: E1164
- Ben-Issa R, Gomez L, Gautier H** (2017) Companion Plants for Aphid Pest Management. *Insects* **8**: 112
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E** (2015) The Arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis* **53**: 474–485
- Berenbaum MR, Zangerl AR** (1998) Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13743–13748
- Bernays EA, Woodhead S** (1984) The need for high levels of phenylalanine in the diet of *Schistocerca gregaria* nymphs. *J Insect Physiol* **30**: 489–493
- Bernoux M, Ve T, Williams S, Warren C, Hatters D, Valkov E, Zhang X, Ellis JG, Kobe B, Dodds PN** (2011) Structural and Functional Analysis of a Plant Resistance Protein TIR Domain Reveals Interfaces for Self-Association, Signaling, and Autoregulation. *Cell Host Microbe* **9**: 200–211
- Bernsdorff F, Döring A-C, Gruner K, Schuck S, Bräutigam A, Zeier J** (2016) Pipecolic Acid Orchestrates Plant Systemic Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways. *Plant Cell* **28**: 102–129
- Bernstein KA, Gallagher JEG, Mitchell BM, Granneman S, Baserga SJ** (2004) The Small-Subunit Processome Is a Ribosome Assembly Intermediate. *Eukaryotic Cell* **3**: 1619–1626

- Berrueta LA, Sasía-Arriba A, Miñarro M, Antón MJ, Alonso-Salces RM, Micheletti D, Gallo B, Dapena E** (2018) Relationship between hydroxycinnamic acids and the resistance of apple cultivars to rosy apple aphid. *Talanta* **187**: 330–336
- Berzonsky W, Ding H, Haley S, Harris M, Lamb R, McKenzie R, Ohm H, Patterson F, Peairs F, Porter D, et al** (2010) Breeding Wheat for Resistance to Insects. *Plant Breed. Rev.* pp 221–296
- Betsuyaku S, Katou S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Nomura N, Fukuda H** (2018) Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **59**: 8–16
- Bi G, Zhou J-M** (2021) Regulation of Cell Death and Signaling by Pore-Forming Resistosomes. *Annu Rev Phytopathol* **59**: 239–263
- Blanco F, Garretón V, Frey N, Dominguez C, Pérez-Acle T, Van der Straeten D, Jordana X, Holuigue L** (2005) Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **59**: 927–944
- Bohner A, Kojima S, Hajirezaei M, Melzer M, von Wörén N** (2015) Urea retranslocation from senescing *Arabidopsis* leaves is promoted by DUR3-mediated urea retrieval from leaf apoplast. *Plant J* **81**: 377–387
- Boissot N, Schoeny A, Vanlerberghe-Masutti F** (2016a) *Vat*, an Amazing Gene Conferring Resistance to Aphids and Viruses They Carry: From Molecular Structure to Field Effects. *Front Plant Sci* **7**: 1420
- Boissot N, Thomas S, Chovelon V, Lecoq H** (2016b) NBS-LRR-mediated resistance triggered by aphids: viruses do not adapt; aphids adapt via different mechanisms. *BMC Plant Biol* **16**: 25
- Boller T, Felix G** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379–406
- Boots M, Best A** (2018) The evolution of constitutive and induced defences to infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **285**(1883):20180658
- Bos JIB, Prince D, Pitino M, Maffei ME, Win J, Hogenhout SA** (2010) A Functional Genomics Approach Identifies Candidate Effectors from the Aphid Species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid). *PLOS Genetics* **6**: e1001216
- Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD** (2011) The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: insights from luteovirus pathosystems. *Virus Res* **159**: 201–205
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J** (2010) Differential innate immune signalling via Ca<sup>(2+)</sup> sensor protein kinases. *Nature* **464**: 418–422
- Boyko E, Starkey S, Smith M** (2004) Molecular genetic mapping of Gby, a new greenbug resistance gene in bread wheat. *Theor Appl Genet* **109**: 1230–1236
- Brauc S, De Vooght E, Claeys M, Geuns JMC, Höfte M, Angenon G** (2012) Overexpression of arginase in *Arabidopsis thaliana* influences defence responses against *Botrytis cinerea*. *Plant Biol* **14** Suppl 1: 39–45
- van Breda SV, van der Merwe CF, Robbertse H, Apostolides Z** (2013) Immunohistochemical localization of caffeine in young *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (tea) leaves. *Planta* **237**: 849–858
- Brenes-Arguedas T, Horton MW, Coley PD, Lokvam J, Waddell RA, Meizoso-O'Meara BE, Kursar TA** (2006) Contrasting Mechanisms of Secondary Metabolite Accumulation during Leaf Development in Two Tropical Tree Species with Different Leaf Expansion Strategies. *Oecologia* **149**: 91–100
- Bricchi I, Berteà CM, Occhipinti A, Paponov IA, Maffei ME** (2012) Dynamics of membrane potential variation and gene expression induced by *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, and *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *PLoS One* **7**: e46673

- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant J* **45**: 113–122
- Brignolas F, Lieutier F, Sauvard D, Yart A, Drouet A, Claudot AC** (1995) Changes in soluble-phenol content of Norway-spruce (*Picea abies*) phloem in response to wounding and inoculation with *Ophiostoma polonicum*. *European Journal of Forest Pathology* **25**: 253–265
- Brinza L, Viñuelas J, Cottret L, Calevro F, Rahbé Y, Febvay G, Duport G, Colella S, Rabatel A, Gautier C, et al** (2009) Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Comptes Rendus Biologies* **332**: 1034–1049
- ten Broeke CJM, Dicke M, van Loon JJA** (2014) Rearing history affects behaviour and performance of two virulent *Nasonovia ribisnigri* populations on two lettuce cultivars. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **151**: 97–105
- Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G** (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9452–9457
- CABI** (2002) Invasive Species Compendium. [www.cabi.org/isc/](http://www.cabi.org/isc/) [Consulté en février 2002]
- Cai J, Jozwiak A, Holoidovsky L, Meijler MM, Meir S, Rogachev I, Aharoni A** (2021) Glycosylation of *N*-hydroxy-pipecolic acid equilibrates between systemic acquired resistance response and plant growth. *Mol Plant* **14**: 440–455
- Calatayud PA, Rahbé Y, Delobel B, Khuong-Huu F, Tertuliano M, Rü B** (1994) Influence of secondary compounds in the phloem sap of cassava on expression of antibiosis towards the mealybug *Phenacoccus manihoti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **72**: 47–57
- Campos ML, Kang J-H, Howe GA** (2014) Jasmonate-triggered plant immunity. *J Chem Ecol* **40**: 657–675
- Cao H-H, Liu H-R, Zhang Z-F, Liu T-X** (2016) The green peach aphid *Myzus persicae* perform better on pre-infested Chinese cabbage *Brassica pekinensis* by enhancing host plant nutritional quality. *Sci Rep* **6**: 21954
- Cao H-H, Zhang M, Zhao H, Zhang Y, Wang X-X, Guo S-S, Zhang Z-F, Liu T-X** (2014a) Deciphering the Mechanism of  $\beta$ -Aminobutyric Acid-Induced Resistance in Wheat to the Grain Aphid, *Sitobion avenae*. *PLOS ONE* **9**: e91768
- Cao J, Liang Y, Yan T, Wang X, Zhou H, Chen C, Zhang Y, Zhang B, Zhang S, Liao J, et al** (2022) The photomorphogenic repressors BBX28 and BBX29 integrate light and brassinosteroid signaling to inhibit seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell*. **34**(6):2266
- Cao X, Yang H, Shang C, Ma S, Liu L, Cheng J** (2019) The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *Int J Mol Sci* **20**(24): 6343
- Cao Y, Liang Y, Tanaka K, Nguyen CT, Jedrzejczak RP, Joachimiak A, Stacey G** (2014b) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* **3**: e03766
- Capinera J** (2018) Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *Encyclopedia of Entomology*. pp 1727–1730
- Casteel CL, De Alwis M, Bak A, Dong H, Whitham SA, Jander G** (2015) Disruption of Ethylene Responses by Turnip mosaic virus Mediates Suppression of Plant Defense against the Green Peach Aphid Vector. *Plant Physiol* **169**: 209–218
- Casteel CL, Walling LL, Paine TD** (2006) Behavior and biology of the tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*, in response to the *Mi-1.2* gene. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **121**: 67–72
- Casteel CL, Yang C, Nanduri AC, De Jong HN, Whitham SA, Jander G** (2014) The Nla-Pro protein of Turnip mosaic virus improves growth and reproduction of the aphid vector, *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J* **77**: 653–663

- Cecchini NM, Jung HW, Engle NL, Tschaplinski TJ, Greenberg JT** (2015) ALD1 Regulates Basal Immune Components and Early Inducible Defense Responses in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* **28**: 455–466
- Cecchini NM, Monteoliva MI, Alvarez ME** (2011) Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis. *Plant Physiol* **155**: 1947–1959
- Cesari S** (2018) Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytol* **219**: 17–24
- Cesari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds P, Terauchi R, Kroj T** (2014) The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO J* **33**: 1941–1959
- Chalecka M, Kazberuk A, Palka J, Surazynski A** (2021) P5C as an Interface of Proline Interconvertible Amino Acids and Its Role in Regulation of Cell Survival and Apoptosis. *Int J Mol Sci* **22**: 11763
- Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Briggs SP, Kaloshian I** (2014) GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 8919–8924
- Chen D-H, Liu H-P, Li C-L** (2019) Calcium-dependent protein kinase CPK9 negatively functions in stomatal abscisic acid signaling by regulating ion channel activity in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **99**: 113–122
- Chen S, Ding Y, Tian H, Wang S, Zhang Y** (2021) WRKY54 and WRKY70 positively regulate SARD1 and CBP60g expression in plant immunity. *Plant Signal Behav* **16**: 1932142
- Chen Y-C, Holmes EC, Rajniak J, Kim J-G, Tang S, Fischer CR, Mudgett MB, Sattely ES** (2018) *N*-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in Arabidopsis. *PNAS* **115**: E4920–E4929
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2007) Auxin Synthesized by the YUCCA Flavin Monooxygenases Is Essential for Embryogenesis and Leaf Formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2430–2439
- Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B** (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* **14**: 535–541
- Chini A, Boter M, Solano R** (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *FEBS J* **276**: 4682–4692
- Chiozza MV, O’Neal ME, MacIntosh GC** (2010) Constitutive and induced differential accumulation of amino acid in leaves of susceptible and resistant soybean plants in response to the soybean aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environ Entomol* **39**: 856–864
- Cho K-S, Kwon M, Cho J-H, Im J-S, Park Y-E, Hong S-Y, Hwang I-T, Kang J-H** (2017) Characterization of trichome morphology and aphid resistance in cultivated and wild species of potato. *Hortic Environ Biotechnol* **58**: 450–457
- Choi HW, Kim YJ, Hwang BK** (2011) The hypersensitive induced reaction and leucine-rich repeat proteins regulate plant cell death associated with disease and plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 68–78
- Choi HW, Klessig DF** (2016) DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol* **16**: 232
- Chung E-H, da Cunha L, Wu A-J, Gao Z, Cherkis K, Afzal AJ, Mackey D, Dangl JL** (2011) Specific threonine phosphorylation of a host target by two unrelated type III effectors activates a host innate immune receptor in plants. *Cell Host Microbe* **9**: 125–136
- Cifuentes-Esquivel N, Bou-Torrent J, Galstyan A, Gallemí M, Sessa G, Salla Martret M, Roig-Villanova I, Ruberti I, Martínez-García JF** (2013) The bHLH proteins BEE and BIM positively modulate the shade avoidance syndrome in Arabidopsis seedlings. *Plant J* **75**: 989–1002
- Clifford MN, Jaganath IB, Ludwig IA, Crozier A** (2017) Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat Prod Rep* **34**: 1391–1421

- Colella S, Parisot N, Simonet P, Gaget K, Duport G, Baa-Puyoulet P, Rahbé Y, Charles H, Febvay G, Callaerts P, et al** (2018) Bacteriocyte Reprogramming to Cope With Nutritional Stress in a Phloem Sap Feeding Hemipteran, the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Front Physiol* **9**: 1498
- Coley PD** (1988) Effects of Plant Growth Rate and Leaf Lifetime on the Amount and Type of Anti-Herbivore Defense. *Oecologia* **74**: 531–536
- Coll-Garcia D, Mazuch J, Altmann T, Müssig C** (2004) EXORDIUM regulates brassinosteroid-responsive genes. *FEBS Lett* **563**: 82–86
- Collier SM, Hamel L-P, Moffett P** (2011) Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NB-LRR protein. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 918–931
- Cominelli E, Galbiati M, Tonelli C** (2010) Transcription factors controlling stomatal movements and drought tolerance. *Transcription* **1**: 41–45
- Compson ZG, Larson KC, Zinkgraf MS, Whitham TG** (2011) A genetic basis for the manipulation of sink-source relationships by the galling aphid *Pemphigus batae*. *Oecologia* **167**: 711–721
- Cooper LD, Doss RP, Price R, Peterson K, Oliver JE** (2005) Application of Bruchin B to pea pods results in the up-regulation of CYP93C18, a putative isoflavone synthase gene, and an increase in the level of pisatin, an isoflavone phytoalexin. *J Exp Bot* **56**: 1229–1237
- Cooper SK, Pandhare J, Donald SP, Phang JM** (2008) A Novel Function for Hydroxyproline Oxidase in Apoptosis through Generation of Reactive Oxygen Species. *J Biol Chem* **283**: 10485–10492
- Cooper WR, Goggin FL** (2005) Effects of jasmonate-induced defenses in tomato on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115**: 107–115
- Coppola V, Coppola M, Rocco M, Digilio MC, D'Ambrosio C, Renzone G, Martinelli R, Scaloni A, Pennacchio F, Rao R, et al** (2013) Transcriptomic and proteomic analysis of a compatible tomato-aphid interaction reveals a predominant salicylic acid-dependent plant response. *BMC Genomics* **14**: 515
- Corpas FJ, González-Gordo S, Palma JM** (2020) Plant Peroxisomes: A Factory of Reactive Species. *Front Plant Sci* **11**: 853
- Cots J, Fargeix C, Gindro K, Widmer F** (2002) Pathogenic attack and carbon reallocation in soybean leaves (*Glycine max. L.*): reinitiation of the glyoxylate cycle as a defence reaction. *J Plant Physiol* **159**: 91–96
- Couto D, Zipfel C** (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* **16**: 537–552
- Cresswell JE, Desneux N, vanEngelsdorp D** (2012) Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Manag Sci* **68**: 819–827
- Cretin L, Triquenot A** (2018) Apports de produits phytopharmaceutiques en arboriculture : nombre de traitements et indicateur de fréquence de traitements. *Campagne agricoles 2015 et 2012. Agreste les Dossiers n° 43*
- Cruz Castillo M, Martínez C, Buchala A, Métraux J-P, León J** (2004) Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**: 85–94
- Cui H, Wang A** (2017) An efficient viral vector for functional genomic studies of Prunus fruit trees and its induced resistance to *Plum pox virus* via silencing of a host factor gene. *Plant Biotechnol J* **15**: 344–356
- Dadd RH, Krieger DL** (1968) Dietary amino acid requirements of the aphid, *Myzus persicae*. *J Insect Physiol* **14**: 741–764
- Dardouri T, Gautier H, Ben Issa R, Costagliola G, Gomez L** (2019) Repellence of *Myzus persicae* (Sulzer): evidence of two modes of action of volatiles from selected living aromatic plants. *Pest Management Science* **75**: 1571–1584

- Dardouri T, Gomez L, Ameline A, Costagliola G, Schoeny A, Gautier H** (2021) Non-host volatiles disturb the feeding behavior and reduce the fecundity of the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Pest Manag Sci* **77**: 1705–1713
- Darwin C** (1859) L'origine des espèces. Texte intégral de la première édition de 1859 - Charles Darwin.
- David A, Rostkowski P** (2020) Chapter 2 - Analytical techniques in metabolomics. In D Álvarez-Muñoz, M Farré, eds, *Environmental Metabolomics*. Elsevier, pp 35–64
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Van Loon LC, Dicke M, et al** (2005) Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 923–937
- Dedryver C-A, Le Ralec A, Fabre F** (2010) The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *C R Biol* **333**: 539–553
- Dellero Y, Jossier M, Schmitz J, Maurino VG, Hodges M** (2016) Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism. *J Exp Bot* **67**: 3041–3052
- Desai M, Hu J** (2008) Light induces peroxisome proliferation in *Arabidopsis* seedlings through the photoreceptor phytochrome A, the transcription factor HY5 HOMOLOG, and the peroxisomal protein PEROXIN11b. *Plant Physiol* **146**: 1117–1127
- DeYoung BJ, Innes RW** (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* **7**: 1243–1249
- Dhaubhadel S, Chaudhary S, Dobinson KF, Krishna P** (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol Biol* **40**: 333–342
- Diaz-Vivancos P, Bernal-Vicente A, Cantabella D, Petri C, Hernández JA** (2017) Metabolomics and Biochemical Approaches Link Salicylic Acid Biosynthesis to Cyanogenesis in Peach Plants. *Plant Cell Physiol* **58**: 2057–2066
- Digilio MC, Cascone P, Iodice L, Guerrieri E** (2012) Interactions between tomato volatile organic compounds and aphid behaviour. *J Plant Interact* **7**: 322–325
- Dinant S, Bonnemain J-L, Girousse C, Kehr J** (2010) Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 504–515
- Ding P, Ding Y** (2020) Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends Plant Sci* **25**: 549–565
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS, Wang L** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* **3**: 371–390
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR** (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15–21
- Dogimont C, Chovelon V, Pauquet J, Boualem A, Bendahmane A** (2014) The Vat locus encodes for a CC-NBS-LRR protein that confers resistance to *Aphis gossypii* infestation and *A. gossypii*-mediated virus resistance. *Plant J* **80**: 993–1004
- Domingos P, Prado AM, Wong A, Gehring C, Feijo JA** (2015) Nitric Oxide: A Multitasked Signaling Gas in Plants. *Mol Plant* **8**: 506–520
- Dominguez PG, Niittylä T** (2022) Mobile forms of carbon in trees: metabolism and transport. *Tree Physiol* **42**: 458–487
- Dongus JA, Parker JE** (2021) EDS1 signalling: At the nexus of intracellular and surface receptor immunity. *Curr Opin Plant Biol* **62**: 102039
- Donnelly R, Cunniffe NJ, Carr JP, Gilligan CA** (2019) Pathogenic modification of plants enhances long-distance dispersal of nonpersistently transmitted viruses to new hosts. *Ecology* **100**: e02725
- Donze-Reiner T, Palmer NA, Scully ED, Prochaska TJ, Koch KG, Heng-Moss T, Bradshaw JD, Twigg P, Amundsen K, Sattler SE, et al** (2017) Transcriptional analysis of defense mechanisms in upland tetraploid switchgrass to greenbugs. *BMC Plant Biol* **17**: 46
- Doroodian P, Hua Z** (2021) The Ubiquitin Switch in Plant Stress Response. *Plants (Basel)* **10**: 246

- Douglas AE** (2006) Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J Exp Bot* **57**: 747–754
- Douglas AE, Minto LB, Wilkinson TL** (2001) Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *J Exp Biol* **204**: 349–358
- Douglas AE, Price DRG, Minto LB, Jones E, Pescod KV, François CLMJ, Pritchard J, Boonham N** (2006) Sweet problems: insect traits defining the limits to dietary sugar utilisation by the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Exp Biol* **209**: 1395–1403
- Douglas AE, Prosser WA** (1992) Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *J Insect Physiol* **38**: 565–568
- Dreyer DL, Jones KC** (1981) Feeding deterrence of flavonoids and related phenolics towards *Schizaphis graminum* and *Myzus persicae*: Aphid feeding deterrents in wheat. *Phytochemistry* **20**: 2489–2493
- Du Y, Poppy G, Powell W, Pickett J, Wadhams L, Woodcock C** (1998) Identification of Semiochemicals Released During Aphid Feeding That Attract Parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* **24**: 1355–1368
- Duan C, Yu J, Bai J, Zhu Z, Wang X** (2014) Induced defense responses in rice plants against small brown planthopper infestation. *The Crop Journal* **2**: 55–62
- Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I** (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol* **198**: 16–32
- Duffey SS, Stout MJ** (1996) Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**: 3–37
- Duhlian L, Koramutla MK, Subramanian S, Chamola R, Bhattacharya R** (2020) Comparative transcriptomics revealed differential regulation of defense related genes in *Brassica juncea* leading to successful and unsuccessful infestation by aphid species. *Sci Rep* **10**: 10583
- Duxbury Z, Wu C, Ding P** (2021) A Comparative Overview of the Intracellular Guardians of Plants and Animals: NLRs in Innate Immunity and Beyond. *Annu Rev Plant Biol* **72**: 155–184
- Edreva A** (2005) Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol* p.105–124
- Eichmann R, Schäfer P** (2015) Growth versus immunity—a redirection of the cell cycle? *Curr Opin Plant Biol* **26**: 106–112
- Ehrlich PR, Raven PH** (1964) Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* **18**: 586–608
- El Kasmi F** (2021) How activated NLRs induce anti-microbial defenses in plants. *Biochemical Society Transactions* **49**: 2177–2188
- Ellis C, Karafyllidis I, Turner JG** (2002) Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 1025–1030
- Elzinga DA, De Vos M, Jander G** (2014) Suppression of plant defenses by a *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary effector protein. *Mol Plant Microbe Interact* **27**: 747–756
- Elzinga DA, Jander G** (2013) The role of protein effectors in plant-aphid interactions. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 451–456
- Emden HF van, Harrington R** (2017) *Aphids as Crop Pests*, 2nd Edition. CABI
- Emden HFV, Sponagl B, Wagner E, Baker T, Ganguly S, Douloumpaka S** (1996) Hopkins' 'host selection principle', another nail in its coffin. *Physiological Entomology* **21**: 325–328
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J** (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* **14**: 3–8
- Erwig J, Ghareeb H, Kopischke M, Hacke R, Matei A, Petutschnig E, Lipka V** (2017) Chitin-induced and CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (CERK1) phosphorylation-dependent endocytosis of *Arabidopsis thaliana* LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE5 (LYK5). *New Phytol* **215**: 382–396

- Eyres I, Jaquière J, Sugio A, Duvaux L, Gharbi K, Zhou J-J, Legeai F, Nelson M, Simon J-C, Smadja CM, et al** (2016) Differential gene expression according to race and host plant in the pea aphid. *Mol Ecol* **25**: 4197–4215
- Fang W, Wang Z, Cui R, Li J, Li Y** (2012) Maternal control of seed size by EOD3/CYP78A6 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **70**: 929–939
- FAO** (2022) Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. <https://www.fao.org/faostat/fr/> [Consulté en février 2022]
- Faulds CB, Williamson G** (1999) The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**: 393–395
- Febvay G, Delobel B, Rahbé Y** (1988) Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can J Zool* **66**: 2449–2453
- Febvay G, Liadouze I, Guillaud J, Bonnot G** (1995) Analysis of energetic amino acid metabolism in *Acyrtosiphon pisum*: A multidimensional approach to amino acid metabolism in aphids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**: 45–69
- Feehan JM, Castel B, Bentham AR, Jones JD** (2020) Plant NLRs get by with a little help from their friends. *Curr Opin Plant Biol* **56**: 99–108
- Felton GW, Donato KK, Broadway RM, Duffey SS** (1992) Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dieter protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol* **38**: 277–285
- Fidantsef AL, Stout MJ, Thaler JS, Duffey SS, Bostock RM** (1999) Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **54**: 97–114
- Field LM, Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL** (1993) Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem J* **294**: 569–574
- Figuroa-Macías JP, García YC, Núñez M, Díaz K, Olea AF, Espinoza L** (2021) Plant Growth-Defense Trade-Offs: Molecular Processes Leading to Physiological Changes. *Int J Mol Sci* **22**: 693
- Fischer DC, Kogan M, Paxton J** (1990) Effect of Glyceollin, a Soybean Phytoalexin, on Feeding by Three Phytophagous Beetles (Coleoptera: Coccinellidae and Chrysomelidae): Dose versus Response. *Environmental Entomology* **19**: 1278–1282
- Flor HH** (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275–296
- Florencio-Ortiz V, Gruz J, Casas JL** (2021a) Changes in the free phenolic acid composition of pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves in response to green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. *Arthropod-Plant Interactions* **15**: 329–336
- Florencio-Ortiz V, Novák O, Casas JL** (2018) Local and systemic hormonal responses in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves under green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) infestation. *J Plant Physiol* **231**: 356–363
- Florencio-Ortiz V, Sellés-Marchart S, Casas JL** (2021b) Proteome changes in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves induced by the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer). *BMC Plant Biol* **21**: 12
- Foyer CH, Verrall SR, Hancock RD** (2015) Systematic analysis of phloem-feeding insect-induced transcriptional reprogramming in *Arabidopsis* highlights common features and reveals distinct responses to specialist and generalist insects. *J Exp Bot* **66**: 495–512
- Franceschi P, Dong Y, Strupat K, Vrhovsek U, Mattivi F** (2012) Combining intensity correlation analysis and MALDI imaging to study the distribution of flavonols and dihydrochalcones in Golden Delicious apples. *J Exp Bot* **63**: 1123–1133

- Friedrichsen DM, Nemhauser J, Muramitsu T, Maloof JN, Alonso J, Ecker JR, Furuya M, Chory J** (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* **162**: 1445–1456
- Furch ACU, Hafke JB, Schulz A, van Bel AJE** (2007) Ca<sup>2+</sup>-mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *J Exp Bot* **58**: 2827–2838
- Gallego-Giraldo L, Posé S, Pattathil S, Peralta AG, Hahn MG, Ayre BG, Sunuwar J, Hernandez J, Patel M, Shah J, et al** (2018) Elicitors and defense gene induction in plants with altered lignin compositions. *New Phytol* **219**: 1235–1251
- Gantner M, Najda A, Piesik D** (2019) Effect of phenolic acid content on acceptance of hazel cultivars by filbert aphid. *Plant Protection Science* **55**: 116–122
- Gao L-L, Klingler JP, Anderson JP, Edwards OR, Singh KB** (2008) Characterization of Pea Aphid Resistance in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **146**: 996–1009
- Gao P, Zhang H, Yan H, Zhou N, Yan B, Fan Y, Tang K, Qiu X** (2021) Transcriptomic and metabolomic changes triggered by *Macrosiphum rosivorum* in rose (*Rosa longicuspis*). *BMC Genomics* **22**: 885
- Gao Q-M, Zhu S, Kachroo P, Kachroo A** (2015) Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front Plant Sci* **6**:228
- Gao Z, Chung E-H, Eitas TK, Dangl JL** (2011) Plant intracellular innate immune receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1 (RPM1) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 7619–7624
- García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T** (2014) *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Mol Plant Pathol* **15**: 226–241
- Gerendás J, Sattelmacher B** (1997) Significance of N source (urea vs. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. *giromontiina*). *Plant and Soil* **196**: 217–222
- Gherlenda AN, Moore BD, Haigh AM, Johnson SN, Riegler M** (2016) Insect herbivory in a mature Eucalyptus woodland canopy depends on leaf phenology but not CO<sub>2</sub> enrichment. *BMC Ecology* **16**: 47
- Giordanengo P, Brunissen L, Rusterucci C, Vincent C, van Bel A, Dinant S, Girousse C, Faucher M, Bonnemain J-L** (2010) Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 516–523
- Girousse C, Moulia B, Silk W, Bonnemain J-L** (2005) Aphid Infestation Causes Different Changes in Carbon and Nitrogen Allocation in Alfalfa Stems as Well as Different Inhibitions of Longitudinal and Radial Expansion. *Plant Physiol* **137**: 1474–1484
- Githiri SM, Ampong-Nyarko K, Osir EO, Kimani PM** (1996) Genetics of resistance to *Aphis craccivora* in cowpea. *Euphytica* **89**: 371–376
- Glazebrook J** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–227
- Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S** (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**: 1555–1573
- Goggin FL, Fischer HD** (2022) Reactive Oxygen Species in Plant Interactions With Aphids. *Front Plant Sci* **12**:811105
- Goławska S, Łukasik I** (2012) Antifeedant activity of luteolin and genistein against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Pest Sci* (2004) **85**: 443–450
- Gómez-Gómez L, Boller T** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* **5**: 1003–1011

- Goujon T, Sibout R, Pollet B, Maba B, Nussaume L, Bechtold N, Lu F, Ralph J, Mila I, Barrière Y, et al** (2003) A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Mol Biol* **51**: 973–989
- Gravot A, Deleu C, Wagner G, Lariagon C, Lugan R, Todd C, Wendehenne D, Delourme R, Bouchereau A, Manzaneres-Dauleux MJ** (2012) Arginase induction represses gall development during clubroot infection in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **53**: 901–911
- Guihéneuf Y** (1998) Productions fruitières. Synthèse agricole, Bordeaux
- Gunnaiah R, Kushalappa AC, Duggavathi R, Fox S, Somers DJ** (2012) Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* **7**: e40695
- Güntner C, Vázquez Á, González G, Usubillaga A, Ferreira F, Moyna P** (2000) Effect of Solanum glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*: part II. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 1113–1121
- Guo H, Peng X, Gu L, Wu J, Ge F, Sun Y** (2017) Up-regulation of MPK4 increases the feeding efficiency of the green peach aphid under elevated CO<sub>2</sub> in *Nicotiana attenuata*. *J Exp Bot* **68**: 5923–5935
- Gupta A, Singh M, Laxmi A** (2015) Multiple Interactions between Glucose and Brassinosteroid Signal Transduction Pathways in *Arabidopsis* Are Uncovered by Whole-Genome Transcriptional Profiling. *Plant Physiol* **168**: 1091–1105
- Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T** (2017) Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends Plant Sci* **22**: 779–791
- Hafrén A, Hofius D** (2017) NBR1-mediated antiviral xenophagy in plant immunity. *Autophagy* **13**: 2000–2001
- Halarewicz A, Gabryś B** (2012) Probing behavior of bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* L. on native bird cherry *Prunus padus* L. and alien invasive black cherry *Prunus serotina* Ehrh. in Europe and the role of cyanogenic glycosides. *Arthropod-Plant Interactions* **6**: 497–505
- Hart SV, Kogan M, Paxton JD** (1983) Effect of soybean phytoalexins on the herbivorous insects mexican bean beetle and soybean looper. *J Chem Ecol* **9**: 657–672
- Hartmann M, Zeier J** (2018) l-lysine metabolism to *N*-hydroxypipicolinic acid: an integral immune-activating pathway in plants. *Plant J* **96**: 5–21
- Hartmann M, Zeier J** (2019) *N*-hydroxypipicolinic acid and salicylic acid: a metabolic duo for systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biol* **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*-Hydroxypipicolinic Acid Is a Critical Element of Plant Systemic Immunity. *Cell* **173**: 456–469.e16
- Hawkins C, Ginzburg D, Zhao K, Dwyer W, Xue B, Xu A, Rice S, Cole B, Paley S, Karp P, et al** (2021) Plant Metabolic Network 15: A resource of genome-wide metabolism databases for 126 plants and algae. *J Int Plant Biol* **63**: 1888–1905
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A** (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav* **7**: 1456–1466
- Hazak O, Mamon E, Lavy M, Sternberg H, Behera S, Schmitz-Thom I, Bloch D, Dementiev O, Gutman I, Danziger T, et al** (2019) A novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein that can rapidly transduce auxin responses during root growth. *PLoS Biol* **17**: e3000085
- He J, Chen F, Chen S, Lv G, Deng Y, Fang W, Liu Z, Guan Z, He C** (2011) *Chrysanthemum* leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. *J Plant Physiol* **168**: 687–693

- He Y, Xu J, Wang X, He X, Wang Y, Zhou J, Zhang S, Meng X** (2019) The Arabidopsis Pleiotropic Drug Resistance Transporters PEN3 and PDR12 Mediate Camalexin Secretion for Resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Cell* **31**: 2206–2222
- Heil M, Baldwin IT** (2002) Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Sci* **7**: 61–67
- Heil M, Silva Bueno JC** (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5467–5472
- Hembry DH, Yoder JB, Goodman KR** (2015) Coevolution and the Diversification of Life. *The American Naturalist*. Vol. **184**, pp. 425–438
- Hettenhausen C, Schuman MC, Wu J** (2015) MAPK signaling – a key element in plant defense response to insects. *Insect Sci* **22**: 157–164
- Hettenhausen C, Sun G, He Y, Zhuang H, Sun T, Qi J, Wu J** (2016) Genome-wide identification of calcium-dependent protein kinases in soybean and analyses of their transcriptional responses to insect herbivory and drought stress. *Scientific Reports* **6**: 18973
- Hewer A, Becker A, Bel AJE van** (2011) An aphid's Odyssey – the cortical quest for the vascular bundle. *J Exp Biol* **214**: 3868–3879
- Hichri I, Deluc L, Barrieu F, Bogs J, Mahjoub A, Regad F, Gallois B, Granier T, Trossat-Magnin C, Gomès E, et al** (2011) A single amino acid change within the R2 domain of the VvMYB5b transcription factor modulates affinity for protein partners and target promoters selectivity. *BMC Plant Biol* **11**: 117
- Hilaire C, Giauque P** (2003) *Le pêcheur*. CTIFL, Paris
- Hilfiker O, Groux R, Bruessow F, Kiefer K, Zeier J, Reymond P** (2014) Insect eggs induce a systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J* **80**: 1085–1094
- Hill C, Shiao D, Fox C, Hartman GL** (2017) Characterization and genetics of multiple soybean aphid biotype resistance in five soybean plant introductions. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik*. Vol.130, pp. 1335–1348
- Hillwig MS, Chiozza M, Casteel CL, Lau ST, Hohenstein J, Hernández E, Jander G, MacIntosh GC** (2016) Abscisic acid deficiency increases defence responses against *Myzus persicae* in Arabidopsis. *Mol Plant Pathol* **17**: 225–235
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuhara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K** (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 10205–10210
- Hohenstein JD, Studham ME, Klein A, Kovinich N, Barry K, Lee Y-J, MacIntosh GC** (2019) Transcriptional and Chemical Changes in Soybean Leaves in Response to Long-Term Aphid Colonization. *Front Plant Sci*. **10**: 310
- Holt J, Wratten S** (2011) Components of resistance to *Aphis fabae* in faba bean cultivars. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **40**: 35–40
- van der Hoorn RAL, Kamoun S** (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell* **20**: 2009–2017
- Hou S, Wang X, Chen D, Yang X, Wang M, Turrà D, Di Pietro A, Zhang W** (2014) The secreted peptide PIP1 amplifies immunity through receptor-like kinase 7. *PLoS Pathog* **10**: e1004331
- Howe GA, Jander G** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 41–66
- Hu C, Ham B-K, El-shabrawi HM, Alexander D, Zhang D, Ryals J, Lucas WJ** (2016) Proteomics and metabolomics analyses reveal the cucurbit sieve tube system as a complex metabolic space. *Plant J* **87**: 442–454
- Hu Y, Dong Q, Yu D** (2012) Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci* **185–186**: 288–297

- Huang W, Wang Y, Li X, Zhang Y** (2020) Biosynthesis and Regulation of Salicylic Acid and *N*-Hydroxypipecolic Acid in Plant Immunity. *Mol Plant* **13**: 31–41
- Huang W, Wu Z, Tian H, Li X, Zhang Y** (2021) Arabidopsis CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60b plays dual roles in plant immunity. *Plant Commun* **2**: 100213
- Hullé M, Chaubet B, Turpeau E, Simon J-C** (2020) Encyclop'Aphid: a website on aphids and their natural enemies. *Entomologia Generalis* 97–101
- Hunziker P, Lambertz SK, Weber K, Crocoll C, Halkier BA, Schulz A** (2021) Herbivore feeding preference corroborates optimal defense theory for specialized metabolites within plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**: e2111977118
- de Ilarduya OM, Xie Q, Kaloshian I** (2003) Aphid-Induced Defense Responses in *Mi-1*-Mediated Compatible and Incompatible Tomato Interactions. *MPMI* **16**: 699–708
- Isac M, Preda S, Marcu M** (1998) Aphid species--vectors of *Plum pox virus*. *Acta Virol* **42**: 233–234
- Jagodzik P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M, Ludwikow A** (2018) Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front Plant Sci* **9**:1387
- Jakobs R, Schweiger R, Müller C** (2019) Aphid infestation leads to plant part-specific changes in phloem sap chemistry, which may indicate niche construction. *New Phytol* **221**: 503–514
- Jamali Jaghdani S, Jahns P, Tränkner M** (2021) Mg deficiency induces photo-oxidative stress primarily by limiting CO<sub>2</sub> assimilation and not by limiting photosynthetic light utilization. *Plant Sci* **302**: 110751
- Jaouannet M, Morris JA, Hedley PE, Bos JIB** (2015) Characterization of Arabidopsis Transcriptional Responses to Different Aphid Species Reveals Genes that Contribute to Host Susceptibility and Non-host Resistance. *PLOS Pathogens* **11**: e1004918
- Jeandet P, Clément C, Courrot E, Cordelier S** (2013) Modulation of Phytoalexin Biosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance. *Int J Mol Sci* **14**: 14136–14170
- Jhou Y-S, Poovendhan S, Huang L-H, Tsai C-W** (2021) Host Acceptance and Plant Resistance: A Comparative Behavioral Study of *Myzus persicae* and *Acyrtosiphon pisum*. *Insects* **12**: 975
- Jia Y, Yuan Y, Zhang Y, Yang S, Zhang X** (2015) Extreme expansion of NBS-encoding genes in Rosaceae. *BMC Genetics* **16**: 48
- Jiang S, Lu Y, Li K, Lin L, Zheng H, Yan F, Chen J** (2014) Heat shock protein 70 is necessary for Rice stripe virus infection in plants. *Mol Plant Pathol* **15**: 907–917
- Jiang Y, Zhang C-X, Chen R, He SY** (2019) Challenging battles of plants with phloem-feeding insects and prokaryotic pathogens. *PNAS* **116**: 23390–23397
- Joglekar S, Suliman M, Bartsch M, Halder V, Maintz J, Bautor J, Zeier J, Parker JE, Kombrink E** (2018) Chemical Activation of EDS1/PAD4 Signaling Leading to Pathogen Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **59**: 1592–1607
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Jones JDG, Vance RE, Dangl JL** (2016) Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* **354**:6316
- Jordan M-O, Sauge M-H, Vercambre G** (2020) Chemical and growth traits of the peach tree may induce higher infestation rates of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag Sci* **76**: 797–806
- Jung S, Lee T, Cheng C-H, Buble K, Zheng P, Yu J, Humann J, Ficklin SP, Gasic K, Scott K, et al** (2019) 15 years of GDR: New data and functionality in the Genome Database for Rosaceae. *Nucleic Acids Res* **47**: D1137–D1145
- Kamphuis LG, Klingler JP, Jacques S, Gao L-L, Edwards OR, Singh KB** (2019) Additive and epistatic interactions between AKR and AIN loci conferring bluegreen aphid resistance and hypersensitivity in *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* **70**: 4887–4902

- Karasov TL, Chae E, Herman JJ, Bergelson J** (2017) Mechanisms to Mitigate the Trade-Off between Growth and Defense. *Plant Cell* **29**: 666–680
- Kariyat RR, Gaffoor I, Sattar S, Dixon CW, Frock N, Moen J, De Moraes CM, Mescher MC, Thompson GA, Chopra S** (2019) Sorghum 3-Deoxyanthocyanidin Flavonoids Confer Resistance against Corn Leaf Aphid. *J Chem Ecol* **45**: 502–514
- Karley AJ, Ashford DA, Minto LM, Pritchard J, Douglas AE** (2005) The significance of gut sucrose activity for osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* **51**: 1313–1319
- Karley AJ, Douglas AE, Parker WE** (2002) Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *J Exp Biol* **205**: 3009–3018
- Kaur H, Salh PK, Singh B** (2017) Role of defense enzymes and phenolics in resistance of wheat crop (*Triticum aestivum* L.) towards aphid complex. *J Plant Interact* **12**: 304–311
- Kazana E, Pope TW, Tibbles L, Bridges M, Pickett JA, Bones AM, Powell G, Rossiter JT** (2007) The cabbage aphid: a walking mustard oil bomb. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 2271–2277
- Kehr J** (2006) Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *J Exp Bot* **57**: 767–774
- Kempel A, Schädler M, Chrobok T, Fischer M, van Kleunen M** (2011) Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 5685–5689
- Kerchev PI** (2011) Local and systemic responses to *Myzus persicae* in Arabidopsis. A role for redox components. Phd. University of Leeds
- Kerchev PI, Fenton B, Foyer CH, Hancock RD** (2012) Infestation of potato (*Solanum tuberosum* L.) by the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) alters cellular redox status and is influenced by ascorbate. *Plant Cell Environ* **35**(2): 430–440
- Kerchev PI, Karpińska B, Morris JA, Hussain A, Verrall SR, Hedley PE, Fenton B, Foyer CH, Hancock RD** (2013) Vitamin C and the abscisic acid-insensitive 4 transcription factor are important determinants of aphid resistance in Arabidopsis. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2091–2105
- Kersch-Becker MF, Thaler JS** (2019) Constitutive and herbivore-induced plant defences regulate herbivore population processes. *J Anim Ecol* **88**: 1079–1088
- Kettles GJ, Drurey C, Schoonbeek H, Maule AJ, Hogenhout SA** (2013) Resistance of Arabidopsis thaliana to the green peach aphid, *Myzus persicae*, involves camalexin and is regulated by microRNAs. *New Phytol* **198**: 1178–1190
- Kfoury L, Massonié G** (1995) Caractéristiques de la résistance du cultivar de pêcher Rubira à *Myzus persicae* Sulzer. *Agronomie* **15**: 277–284
- Khan MIR, Fatma M, Per TS, Anjum NA, Khan NA** (2015) Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front Plant Sci.* **6**:462
- Kim DS, Hwang BK** (2014) An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *J Exp Bot* **65**: 2295–2306
- Kim JH, Jander G** (2007) *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on Arabidopsis induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant J* **49**: 1008–1019
- Kim JH, Lee BW, Schroeder FC, Jander G** (2008) Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J* **54**: 1015–1026
- Kim MG, Geng X, Lee SY, Mackey D** (2009) The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpm1 induces significant defenses by activating the Arabidopsis nucleotide-binding leucine-rich repeat protein RPS2. *Plant J* **57**: 645–653

- Kimura S, Waszczak C, Hunter K, Wrzaczek M** (2017) Bound by Fate: The Role of Reactive Oxygen Species in Receptor-Like Kinase Signaling. *Plant Cell* **29**: 638–654
- Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, et al** (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**: 505–516
- Klein AT, Yagnik GB, Hohenstein JD, Ji Z, Zi J, Reichert MD, MacIntosh GC, Yang B, Peters RJ, Vela J, et al** (2015) Investigation of the Chemical Interface in the Soybean–Aphid and Rice–Bacteria Interactions Using MALDI-Mass Spectrometry Imaging. *Anal Chem* **87**: 5294–5301
- Kloth KJ, Wiegers GL, Busscher-Lange J, van Haarst JC, Kruijer W, Bouwmeester HJ, Dicke M, Jongsma MA** (2016) AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling. *J Exp Bot* **67**: 3383–3396
- Knepper C, Savory EA, Day B** (2011) The role of NDR1 in pathogen perception and plant defense signaling. *Plant Signal Behav* **6**: 1114–1116
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H** (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* **19**: 1065–1080
- Kobe B, Kajava AV** (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 725–732
- Koch KG, Palmer NA, Donze-Reiner T, Scully ED, Seravalli J, Amundsen K, Twigg P, Louis J, Bradshaw JD, Heng-Moss TM, et al** (2020) Aphid-Responsive Defense Networks in Hybrid Switchgrass. *Front Plant Sci* **11**:1145
- Kohorn BD, Johansen S, Shishido A, Todorova T, Martinez R, Defeo E, Obregon P** (2009) Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. *Plant J* **60**: 974–982
- Kong F, Liang Y, Légeret B, Beyly-Adriano A, Blangy S, Haslam RP, Napier JA, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y** (2017) Chlamydomonas carries out fatty acid  $\beta$ -oxidation in ancestral peroxisomes using a bona fide acyl-CoA oxidase. *Plant J* **90**: 358–371
- Kos M, Houshyani B, Achhami BB, Wietsma R, Gols R, Weldegergis BT, Kabouw P, Bouwmeester HJ, Vet LEM, Dicke M, et al** (2012) Herbivore-Mediated Effects of Glucosinolates on Different Natural Enemies of a Specialist Aphid. *J Chem Ecol* **38**: 100–115
- Kos M, Houshyani B, Overeem A-J, Bouwmeester H, Weldegergis B, van Loon J, Dicke M, Vet L** (2013) Genetic engineering of plant volatile terpenoids: Effects on a herbivore, a predator and a parasitoid. *Pest management science* **69**: 302–311
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED** (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *PNAS* **105**: 9823–9828
- Krishnaswamy S, Verma S, Rahman MH, Kav NNV** (2011) Functional characterization of four APETALA2-family genes (*RAP2.6*, *RAP2.6L*, *DREB19* and *DREB26*) in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **75**: 107–127
- Kumar S** (2019) Aphid-Plant Interactions: Implications for Pest Management. *Plant Communities and Their Environment*. Vol.3, pp.223-232
- Kundu A, Vadassery J** (2019) Chlorogenic acid-mediated chemical defence of plants against insect herbivores. *Plant Biol* **21**: 185–189
- Kurusu T, Hamada J, Hamada H, Hanamata S, Kuchitsu K** (2010) Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in innate immunity in rice. *Plant Signal Behav* **5**: 1045–1047
- Kuśnierczyk A, Winge P, Jørstad TS, Troczyńska J, Rossiter JT, Bones AM** (2008) Towards global understanding of plant defence against aphids—timing and dynamics of early Arabidopsis defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant Cell Environ* **31**: 1097–1115

- Kuśnierczyk A, Winge P, Midelfart H, Armbruster WS, Rossiter JT, Bones AM** (2007) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. *J Exp Bot* **58**: 2537–2552
- Lam H-M, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM** (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 569–593
- Lamb KP** (1959) Composition of the honeydew of the aphid *Brevicoryne brassicae* (L.) feeding on swedes (*Brassica napobrassica* DC.). *J Insect Physiol* **3**: 1–13
- Lambert P, Pascal T** (2011) Mapping *Rm2* gene conferring resistance to the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) in the peach cultivar “Rubira®.” *Tree Genetics and Genomes*. **7**, 1057-1068
- Lambertucci S, Orman KM, Das Gupta S, Fisher JP, Gazal S, Williamson RJ, Cramer R, Bindschedler LV** (2019) Analysis of Barley Leaf Epidermis and Extrahaustorial Proteomes During Powdery Mildew Infection Reveals That the PR5 Thaumatin-Like Protein TLP5 Is Required for Susceptibility Towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Front Plant Sci* **10**: 1138
- Lapin D, Kovacova V, Sun X, Dongus JA, Bhandari D, von Born P, Bautor J, Guarneri N, Rzemieniewski J, Stuttmann J, et al** (2019) A Coevolved EDS1-SAG101-NRG1 Module Mediates Cell Death Signaling by TIR-Domain Immune Receptors. *Plant Cell* **31**: 2430–2455
- Lattanzio V, Arpaia S, Cardinali A, Di Venere D, Linsalata V** (2000) Role of endogenous flavonoids in resistance mechanism of Vigna to aphids. *J Agric Food Chem* **48**: 5316–5320
- Le Roux V, Dugravot S, Brunissen L, Vincent C, Pelletier Y, Giordanengo P** (2010) Antixenosis phloem-based resistance to aphids: is it the rule? *Ecological Entomology* **35**: 407–416
- Leckstein PM, Llewellyn M** (1974) The role of amino acids in diet intake and selection and the utilization of dipeptides by *Aphis fabae*. *Journal of Insect Physiology* Vol.**20**, pp.877-885
- Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A** (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**: 527–538
- Lee G, Joo Y, Baldwin IT, Kim S-G** (2021) Tissue-specific systemic responses of the wild tobacco *Nicotiana attenuata* against stem-boring herbivore attack. *Journal of Ecology and Environment* **45**: 15
- Lee S, Cassone BJ, Wijeratne A, Jun T-H, Michel AP, Mian MAR** (2017) Transcriptomic dynamics in soybean near-isogenic lines differing in alleles for an aphid resistance gene, following infestation by soybean aphid biotype 2. *BMC Genomics* **18**: 472
- Lee S, Lee DW, Lee Y, Mayer U, Stierhof Y-D, Lee S, Jürgens G, Hwang I** (2009) Heat Shock Protein Cognate 70-4 and an E3 Ubiquitin Ligase, CHIP, Mediate Plastid-Destined Precursor Degradation through the Ubiquitin-26S Proteasome System in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 3984–4001
- Leiss KA, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PGL** (2009) Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in Chrysanthemum. *Plant Physiol* **150**: 1567–1575
- Lenk M, Wenig M, Bauer K, Hug F, Knappe C, Lange B, Timsy, Häußler F, Mengel F, Dey S, et al** (2019) Pilocolic Acid Is Induced in Barley upon Infection and Triggers Immune Responses Associated with Elevated Nitric Oxide Accumulation. *MPMI* **32**: 1303–1313
- Leroy PD, Wathelet B, Sabri A, Francis F, Verheggen FJ, Capella Q, Thonart P, Haubruge E** (2011) Aphid-host plant interactions: does aphid honeydew exactly reflect the host plant amino acid composition? *Arthropod-Plant Interactions* **5**: 193–199
- Leváková Ľ, Lacko-Bartosova M** (2017) Phenolic acids and antioxidant activity of wheat species: A review. *Agriculture* **63**: 92–101
- Levin DA** (1973) The Role of Trichomes in Plant Defense. *The Quarterly Review of Biology* **48**: 3–15

- Levy M, Wang Q, Parrella MP, Abel S** (2005) Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant J* **43**, pp.79-96
- Lewis JD, Lee AH-Y, Hassan JA, Wan J, Hurley B, Jhingree JR, Wang PW, Lo T, Youn J-Y, Guttman DS, et al** (2013) The Arabidopsis ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 18722–18727
- Li B, Dewey CN** (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* **12**: 323
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC** (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 213–222
- Li L-S, Ying J, Li E, Ma T, Li M, Gong L-M, Wei G, Zhang Y, Li S** (2021a) Arabidopsis CBP60b is a central transcriptional activator of immunity. *Plant Physiol* **186**: 1645–1659
- Li P, Song A, Gao C, Jiang J, Chen S, Fang W, Zhang F, Chen F** (2015a) The over-expression of a chrysanthemum WRKY transcription factor enhances aphid resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* **95**: 26–34
- Li Q, Xie Q-G, Smith-Becker J, Navarre DA, Kaloshian I** (2006) Mi-1-Mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 655–664
- Li Q, Xu H, Zhang W, Sun J, Yue Y** (2022) Extraction of cucumber phloem sap based on the capillary–air pressure principle. *BioTechniques*. Vol.6 No.6
- Li X, Zhang Y, Clarke JD, Li Y, Dong X** (1999) Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of npr1-1. *Cell* **98**: 329–339
- Li Y, Kim JI, Pysh L, Chapple C** (2015b) Four Isoforms of Arabidopsis 4-Coumarate:CoA Ligase Have Overlapping yet Distinct Roles in Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Physiol* **169**: 2409–2421
- Li Y, Li S, Du R, Wang J, Li H, Xie D, Yan J** (2021b) Isoleucine Enhances Plant Resistance Against *Botrytis cinerea* via Jasmonate Signaling Pathway. *Front Plant Sci* **12**:628328
- Liang D, Chen M, Qi X, Xu Q, Zhou F, Chen X** (2016) QTL Mapping by SLAF-seq and Expression Analysis of Candidate Genes for Aphid Resistance in Cucumber. *Front Plant Sci* **7**: 1000
- Lim G-H, Shine MB, de Lorenzo L, Yu K, Cui W, Navarre D, Hunt AG, Lee J-Y, Kachroo A, Kachroo P** (2016) Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* **19**: 541–549
- Lin W, Lu D, Gao X, Jiang S, Ma X, Wang Z, Mengiste T, He P, Shan L** (2013) Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 12114–12119
- Lisso J, Schröder F, Müssig C** (2013) EXO modifies sucrose and trehalose responses and connects the extracellular carbon status to growth. *Front Plant Sci* **4**: 219
- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G** (2009) RIN4 Functions with Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPases to Regulate Stomatal Apertures during Pathogen Attack. *PLOS Biology* **7**: e1000139
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 135–162
- Louis J, Gobbato E, Mondal HA, Feys BJ, Parker JE, Shah J** (2012) Discrimination of Arabidopsis PAD4 activities in defense against green peach aphid and pathogens. *Plant Physiol* **158**: 1860–1872
- Louis J, Shah J** (2015) Plant defence against aphids: the PAD4 signalling nexus. *J Exp Bot* **66**: 449–454
- Lozano-Durán R, Zipfel C** (2015) Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends Plant Sci* **20**: 12–19

- Lugan R, Niogret M-F, Leport L, Guégan J-P, Larher FR, Savouré A, Kopka J, Bouchereau A** (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant J* **64**: 215–229
- Ma X, Li Q-H, Yu Y-N, Qiao Y-M, Haq S ul, Gong Z-H** (2020) The CBL–CIPK Pathway in Plant Response to Stress Signals. *Int J Mol Sci*.**16**:5668
- Ma X, Xu G, He P, Shan L** (2016) SERKING Coreceptors for Receptors. *Trends Plant Sci* **21**: 1017–1033
- Machado-Assefh CR, Lopez-Isasmendi G, Tjallingii WF, Jander G, Alvarez AE** (2015) Disrupting *Buchnera aphidicola*, the endosymbiotic bacteria of *Myzus persicae*, delays host plant acceptance. *Arthropod-Plant Interactions* **9**: 529–541
- Macho AP, Zipfel C** (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell* **54**: 263–272
- Macoy DM, Kim WY, Lee SY, Kim MG** (2015) Biotic stress related functions of hydroxycinnamic acid amide in plants. *J Plant Biol* **58**, pp.156-163
- Mai VC, Drzewiecka K, Jeleń H, Narożna D, Rucińska-Sobkowiak R, Kęsy J, Floryszak-Wieczorek J, Gabryś B, Morkunas I** (2014) Differential induction of *Pisum sativum* defense signaling molecules in response to pea aphid infestation. *Plant Sci* **221–222**: 1–12
- Majda M, Robert S** (2018) The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. *Int J Mol Sci* **19**: 951
- Mano J, Belles-Boix E, Babiychuk E, Inzé D, Torii Y, Hiraoka E, Takimoto K, Slooten L, Asada K, Kushnir S** (2005) Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls. *Plant Physiol* **139**: 1773–1783
- Mantelin S, Peng H-C, Li B, Atamian HS, Takken FLW, Kaloshian I** (2011) The receptor-like kinase SISRK1 is required for *Mi-1*-mediated resistance to potato aphids in tomato. *Plant J* **67**: 459–471
- Marcec MJ, Gilroy S, Poovaiah BW, Tanaka K** (2019) Mutual interplay of Ca<sup>2+</sup> and ROS signaling in plant immune response. *Plant Sci* **283**: 343–354
- Martin M** (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**: 10–12
- Maruta N, Burdett H, Lim BYJ, Hu X, Desa S, Manik MK, Kobe B** (2022) Structural basis of NLR activation and innate immune signalling in plants. *Immunogenetics* **74**: 5–26
- Massoné G, Maison P, Monet R, Grasselly C** (1979) Mise en évidence de caractères de résistance à *Myzus varians* Davids chez deux variétés de *Prunus persica* (L) Batsch, également résistantes à *Myzus persicae* Sulzer. *Revue de Zoologie Agricole et de Pathologie Vegetale* **78**: 1-5
- Massoné G, Maison P, Monet R, Grasselly C** (1982) Résistance au puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera Aphididae) chez *Prunus persica* (L.) Batsch et d'autres espèces de Prunus. *Agronomie* **2**: 63-69
- Matiz A, Cambuí CA, Richet N, Mito PT, Gomes F, Pikart FC, Chaumont F, Gaspar M, Mercier H** (2019) Involvement of aquaporins on nitrogen-acquisition strategies of juvenile and adult plants of an epiphytic tank-forming bromeliad. *Planta* **250**: 319–332
- Matsuura H, Fett-Neto A** (2015) Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. pp 1–15
- Medina-Ortega KJ, Walker GP** (2015) Faba bean forisomes can function in defence against generalist aphids. *Plant Cell Environ* **38**: 1167–1177
- Mehrabi S** (2016) Candidate genes for resistance and susceptibility to the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) in barley (*Hordeum vulgare* L.). Stockholm University
- Melotto M, Underwood W, He SY** (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 101–122

- Mensi I** (2013) Localisation *in planta* de *Xanthomonas albilineans* et identification de déterminants moléculaires impliqués dans la colonisation épiphyte de sa plante hôte, la canne à sucre. Thèse de doctorat -- Systèmes intégrés en biologie, agronomie, géosciences, hydrosociences et environnement (SIBAGHE). Microbiologie-Parasitologie
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U** (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **55**: 853–867
- Miller G, Honig A, Stein H, Suzuki N, Mittler R, Zilberstein A** (2009) Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *J Biol Chem* **284**: 26482–26492
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM** (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* **10**: 1307–1319
- Mittler R, Blumwald E** (2015) The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell* **27**: 64–70
- Mohanta TK, Occhipinti A, Atsbaha Zebelo S, Foti M, Fliegmann J, Bossi S, Maffei ME, Berteaux CM** (2012) *Ginkgo biloba* responds to herbivory by activating early signaling and direct defenses. *PLoS One* **7**: e32822
- Moloi MJ, van der Westhuizen AJ** (2014) Involvement of Nitric Oxide in the Russian Wheat Aphid Resistance Response of Wheat. *Cereal research communications* **42**: 119–125
- Mondal HA** (2017) Shaping the understanding of saliva-derived effectors towards aphid colony proliferation in host plant. *J Plant Biol* **60**: 103–115
- Mondal HA** (2020) Aphid saliva: a powerful recipe for modulating host resistance towards aphid clonal propagation. *Arthropod-Plant Interactions* **14**: 547–558
- Monet R, Masson G** (1994) Déterminisme génétique de la résistance au puceron vert (*Myzus persicae*) chez le pêcher. Résultats complémentaires. *Agronomie* **14**: 177–182
- Monteoliva MI, Rizzi YS, Cecchini NM, Hajirezaei M-R, Alvarez ME** (2014) Context of action of Proline Dehydrogenase (ProDH) in the Hypersensitive Response of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* **14**: 21
- Moran PJ, Cheng Y, Cassell JL, Thompson GA** (2002) Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **51**: 182–203
- Moran PJ, Thompson GA** (2001) Molecular Responses to Aphid Feeding in *Arabidopsis* in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiol* **125**: 1074–1085
- Moreno A, Fereres A, Cambra M** (2009) Quantitative estimation of *Plum pox virus* targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*. *Arch Virol* **154**: 1391–1399
- Moriwaki N, Matsushita K, Nishina M, Kono Y** (2003) High concentrations of trehalose in aphid hemolymph. *Applied Entomology and Zoology* **38**: 241–248
- Morkunas I, Mai VC, Gabryś B** (2011) Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiol Plant* **33**: 2057–2073
- Morkunas I, Woźniak A, Formela M, Mai VC, Marczak Ł, Narożna D, Borowiak-Sobkowiak B, Kühn C, Grimm B** (2016) Pea aphid infestation induces changes in flavonoids, antioxidative defence, soluble sugars and sugar transporter expression in leaves of pea seedlings. *Protoplasma* **253**: 1063–1079
- Mou Z, Fan W, Dong X** (2003) Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell* **113**: 935–944
- Munson MA, Baumann P, Kinsey MG** (1991) *Buchnera gen. nov.* and *Buchnera aphidicola sp. nov.*, a Taxon Consisting of the Mycetocyte-Associated, Primary Endosymbionts of Aphids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **41**: 566–568

- Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K, Begum K, Chen M-S, Park Y, Dittmer N, Marshall J, Reese JC** , et al (2008) A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *PNAS* **105**: 9965–9969
- Naessens E, Dubreuil G, Giordanengo P, Baron OL, Minet-Kebdani N, Keller H, Coustau C** (2015) A Secreted MIF Cytokine Enables Aphid Feeding and Represses Plant Immune Responses. *Curr Biol* **25**: 1898–1903
- Nakamura A, Nakajima N, Goda H, Shimada Y, Hayashi K-I, Nozaki H, Asami T, Yoshida S, Fujioka S** (2006) Arabidopsis Aux/IAA genes are involved in brassinosteroid-mediated growth responses in a manner dependent on organ type. *Plant J* **45**: 193–205
- Nalam V, Louis J, Shah J** (2019) Plant defense against aphids, the pest extraordinaire. *Plant Sci* **279**: 96–107
- 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. *Plant Cell* **24**: 5123–5141
- Ng JCK, Perry KL** (2004a) Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol Plant Pathol* **5**: 505–511
- Ngou BPM, Ahn H-K, Ding P, Jones JDG** (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* **592**: 110–115
- Ngou BPM, Ding P, Jones JDG** (2022a) Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* **34**: 1447–1478
- Ngou BPM, Jones JDG, Ding P** (2022b) Plant immune networks. *Trends Plant Sci* **27**: 255–273
- Niu L, Liu Z, Zeng W, Cui G, Pan L, Xu Q, Li G, Wang Z** (2016) Inheritance analysis of resistance to green peach aphids (*Myzus persicae* Sulzer) for peach cultivar “Fen Shouxing” (*Prunus persica* var. *densa*). *Journal of Fruit Science* **33**: 578–584
- Niu L, Pan L, Zeng W, Lu Z, Cui G, Fan M, Xu Q, Wang Z, Li G** (2018) Dynamic transcriptomes of resistant and susceptible peach lines after infestation by green peach aphids (*Myzus persicae* Sülzer) reveal defence responses controlled by the *Rm3* locus. *BMC Genomics* **19**: 846
- Nombela G, Williamson VM, Muñiz M** (2003) The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 645–649
- Nosarzewski M, Downie AB, Wu B, Archbold DD** (2012) The role of SORBITOL DEHYDROGENASE in *Arabidopsis thaliana*. *Funct Plant Biol* **39**: 462–470
- Noutoshi Y, Kuromori T, Wada T, Hirayama T, Kamiya A, Imura Y, Yasuda M, Nakashita H, Shirasu K, Shinozaki K** (2006) Loss of Necrotic Spotted Lesions 1 associates with cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **62**: 29–42
- Nowak H, Komor E** (2010) How aphids decide what is good for them: experiments to test aphid feeding behaviour on *Tanacetum vulgare* (L.) using different nitrogen regimes. *Oecologia* **163**: 973–984
- Oerke E-C** (2006) Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**: 31–43
- Ohto M-A, Hayashi S, Sawa S, Hashimoto-Ohta A, Nakamura K** (2006) Involvement of HLS1 in sugar and auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* **47**: 1603–1611
- Oliveira Lino L, Pacheco I, Mercier V, Faoro F, Bassi D, Bornard I, Quilot-Turion B** (2016) Brown Rot Strikes *Prunus* Fruit: An Ancient Fight Almost Always Lost. *J Agric Food Chem* **64**: 4029–4047
- Orlovskis Z, Reymond P** (2020) *Pieris brassicae* eggs trigger interplant systemic acquired resistance against a foliar pathogen in *Arabidopsis*. *New Phytol* **228**: 1652–1661
- Ortiz-Morea FA, He P, Shan L, Russinova E** (2020) It takes two to tango – molecular links between plant immunity and brassinosteroid signalling. *Journal of Cell Science* **133**(22): jcs246728

- Pallipparambil GR, Sayler RJ, Shapiro JP, Thomas JMG, Kring TJ, Goggin FL** (2015) *Mi-1.2*, an R gene for aphid resistance in tomato, has direct negative effects on a zoophytophagous biocontrol agent, *Orius insidiosus*. *J Exp Bot* **66**: 549–557
- Pan L, Lu Z, Yan L, Zeng W, Shen Z, Yu M, Bu L, Cui G, Niu L, Wang Z** (2022) NLR1 is a strong candidate for the *Rm3* dominant green peach aphid (*Myzus persicae*) resistance trait in peach. *J Exp Bot* **73**: 1357–1369
- Pant S, Huang Y** (2021) Elevated production of reactive oxygen species is related to host plant resistance to sugarcane aphid in sorghum. *Plant Signal Behav* **16**: 1849523
- Parthasarathy A, Savka MA, Hudson AO** (2019) The Synthesis and Role of  $\beta$ -Alanine in Plants. *Front Plant Sci* **10**: 921
- Pascal T, Aberlenc R, Confolent C, Hoerter M, Lecerf E, Tuéro C, Lambert P** (2017) Mapping of new resistance (*Vr2*, *Rm1*) and ornamental (*Di2*, *pl*) Mendelian trait loci in peach. *Euphytica* **213**: 132
- Pascal T, Pfeiffer F, Kervella J, Lacroze JP, Sauge MH, Weber WE** (2002) Inheritance of green peach aphid resistance in the peach cultivar ‘Rubira.’ *Plant Breeding* **121**: 459–461
- Paudel Timilsena B, Seidl-Adams I, Tumlinson JH** (2020) Herbivore-specific plant volatiles prime neighboring plants for nonspecific defense responses. *Plant Cell Environ* **43**: 787–800
- Pazarlar S, Sanver U, Cetinkaya N** (2021) Exogenous pipercolic acid modulates plant defence responses against *Podosphaera xanthii* and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Biol* **23**: 473–484
- Pegadaraju V** (2005) Molecular insights into arabidopsis response to *Myzus persicae* sulzer (green peach aphid). Kansas state University
- Peghaire E, Hamdache S, Galien A, Sleiman M, ter Halle A, El Alaoui H, Kocer A, Richard C, Goupil P** (2020) Inducing Plant Defense Reactions in Tobacco Plants with Phenolic-Rich Extracts from Red Maple Leaves: A Characterization of Main Active Ingredients. *Forests* **11**: 705
- Peng H-C, Mantelin S, Hicks GR, Takken FLW, Kaloshian I** (2016) The Conformation of a Plasma Membrane-Localized Somatic Embryogenesis Receptor Kinase Complex Is Altered by a Potato Aphid-Derived Effector. *Plant Physiol* **171**: 2211–2222
- Peng H-C, Walker GP** (2020) Sieve element occlusion provides resistance against *Aphis gossypii* in TGR-1551 melons. *Insect Science* **27**: 33–48
- Peng Z, Miles PW** (1991) Oxidases in the gut of an aphid, *Macrosiphum rosae* (L.) and their relation to dietary phenolics. *J Insect Physiol* **37**: 779–787
- Peng J, Wang H, Haley SD, Peairs FB, Lapitan NLV** (2007) Molecular Mapping of the Russian Wheat Aphid Resistance Gene Dn2414 in Wheat. *Crop Science* **47**: 2418–2429
- Penvern S, Bellon S, Fauriel J, Sauphanor B** (2010) Peach orchard protection strategies and aphid communities: Towards an integrated agroecosystem approach. *Crop Protection - CROP PROT* **29**: 1148–1156
- Pescod KV, Quick WP, Douglas AE** (2007) Aphid responses to plants with genetically manipulated phloem nutrient levels. *Physiological Entomology* **32**: 253–258
- Pieterse CMJ, Van Loon LC** (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 456–464
- Pitino M, Hogenhout S** (2012) Aphid Protein Effectors Promote Aphid Colonization in a Plant Species-Specific Manner. *Mol Plant Microbe Interact*. Vol. **26**, p.130-139
- Pitorre D, Llauro C, Jobet E, Guillemot J, Brizard J-P, Delseny M, Lasserre E** (2010) RLK7, a leucine-rich repeat receptor-like kinase, is required for proper germination speed and tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **232**: 1339–1353
- Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H** (2009) A Major Role of the MEKK1–MKK1/2–MPK4 Pathway in ROS Signalling. *Mol Plant* **2**: 120–137

- Poëssel, J.-L., Collet, M.-H., Rahbé, Y.** (2009). Method for preparing dicaffeoylquinic acids and use thereof in combating aphids. International Application No. PCT/FR2009/050137, 35 p. WIPO-World Intellectual Property Organization.
- Poëssel JL, Sauge MH, Corre MN, Renaud C, Gaudillère M, Maucourt M, Deborde C, Dufour C, Loonis M, Lacroze JP, Pascal T, Moing A** (2006) Metabolic profiling of shoot apices infested by the peach- potato aphid. *Metabolomics* **2**: page 288
- Poëssel JL, Corre MN, Kervella J, Lacroze JP, Sauge MH** (2002) Increase in phenolic content in the resistant peach cultivar 'Rubira' infested by the green peach aphid, *Myzus persicae*. In IE Hadrami, ed, XXI International Conference on Polyphenols, Vol **1**, Marrakech, Morocco, pp 131-132.
- Pokotylo I, Hodges M, Kravets V, Ruelland E** (2022) A ménage à trois: salicylic acid, growth inhibition, and immunity. *Trends Plant Sci* **27**: 460–471
- Pompon J, Pelletier Y** (2012) Changes in aphid probing behaviour as a function of insect age and plant resistance level. *Bulletin of Entomological Research* **102**: 550–557
- Pompon J, Quiring D, Giordanengo P, Pelletier Y** (2010) Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). *J Insect Physiol* **56**: 610–615
- Ponder KL, Pritchard J, Harrington R, Bales JS** (2000) Difficulties in location and acceptance of phloem sap combined with reduced concentration of phloem amino acids explain lowered performance of the aphid *Rhopalosiphum padi* on nitrogen deficient barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **97**: 203–210
- Pontier D, Gan S, Amasino RM, Roby D, Lam E** (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol Biol* **39**: 1243–1255
- Pontiggia D, Benedetti M, Costantini S, De Lorenzo G, Cervone F** (2020) Dampening the DAMPs: How Plants Maintain the Homeostasis of Cell Wall Molecular Patterns and Avoid Hyper-Immunity. *Front Plant Sci* **11**: 2010
- Prince DC, Drurey C, Zipfel C, Hogenhout SA** (2014) The Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED KINASE1 and the Cytochrome P450 PHYTOALEXIN DEFICIENT3 Contribute to Innate Immunity to Aphids in Arabidopsis. *Plant Physiol* **164**: 2207–2219
- Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C** (2010) Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*. *PLOS Genetics* **6**: e1000999
- Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou J-M** (2017) Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, Vol. **38** : 92-100
- Qi Y, Tsuda K, Nguyen LV, Wang X, Lin J, Murphy AS, Glazebrook J, Thordal-Christensen H, Katagiri F** (2011) Physical association of Arabidopsis hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *J Biol Chem* **286**: 31297–31307
- Rahbé Y, Febvay G, Delobel B, Bournoville R** (1988) *Acyrtosiphon pisum* performance in response to the sugar and amino acid composition of artificial diets, and its relation to lucerne varietal resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **48**: 283–292
- Rahbé Y, Digilio MC, Febvay G, Guillaud J, Fanti P, Pennacchio F** (2002) Metabolic and symbiotic interactions in amino acid pools of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, parasitized by the braconid *Aphidius ervi*. *J Insect Physiol* **48**: 507–516
- Ranty B, Aldon D, Cotellet V, Galaud J-P, Thuleau P, Mazars C** (2016) Calcium Sensors as Key Hubs in Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses. *Front Plant Sci* **7**: 327
- Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J** (2019) g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* **47**: 191–198

- Ridsdill-Smith J, Edwards O, ShaoFang W, Ghisalberti E, Reidy-Crofts J** (2004) Aphid response to plant defensive compounds in lupins. *Aphids in a new millennium Proceedings of the Sixth International Symposium on Aphids, September, 2001, Rennes, France* 491–497
- Rodriguez PA, Bos JIB** (2013) Toward understanding the role of aphid effectors in plant infestation. *Mol Plant Microbe Interact* **26**: 25–30
- Rodriguez PA, Escudero-Martinez C, Bos JIB** (2017) An Aphid Effector Targets Trafficking Protein VPS52 in a Host-Specific Manner to Promote Virulence. *Plant Physiol* **173**: 1892–1903
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L** (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *Plant J* **23**: 131–142
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Wang K, Ryu C-M, Kaundal A, Mysore KS** (2012) Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 336–352
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM** (1998) The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *PNAS* **95**: 9750–9754
- Ruan J, Zhou Y, Zhou M, Yan J, Khurshid M, Weng W, Cheng J, Zhang K** (2019) Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *Int J Mol Sci* **20**: 2479
- Rubil N, Kalachova T, Hauser TP, Burketová L** (2022) Specialist Aphid Feeding Causes Local Activation of Salicylic and Jasmonic Acid Signaling in Arabidopsis Veins. *Mol Plant Microbe Interact* **35**: 119–124
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ** (2010) WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* **15**: 247–258
- Ryan GD, Shukla K, Rasmussen S, Shelp BJ, Newman JA** (2014) Phloem phytochemistry and aphid responses to elevated CO<sub>2</sub>, nitrogen fertilization and endophyte infection. *Agricultural and Forest Entomology Vol.16*, pp.273-283
- Saheed SA, Cierlik I, Larsson KAE, Delp G, Bradley G, Jonsson LMV, Botha CEJ** (2009) Stronger induction of callose deposition in barley by Russian wheat aphid than bird cherry-oat aphid is not associated with differences in callose synthase or beta-1,3-glucanase transcript abundance. *Physiol Plant* **135**: 150–161
- Saijo Y, Loo EP** (2020) Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytol* **225**: 87–104
- Saile SC, Ackermann FM, Sunil S, Keicher J, Bayless A, Bonardi V, Wan L, Doumane M, Stöbbe E, Jaillais Y, et al** (2021) Arabidopsis ADR1 helper NLR immune receptors localize and function at the plasma membrane in a phospholipid dependent manner. *New Phytol* **232**: 2440–2456
- Sanchez-Arcos C, Kai M, Svatoš A, Gershenzon J, Kunert G** (2019) Untargeted Metabolomics Approach Reveals Differences in Host Plant Chemistry Before and After Infestation With Different Pea Aphid Host Races. *Front Plant Sci* **10**: 188
- Sandalio LM, Peláez-Vico MA, Molina-Moya E, Romero-Puertas MC** (2021) Peroxisomes as redox-signaling nodes in intracellular communication and stress responses. *Plant Physiol* **186**: 22–35
- Sandström J, Pettersson J** (1994) Amino acid composition of phloem sap and the relation to intraspecific variation in pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) performance. *J Insect Physiol* **40**: 947–955
- Sauge M-H, Grechi I, Poëssel J-L** (2010) Nitrogen fertilization effects on *Myzus persicae* aphid dynamics on peach: vegetative growth allocation or chemical defence? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **136**: 123–133
- Sauge M-H, Kervella J, Pascal T** (1998a) Settling behaviour and reproductive potential of the green peach aphid *Myzus persicae* on peach varieties and a related wild Prunus. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **89**: 233–242

- Sauge M-H, Kervella J, Rahbé Y** (1998b) Probing behaviour of the green peach aphid *Myzus persicae* on resistant *Prunus* genotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **89**: 223–232
- Sauge M-H, Poëssel J-L, Guillemaud T, Lapchin L** (2011) Resistance induction and herbivore virulence in the interaction between *Myzus persicae* (Sulzer) and a major aphid resistance gene (*Rm2*) from peach. *Arthropod-Plant Interactions* **5**: 369–377
- Schmid P, Bartscherer H, Feucht W** (1984) Ultrastructural localization of polyphenols in the sieve tubes of *Prunus avium* L. by ferric chloride. *Scientia Horticulturae*. Vol.22, pp.105-111
- Schnake A, Hartmann M, Schreiber S, Malik J, Brahmman L, Yildiz I, von Dahlen J, Rose LE, Schaffrath U, Zeier J** (2020) Inducible biosynthesis and immune function of the systemic acquired resistance inducer *N*-hydroxypipelicolic acid in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J Exp Bot* **71**: 6444–6459
- Schultz JC, Appel HM, Ferrieri A, Arnold TM** (2013) Flexible resource allocation during plant defense responses. *Front Plant Sci*. **4**:324
- Schürch S, Linde CC, Knogge W, Jackson LF, McDonald BA** (2004) Molecular population genetic analysis differentiates two virulence mechanisms of the fungal avirulence gene *NIP1*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1114–1125
- Schwartzberg EG, Tumlinson JH** (2014) Aphid honeydew alters plant defence responses. *Functional Ecology* **28**: 386–394
- Schweiger R, Heise A-M, Persicke M, Müller C** (2014) Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. *Plant Cell Environ* **37**: 1574–1585
- Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J** (2014) Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol* **48**: 2097–2098
- Segers K, Declerck S, Mangelings D, Heyden YV, Eeckhaut AV** (2019) Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis* **11**: 2297–2318
- Senthil-Kumar M, Mysore KS** (2012) Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. *Plant Cell Environ* **35**: 1329–1343
- Serba DD, Meng X, Schnable J, Bashir E, Michaud JP, Vara Prasad PV, Perumal R** (2021) Comparative Transcriptome Analysis Reveals Genetic Mechanisms of Sugarcane Aphid Resistance in Grain Sorghum. *Int J Mol Sci* **22**: 7129
- Servillo L, Castaldo D, Giovane A, Casale R, D’Onofrio N, Cautela D, Balestrieri ML** (2018) Ophthalmic acid is a marker of oxidative stress in plants as in animals. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1862**: 991–998
- Seybold H, Trempel F, Ranf S, Scheel D, Romeis T, Lee J** (2014) Ca<sup>2+</sup> signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca<sup>2+</sup> decoding mechanisms. *New Phytol* **204**: 782–790
- Shaaban B, Seeburger V, Schroeder A, Lohaus G** (2020) Sugar, amino acid and inorganic ion profiling of the honeydew from different hemipteran species feeding on *Abies alba* and *Picea abies*. *PLOS ONE* **15**: e0228171
- Shao Z-Q, Zhang Y-M, Hang Y-Y, Xue J-Y, Zhou G-C, Wu P, Wu X-Y, Wu X-Z, Wang Q, Wang B, et al** (2014) Long-Term Evolution of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes: Understanding Gained from and beyond the Legume Family. *Plant Physiol* **166**: 217–234
- Sharma S, Shinde S, Verslues PE** (2013) Functional characterization of an ornithine cyclodeaminase-like protein of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **13**: 182

- Shen J, Diao W, Zhang L, Acharya BR, Wang M, Zhao X, Chen D, Zhang W** (2020) Secreted Peptide PIP1 Induces Stomatal Closure by Activation of Guard Cell Anion Channels in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **11**:1029
- Shi S, Li J, Sun J, Yu J, Zhou S** (2013) Phylogeny and Classification of *Prunus sensu lato* (Rosaceae). *J Int Plant Biol* **55**: 1069–1079
- Shields A, Shivnauth V, Castroverde CDM** (2022) Salicylic Acid and *N*-Hydroxypipicolinic Acid at the Fulcrum of the Plant Immunity-Growth Equilibrium. *Front Plant Sci* **13**: 841688
- Shigenobu S, Wilson ACC** (2011) Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. *Cell Mol Life Sci* **68**: 1297–1309
- Shimomura H, Sashida Y, Adachi T** (1987) Cyanogenic and phenylpropanoid glucosides from *Prunus grayana*. *Phytochemistry* **26**: 2363–2366
- Shinoda T** (1993) Callose reaction induced in melon leaves by feeding of melon aphid, *Aphis gossypii* Glover, as possible aphid-resistant factor. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology (Japan)*, Vol. **37**, pp.145-152
- Sierla M, Waszczak C, Vahisalu T, Kangasjärvi J** (2016) Reactive Oxygen Species in the Regulation of Stomatal Movements. *Plant Physiol* **171**: 1569–1580
- Silva AX, Jander G, Samaniego H, Ramsey JS, Figueroa CC** (2012) Insecticide Resistance Mechanisms in the Green Peach Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A Transcriptomic Survey. *PLoS One*. **6**:e36366
- Silva-Sanzana C, Estevez JM, Blanco-Herrera F** (2020) Influence of cell wall polymers and their modifying enzymes during plant-aphid interactions. *J Exp Bot* **71**: 3854–3864
- Simmonds M** (2001) Importance of flavonoids in insect-plant interactions: Feeding and oviposition. *Phytochemistry* **56**: 245–52
- Singh A** (2017) Glucosinolates and Plant Defense. In J-M Mérillon, KG Ramawat, eds, *Glucosinolates*. Springer International Publishing, Cham, pp 237–246
- Singh V, Louis J, Ayre BG, Reese JC, Shah J** (2011) TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-dependent trehalose metabolism promotes Arabidopsis thaliana defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *Plant J* **67**: 94–104
- Sissi M, Legrand G, Duriot L, Delporte M, Menin B, Michel C, Olry A, Chataigné G, Salwinski A, Bygdell J, Vercaigne D, Wingsle G, Hilbert JL, Bourgaud F, Hehn A, Gagneul D** (2020) A GDGL lipase-like from *Ipomoea batatas* catalyzes efficient production of 3,5-diCQA when expressed in *Pichia pastoris*. *Communications Biology* **3**: 673
- Smith SM** (2002) Does the glyoxylate cycle have an anaplerotic function in plants? *Trends Plant Sci* **7**: 12–13
- Sobhy IS, Caulfield JC, Pickett JA, Birkett MA** (2020) Sensing the Danger Signals: cis-Jasmone Reduces Aphid Performance on Potato and Modulates the Magnitude of Released Volatiles. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**: 499
- Society AP** (1995) *Compendium of Stone Fruit Diseases*, Edition Unstated. Amer Phytopathological Society, St. Paul, MN
- Solomon OL, Berger DK, Myburg AA** (2010) Diurnal and circadian patterns of gene expression in the developing xylem of Eucalyptus trees. *South African Journal of Botany* **76**: 425–439
- Sprawka I, Goławska S** (2010) Effect of the lectin PHA on the feeding behavior of the grain aphid. *J Pest Sci* **83**: 149–155
- Stark R, Grzelak M, Hadfield J** (2019) RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet* **20**: 631–656
- Staudt M, Jackson B, El-Aouni H, Buatois B, Lacroze J-P, Poëssel J-L, Sauge M-H** (2010) Volatile organic compound emissions induced by the aphid *Myzus persicae* differ among resistant and susceptible peach cultivars and a wild relative. *Tree Physiol* **30**: 1320–1334

- Stavrínides J, McCloskey JK, Ochman H** (2009) Pea Aphid as both Host and Vector for the Phytopathogenic Bacterium *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2230–2235
- Stec K, Kordan B, Gabryś B** (2021) Effect of Soy Leaf Flavonoids on Pea Aphid Probing Behavior. *Insects* **12**: 756
- Stewart SA, Hodge S, Ismail N, Mansfield JW, Feys BJ, Prosperi J-M, Huguet T, Ben C, Gentzbittel L, Powell G** (2009) The *RAP1* gene confers effective, race-specific resistance to the pea aphid in *Medicago truncatula* independent of the hypersensitive reaction. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1645–1655
- Struys EA, Jansen EEW, Salomons GS** (2014) Human pyrroline-5-carboxylate reductase (PYCR1) acts on  $\Delta(1)$ -piperideine-6-carboxylate generating L-pipecolic acid. *J Inher Metab Dis* **37**: 327–332
- Su J, Yang L, Zhu Q, Wu H, He Y, Liu Y, Xu J, Jiang D, Zhang S** (2018) Active photosynthetic inhibition mediated by MPK3/MPK6 is critical to effector-triggered immunity. *PLOS Biology* **16**: e2004122
- Sun S, Fang J, Lin M, Hu C, Qi X, Chen J, Zhong Y, Muhammad A, Li Z, Li Y** (2021) Comparative Metabolomic and Transcriptomic Studies Reveal Key Metabolism Pathways Contributing to Freezing Tolerance Under Cold Stress in Kiwifruit. *Front Plant Sci* **12**:628969
- 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. *Nat Commun* **6**: 10159
- Sun Y, Fan X-Y, Cao D-M, Tang W, He K, Zhu J-Y, He J-X, Bai M-Y, Zhu S, Oh E, et al** (2010) Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **19**: 765–777
- Sun Y, He Y, Irfan AR, Liu X, Yu Q, Zhang Q, Yang D** (2020) Exogenous Brassinolide Enhances the Growth and Cold Resistance of Maize (*Zea mays L.*) Seedlings under Chilling Stress. *Agronomy* **10**: 488
- Sun Y, Li L, Macho AP, Han Z, Hu Z, Zipfel C, Zhou J-M, Chai J** (2013) Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex. *Science* **342**: 624–628
- Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Aina T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, et al** (2005) 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 1268–1283
- Talamond P, Verdeil J-L, Conéjéro G** (2015) Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules* **20**: 5024–5037
- Taler D, Galperin M, Benjamin I, Cohen Y, Kenigsbuch D** (2004) Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell* **16**: 172–184
- Tanaka T, Ikeda A, Shiojiri K, Ozawa R, Shiki K, Nagai-Kunihiro N, Fujita K, Sugimoto K, Yamato KT, Dohra H, et al** (2018) Identification of a Hexenal Reductase That Modulates the Composition of Green Leaf Volatiles. *Plant Physiol* **178**: 552–564
- Tang D, Wang G, Zhou J-M** (2017) Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *Plant Cell* **29**: 618–637
- Tang W, Kim T-W, Osés-Prieto JA, Sun Y, Deng Z, Zhu S, Wang R, Burlingame AL, Wang Z-Y** (2008) BSKs Mediate Signal Transduction from the Receptor Kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science* **321**: 557–560
- Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Osés-Prieto JA, Kim T-W, Zhou H-W, Deng Z, Gampala SS, et al** (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* **13**: 124–131
- Testud F, Grillet J-P** (2007) Insecticides organophosphorés, carbamates, pyrèthrinoides de synthèse et divers. *EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement* **2**: 1–24
- The UniProt Consortium** (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* **49**: 480–489

- Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A** (2003) PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* **13**: 2129–2141
- Thorpe P, Escudero-Martinez CM, Eves-van den Akker S, Bos JIB** (2020) Transcriptional changes in the aphid species *Myzus cerasi* under different host and environmental conditions. *Insect Mol Biol* **29**: 271–282
- Thulasi Devendrakumar K, Li X, Zhang Y** (2018) MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cell Mol Life Sci* **75**: 2981–2989
- Tian D, Traw MB, Chen JQ, Kreitman M, Bergelson J** (2003) Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **423**: 74–77
- Tjallingii WF** (2006) Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J Exp Bot* **57**: 739–745
- Tjallingii WF, Esch TH** (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* **18**: 317–328
- Todesco M, Balasubramanian S, Hu TT, Traw MB, Horton M, Eppele P, Kuhns C, Sureshkumar S, Schwartz C, Lanz C, et al** (2010) Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **465**: 632–636
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol* **141**: 373–378
- Toyota M, Spencer D, Sawai-Toyota S, Jiaqi W, Zhang T, Koo AJ, Howe GA, Gilroy S** (2018) Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* **361**: 1112–1115
- Treutter D** (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ Chem Lett* **4**: 147
- Tronchet M, Balagué C, Kroj T, Jouanin L, Roby D** (2009) Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol* **11**: 83–92
- Tsuda K, Katagiri F** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 459–465
- Tungadi T, Watt LG, Groen SC, Murphy AM, Du Z, Pate AE, Westwood JH, Fennell TG, Powell G, Carr JP** (2021) Infection of *Arabidopsis* by *cucumber mosaic virus* triggers jasmonate-dependent resistance to aphids that relies partly on the pattern-triggered immunity factor BAK1. *Mol Plant Pathol* **22**: 1082–1091
- Turlings TCJ, Erb M** (2018) Tritrophic Interactions Mediated by Herbivore-Induced Plant Volatiles: Mechanisms, Ecological Relevance, and Application Potential. *Annu Rev Entomol* **63**: 433–452
- Tuteja N, Tran NQ, Dang HQ, Tuteja R** (2011) Plant MCM proteins: role in DNA replication and beyond. *Plant Mol Biol* **77**: 537–545
- Undas AK, Weihrauch F, Lutz A, van Tol R, Delatte T, Verstappen F, Bouwmeester H** (2018) The Use of Metabolomics to Elucidate Resistance Markers against Damson-Hop Aphid. *J Chem Ecol* **44**: 711–726
- Usha Rani P, Jyothsna Y** (2010) Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense. *Acta Physiol Plant* Vol. **32**, pp.695–701
- Valares Masa C, Sosa Díaz T, Alías Gallego JC, Chaves Lobón N** (2016) Quantitative Variation of Flavonoids and Diterpenes in Leaves and Stems of *Cistus ladanifer* L. at Different Ages. *Molecules* **21**: 275
- VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE** (1994) Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *Plant Cell* **6**: 1191–1192
- Verde I, Abbott AG, Scalabrin S, Jung S, Shu S, Marroni F, Zhebentayeva T, Dettori MT, Grimwood J, Cattonaro F, et al** (2013) The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies

- unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat Genet* **45**: 487–494
- Verde I, Jenkins J, Dondini L, Micali S, Pagliarani G, Vendramin E, Paris R, Aramini V, Gazza L, Rossini L, et al** (2017) The Peach v2.0 release: high-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity. *BMC Genomics* **18**: 225
- Villada ES, González EG, López-Sesé AI, Castiel AF, Gómez-Guillamón ML** (2009) Hypersensitive response to *Aphis gossypii* Glover in melon genotypes carrying the Vat gene. *J Exp Bot* **60**: 3269–3277
- Vincent TR, Avramova M, Canham J, Higgins P, Bilkey N, Mugford ST, Pitino M, Toyota M, Gilroy S, Miller AJ, et al** (2017) Interplay of Plasma Membrane and Vacuolar Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis during Aphid Feeding. *Plant Cell* **29**: 1460–1479
- Visscher AM, Belfield EJ, Vlad D, Irani N, Moore I, Harberd NP** (2015) Overexpressing the Multiple-Stress Responsive Gene *At1g74450* Reduces Plant Height and Male Fertility in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **10**: e0140368
- Vleeshouwers VGAA, Van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT** (2000) Does basal PR gene expression in Solanum species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiol Mol Plant Pathol* **57**: 35–42
- Voelckel C, Weisser WW, Baldwin IT** (2004) An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Mol Ecol* **13**: 3187–3195
- Vogel-Adghough D, Stahl E, Návarová H, Zeier J** (2013) Pipecolic acid enhances resistance to bacterial infection and primes salicylic acid and nicotine accumulation in tobacco. *Plant Signal Behav.* **11**: e26366
- Vonapartis E, Mohamed D, Li J, Pan W, Wu J, Gazzarrini S,** (2022) CBF4/DREB1D represses XERICO to attenuate ABA, osmotic and drought stress responses in Arabidopsis. *Plant J.* **110**(4):961
- de Vos M, Jander G** (2010) Volatile communication in plant-aphid interactions. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 366–371
- de Vos M, Kim JH, Jander G** (2007) Biochemistry and molecular biology of Arabidopsis-aphid interactions. *Bioessays* **29**: 871–883
- Vos P, Simons G, Jesse T, Wijbrandi J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groenendijk J, Diergaarde P, Reijans M, et al** (1998) The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat Biotechnol* **16**: 1365–1369
- Wallis CM, Galarneau ER-A** (2020) Phenolic Compound Induction in Plant-Microbe and Plant-Insect Interactions: A Meta-Analysis. *Front Plant Sci* **11**:580753
- Walters D** (2015) *Physiological Responses of Plants to Attack* |Wiley-Blackwell. Hoboken, NJ, USA. ISBN: 978-1-118-78308-5
- Wamonje FO, Tungadi TD, Murphy AM, Pate AE, Woodcock C, Caulfield JC, Mutuku JM, Cunniffe NJ, Bruce TJA, Gilligan CA, et al** (2020) Three Aphid-Transmitted Viruses Encourage Vector Migration From Infected Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants Through a Combination of Volatile and Surface Cues. *Front Plant Sci* **11**: 1981
- Wang C, Liu R, Lim G-H, de Lorenzo L, Yu K, Zhang K, Hunt AG, Kachroo A, Kachroo P** (2018a) Pipecolic acid confers systemic immunity by regulating free radicals. *Sci Adv* **4**: eaar4509
- Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X** (2006) A Genomic Approach to Identify Regulatory Nodes in the Transcriptional Network of Systemic Acquired Resistance in Plants. *PLOS Pathogens* **2**: e123
- Wang G, Roux B, Feng F, Guy E, Li L, Li N, Zhang X, Lautier M, Jardinaud M-F, Chabannes M, et al** (2015a) The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **18**: 285–295

- Wang J, Hu M, Wang J, Qi J, Han Z, Wang G, Qi Y, Wang H-W, Zhou J-M, Chai J** (2019a) Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* **364**: eaav5870
- Wang J, Li Y, Wang X, Cao K, Zhu G, Fang W, Chen C, Wu J, Guo J, Xu Q, et al** (2021a) Metabolomic and transcriptomic analyses of *Prunus davidiana* reveal the key resistance compound to green peach aphid, betulin. *Mapping Intimacies*. Pre-print
- Wang J, Wang J, Hu M, Wu S, Qi J, Wang G, Han Z, Qi Y, Gao N, Wang H-W, et al** (2019b) Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* **364**:6435
- Wang J, Yang E, Chaurand P, Raghavan V** (2021b) Visualizing the distribution of strawberry plant metabolites at different maturity stages by MALDI-TOF imaging mass spectrometry. *Food Chemistry* **345**: 128838
- 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. *Plant J* **67**: 1029–1041
- Wang W, Luo L, Lu H, Chen S liang, Kang L, Cui F** (2015b) Angiotensin-converting enzymes modulate aphid–plant interactions. *Scientific Reports*.**5** : 8885
- Wang W, Zhang H, Wei X, Yang L, Yang B, Zhang L, Li J, Jiang Y-Q** (2018b) Functional characterization of calcium-dependent protein kinase (CPK) 2 gene from oilseed rape (*Brassica napus L.*) in regulating reactive oxygen species signaling and cell death control. *Gene* **651**: 49–56
- Wang X, Chory J** (2006) Brassinosteroids Regulate Dissociation of BKI1, a Negative Regulator of BRI1 Signaling, from the Plasma Membrane. *Science* **313**: 1118–1122
- Wang Y, Schuck S, Wu J, Yang P, Döring A-C, Zeier J, Tsuda K** (2018c) A MPK3/6-WRKY33-ALD1-Pipecolic Acid Regulatory Loop Contributes to Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **30**: 2480–2494
- Wang Y, Sheng L, Zhang H, Du X, An C, Xia X, Chen F, Jiang J, Chen S** (2017) CmMYB19 Over-Expression Improves Aphid Tolerance in Chrysanthemum by Promoting Lignin Synthesis. *Int J Mol Sci*.**3** :619
- Wang Z, Yan X, Zhang H, Meng Y, Pan Y, Cui H** (2022) NtCycB2 negatively regulates tobacco glandular trichome formation, exudate accumulation, and aphid resistance. *Plant Mol Biol* **108**: 65–76
- Werner AK, Witte C-P** (2011) The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends Plant Sci* **16**: 381–387
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 383–389
- Will T, van Bel AJ** (2008) Induction as well as suppression: How aphid saliva may exert opposite effects on plant defense. *Plant Signal Behav* **3**: 427–430
- Will T, Furch A, Zimmermann M** (2013) How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. *Front Plant Sci* **4**:336
- Will T, Steckbauer K, Hardt M, Bel AJE van** (2012) Aphid Gel Saliva: Sheath Structure, Protein Composition and Secretory Dependence on Stylet-Tip Milieu. *PLOS ONE* **7**: e46903
- Will T, Tjallingii WF, Thönnessen A, van Bel AJE** (2007) Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 10536–10541
- Wille B, Hartman GL** (2008) Evaluation of Artificial Diets for Rearing *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of economic entomology* **101**: 1228–32
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One* **2**: e718
- Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G, Funck D** (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front Plant Sci* **6**:534
- Wojcicka A** (2010) Cereal Phenolic Compounds as Biopesticides of Cereal Aphids. *Polish Journal of Environmental Studies* **19**: 1337–1343

- Woźniak A, Formela M, Bilman P, Grześkiewicz K, Bednarski W, Marczak Ł, Narożna D, Danczewicz K, Mai VC, Borowiak-Sobkowiak B, et al** (2017) The Dynamics of the Defense Strategy of Pea Induced by Exogenous Nitric Oxide in Response to Aphid Infestation. *Int J Mol Sci.* **18**, 329
- 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 Rep* **1**: 639–647
- Wu Z, Li M, Dong OX, Xia S, Liang W, Bao Y, Wasteneys G, Li X** (2019) Differential regulation of TNL-mediated immune signaling by redundant helper CNLs. *New Phytol* **222**: 938–953
- Xu H, Wang Y, Chen Y, Zhang P, Zhao Y, Huang Y, Wang X, Sheng J** (2016) Subcellular Localization of Galloylated Catechins in Tea Plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] Assessed via Immunohistochemistry. *Front Plant Sci* **7**: 728
- Xu J, Padilla CS, Li J, Wickramanayake J, Fischer HD, Goggin FL** (2021a) Redox responses of *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Mol Plant Pathol* **22**: 727–736
- Xu Y, Guo H, Geng G, Zhang Q, Zhang S** (2021b) Changes in defense-related enzymes and phenolics in resistant and susceptible common wheat cultivars under aphid stress. *Acta Physiol Plant* **43**: 36
- Yactayo-Chang JP, Tang HV, Mendoza J, Christensen SA, Block AK** (2020) Plant Defense Chemicals against Insect Pests. *Agronomy* **10**: 1156
- Yamaguchi T, Yamamoto K, Asano Y** (2014) Identification and characterization of CYP79D16 and CYP71AN24 catalyzing the first and second steps in L-phenylalanine-derived cyanogenic glycoside biosynthesis in the Japanese apricot, *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *Plant Mol Biol* **86**: 215–223
- Yan H, Xie N, Zhong C, Su A, Hui X, Zhang X, Jin Z, Li Z, Feng J, He J** (2018) Aphicidal activities of Amaryllidaceae alkaloids from bulbs of *Lycoris radiata* against *Aphis citricola*. *Industrial Crops and Products* **123**: 372–378
- Yates-Stewart AD, Pekarcik A, Michel A, Blakeslee JJ** (2020) Jasmonic Acid-Isoleucine (JA-Ile) Is Involved in the Host-Plant Resistance Mechanism Against the Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* **113**: 2972–2978
- Yildiz I, Mantz M, Hartmann M, Zeier T, Kessel J, Thurow C, Gatz C, Petzsch P, Köhrer K, Zeier J** (2021) The mobile SAR signal N-hydroxy-pipecolic acid induces NPR1-dependent transcriptional reprogramming and immune priming. *Plant Physiol* **186**: 1679–1705
- Yoshimoto K, Ohsumi Y** (2018) Unveiling the Molecular Mechanisms of Plant Autophagy—From Autophagosomes to Vacuoles in Plants. *Plant Cell Physiol* **59**: 1337–1344
- Yoshioka H, Mase K, Yoshioka M, Kobayashi M, Asai S** (2011) Regulatory mechanisms of nitric oxide and reactive oxygen species generation and their role in plant immunity. *Nitric Oxide* **25**: 216–221
- Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou J-M, He SY, Xin X-F** (2021) Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* **592**: 105–109
- Zagrobelny M, Bak S, Rasmussen AV, Jørgensen B, Naumann CM, Lindberg Møller B** (2004) Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry* **65**: 293–306
- Zhang B, Van Aken O, Thatcher L, De Clercq I, Duncan O, Law SR, Murcha MW, van der Merwe M, Seifi HS, Carrie C, et al** (2014) The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **80**: 709–727
- Zhang D, Zhao Y, Wang J, Zhao P, Xu S** (2021) BRS1 mediates plant redox regulation and cold responses. *BMC Plant Biol* **21**: 268
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 14807–14812
- Zhang M, Robertus JD** (2002) Molecular cloning and characterization of a full-length flavin-dependent monooxygenase from yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **403**: 277–283

- Zhang M, Shi H, Li N, Wei N, Tian Y, Peng J, Chen X, Zhang L, Zhang M, Dong H** (2022a) Aquaporin OsPIP2;2 links the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signal and a membrane-anchored transcription factor to promote plant defense. *Plant Physiol* **188**: 2325–2341
- Zhang Q, Li T, Gao M, Ye M, Lin M, Wu D, Guo J, Guan W, Wang J, Yang K, et al** (2022b) Transcriptome and Metabolome Profiling Reveal the Resistance Mechanisms of Rice against Brown Planthopper. *Int J Mol Sci* **23**: 4083
- Zhang X, Wu Q, An C** (2012) RGLG3 and RGLG4, novel ubiquitin ligases modulating jasmonate signaling. *Plant Signal Behav* **7**: 1709–1711
- Zhang Y, Cheng YT, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X** (2006) Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 paralogs. *Plant J* **48**: 647–656
- Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X, Dong X** (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *PNAS* **96**: 6523–6528
- Zhang Y, Wang H-L, Li Z, Guo H** (2020) Genetic Network between Leaf Senescence and Plant Immunity: Crucial Regulatory Nodes and New Insights. *Plants (Basel)* **9**: E495
- Zhang Y, Zhao L, Zhao J, Li Y, Wang J, Guo R, Gan S, Liu C-J, Zhang K** (2017) S5H/DMR6 Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase That Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis. *Plant Physiol* **175**: 1082–1093
- Zhang Z, Xu Y, Xie Z, Li X, He Z-H, Peng X-X** (2016) Association-Dissociation of Glycolate Oxidase with Catalase in Rice: A Potential Switch to Modulate Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels. *Mol Plant* **9**: 737–748
- Zhao R, Wang X, Zhang D-P (2011) CPK12: A Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase balancer in abscisic acid signaling. *Plant Signal Behav* **6**: 1687-1690
- Zhao J** (2007) Interplay among nitric oxide and reactive oxygen species: a complex network determining cell survival or death. *Plant Signal Behav* **2**: 544–547
- Zhao Y, Dong W, Zhu Y, Allan AC, Lin-Wang K, Xu C** (2020) *PpGST1*, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene, is essential for fruit coloration in peach. *Plant Biotech J* **18**: 1284–1295
- Zhou J, Zhang Y, Qi J, Chi Y, Fan B, Yu J-Q, Chen Z** (2014a) E3 Ubiquitin Ligase CHIP and NBR1-Mediated Selective Autophagy Protect Additively against Proteotoxicity in Plant Stress Responses. *PLOS Genetics* **10**: e1004116
- Zhou Y, Zhou H, Lin-Wang K, Vimolmangkang S, Espley RV, Wang L, Allan AC, Han Y** (2014b) Transcriptome analysis and transient transformation suggest an ancient duplicated MYB transcription factor as a candidate gene for leaf red coloration in peach. *BMC Plant Biol* **14**: 388
- Zhu J, Park K-C** (2005) Methyl Salicylate, a Soybean Aphid-Induced Plant Volatile Attractive to the Predator *Coccinella septempunctata*. *J Chem Ecol* **31**: 1733–1746
- Zhu L, Guo J, Ma Z, Wang J, Zhou C** (2018) Arabidopsis Transcription Factor MYB102 Increases Plant Susceptibility to Aphids by Substantial Activation of Ethylene Biosynthesis. *Biomolecules* **2** :39
- Zipfel C** (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 414–420
- Zogli P, Pingault L, Grover S, Louis J** (2020) Ento(o)mics: the intersection of ‘omic’ approaches to decipher plant defense against sap-sucking insect pests. Faculty Publications: Department of Entomology
- Zou J-J, Li X-D, Ratnasekera D, Wang C, Liu W-X, Song L-F, Zhang W-Z, Wu W-H** (2015) Arabidopsis CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE8 and CATALASE3 Function in Abscisic Acid-Mediated Signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Homeostasis in Stomatal Guard Cells under Drought Stress. *Plant Cell* **27**: 1445–1460

- Zrenner R, Riegler H, Marquard CR, Lange PR, Geserick C, Bartosz CE, Chen CT, Slocum RD (2009)** A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in Arabidopsis. *New Phytol* **183**: 117–132
- Zuñiga GE, Corcuera LJ (1986)** Effect of gramine of barley seedlings to the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. Vol.**40**, pp. 259-262
- Züst T, Agrawal AA (2016)** Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. *Nature Plants* **2**: 15206
- Züst T, Agrawal AA (2017)** Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annu Rev Plant Biol* **68**: 513–534

## ANNEXES – Données supplémentaires

**Annexe 1. Compounds identified by GC-El-TOFMS. Identification levels: [1], confirmed structure by comparison with authentic standard, reverse match > 850, difference between retention index (RI) < 1%; [2], probable structure, reverse match > 800 and difference between RI < 1% but without standard injection; [3], tentative candidate, 600 < reverse match < 1000 and difference between RI > 1%. "U\_" stands for "Unknown" level [3] molecules structurally related to known molecules. RT, Retention Time ; RI, Retention Index ; XIC, Extracted Ion used for quantification.**

Compound identity	RT (s)	RI	XIC (m/z)	Identification level
<b>Organic acids</b>				
Citric acid	982	1812	273,1	[1]
Isopropylmalic acid	792	1572	275,2	[2]
Malic acid	730	1483	233,2	[1]
Oxalic acid	405	1123	147,1	[2]
Glyoxylic acid	281	982	160,1	[2]
Succinic acid	580	1314	147,1	[2]
Threonic acid	787	1555	292,2	[2]
Galactonic acid-1,4-lactone	1020	1877	217,1	[2]
Shikimic acid	967	1801	204,1	[2]
Quinic acid	1000	1848	345,2	[2]
<b>Carbohydrates</b>				
Fructose	1016	1861	307,2	[1]
Glucose	1033	1886	319,2	[1]
Sucrose	1362	2644	361,2	[1]
Xylose	861	1652	307,2	[1]
1,6-anhydro- $\beta$ -glucose	891	1700	204,1	[2]
Glucose-6-phosphate	1248	2325	387,1	[2]
U_Kestose	1594	3346	217,1	[2]
U_Glucopyranose	1072	1978	204,1	[2]
U_Mannopyranose	1129	2031	204,1	[2]
U_Mannose	1032	1895	273,1	[2]
U_Sorbofuranose	931	1762	217,1	[2]
U_Sucrose	1352	2596	361,2	[2]
U_Arabino-Hexos-2-ulose-bis-dimethyl-acetal	713	1471	234,1	[2]
<b>Polyols</b>				
Myo_Inositol	1152	2096	305,2	[1]
Mannitol	1045	1922	319,2	[1]
Sorbitol	1052	1930	319,2	[1]
Erythritol	737	1493	205,1	[2]
Glycerol	542	1270	205,2	[2]
<b>Fatty acids</b>				
Octadecanoic acid	1221	2247	341,3	[2]
Hexadecanoic acid	1124	2057	313,3	[2]
U_Ricinoleic_acid	1285	2429	187,1	[2]
<b>Hydroxycinnamic acids</b>				
Trans-Caffeic acid	1170	2140	396,2	[2]
<b>Phytohormones</b>				
Salicylic acid	753	1507	267,1	[1]
Pipecolate	629	1366	156,2	[1]
<b>Other</b>				
Phosphoric acid	540	1268	299,1	[1]
Urea	505	1235	189,1	[1]
Benzylglucopyranoside	1276	2391	204,1	[2]
Boric acid	277	979	221,1	[2]
Prunasin	1322	2529	204,1	[2]

**Annexe 2. Compounds identified by UPLC-ESI-QTOF-MS/MS. Identification level 3. RT, Retention Time ; MIM, Monoisotopic mass ; i-Fit, reliability of the candidate formula calculated by the consistency between the mass shift and the isotope intensity ratio.**

Putative compound identity	RT (min)	MIM	raw formula	[M-H] <sup>-</sup>		MS in source fragments			MS/MS (MSE) fragments					
				m/z	abundance (%)	m/z	raw formula	abundance (%)	m/z	raw formula	abundance (%)			
				abundance (%)	abundance (%)	abundance (%)	abundance (%)	abundance (%)	abundance (%)	abundance (%)				
Cyanidin-glucoside	9.9	449	C21H21O11	447	1.3	36.60%	285,0389	C15H9O6	3.5	[M-2H-glucoside] <sup>-</sup>	285,0389	C15H9O6	3.5	[M-2H-glucoside] <sup>-</sup>
Cyanidin-rhamnosyl-glucoside	10	595	C27H31O15	593	0.2	63.70%					285,0394	C15H9O6	1.8	[M-2H-rhamnosylglucoside] <sup>-</sup>
Quercetagenin-glucoside	11	480	C22H24O12	479	0.4	83.20%	461,1085	C22H21O11	0.2	[M-H-H2O] <sup>-</sup>	299,0551	C16H11O6	1.7	[M-H-H2O-glucoside] <sup>-</sup>
Dihydroquercetin-glucosyl rhamnoside	10	612	C27H32O16	611	0.3	70.00%	285,0394	C15H9O6	1.4	[M-H-glucosylrhamnoside] <sup>-</sup>	285,0394	C15H9O6	1.4	[M-H-glucosylrhamnoside] <sup>-</sup>
Dihydrokaempferol-glucoside_1	10	450	C21H22O11	449	0.7	97.40%	431,0980	C21H19O10	0.5	[M-H-H2O] <sup>-</sup>	191,0558	C7H11O6	1	
Kaempferol-acetyl-glucoside	11	490	C23H22O12	489	0.6	100.00%	285,0392	C15H9O6	0.7	[M-H-acetylhexoside] <sup>-</sup>	145,0294	C9H5O2	2.8	[M-H-acetylhexoside] <sup>-</sup>
Procyanidin B	11	578	C30H26O12	577	1.4	99.62%	331,0451	C16H11O8	0.9		271,0204	C14H7O6	3	[M-H-H2O-epicatechin] <sup>-</sup>
Feruloylquinatinate	11	368	C17H20O9	367	0.5	100%	349,0560	C16H13O9	0		191,0561	C7H11O6	2.6	[M-H-ferulate] <sup>-</sup>
Coumaroyl-fructosyl-diacetylglucoside_1	12	572	C25H32O15	571	0.7	99.90%				145,0292	C9H5O2	1.4		
Coumaroyl-fructosyl-diacetylglucoside_2	12	572	C25H32O15	571	0.7	75.60%				285,0394	C15H9O6	1.8	[coumarate-H-H2O] <sup>-</sup>	
Dihydrokaempferol-glucoside_2	12	450	C21H22O11	449	0.2	100%				287,0558	C15H11O6	0.7	[M-H-glucose] <sup>-</sup>	
Quercetin-rhamnosyl-glucoside_1	13	610	C27H30O16	609	1	99.80%				301,0341	C15H9O7	2.3	[M-H-rhamnoglucoside] <sup>-</sup>	
Isoferulic acid	13	194	C10H10O4	193	2.6									
Dicafeoylquinic acid_1	13	516	C25H24O12	515	1.2	99.80%	353,0873	C16H17O9	0	[M-H-cafeate] <sup>-</sup>	135,0449	C8H7O2	2.2	[cafeate-H-CH2O2] <sup>-</sup>
Dicafeoylquinic acid_2	13	516	C25H24O12	515	1	99.70%	191,0559	C7H11O6	1.6	[M-H-dicafeate] <sup>-</sup>	179,0349	C9H7O4	2.8	[cafeate-H] <sup>-</sup>
Dicafeoylquinic acid_3	13	516	C25H24O12	515	0.6	99.90%	353,0873	C16H17O9	0	[M-H-cafeate] <sup>-</sup>	135,0449	C8H7O2	2.2	[cafeate-H-CH2O2] <sup>-</sup>
Quercetin-rhamnosyl-glucoside_2	14	610	C27H30O16	609	0	79.20%	301,0346	C15H9O7	0.7	[M-H-rhamnoglucoside] <sup>-</sup>	179,0349	C9H7O4	2.8	[cafeate-H] <sup>-</sup>
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside_1	14	614	C27H34O16	613	0.2	49.80%				145,0294	C9H5O2	2.8	[coumarate-H-H2O] <sup>-</sup>	
Isorhamnetin-glucoside_1	14	478	C22H22O12	477	0.4	97.30%	117,0346	C8H5O	3.4		271,0239	C14H7O6	1.5	ref
Dicafeoylquinic acid_1	14	516	C25H24O12	515	0.8	99.80%	243,0296	C13H7O5	1.2		243,0296	C13H7O5	1.2	ref
Isorhamnetin-glucoside_2	15	478	C22H22O12	477	1.5	99.90%	271,025	C14H7O6	2.6		255,0301	C14H7O5	3.1	ref
Caffeoylcoumaroylquinic acid_1	14	500	C25H24O11	499	0.6	99.90%	243,0297	C13H7O5	1.2		227,0351	C13H7O4	3.1	ref
Caffeoylcoumaroylquinic acid_2	14	500	C25H24O11	499	0.2	75.20%	163,0395	C9H7O3	0	[coumarate] <sup>-</sup>	163,0395	C9H7O3	0	[coumarate] <sup>-</sup>
Caffeoylcoumaroylquinic acid_3	14	500	C25H24O11	499	0.4	99.10%	337,0925	C16H17O8	0.6	[M-H-cafeoyl] <sup>-</sup>	337,0925	C16H17O8	0.6	[M-H-cafeoyl] <sup>-</sup>
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside_2	14	614	C27H34O16	613	1	97.40%	191,0559	C7H11O6	1.6	[M-H-cafeoyl-coumaroyl] <sup>-</sup>	191,0559	C7H11O6	1.6	[M-H-cafeoyl-coumaroyl] <sup>-</sup>
Feruloyl fructosyl triacetylglucoside	14	644	C28H36O17	643	0.5	100.00%	679,1641	C28H36O14Cl	3.2	[M+Cl] <sup>-</sup>	145,0294	C9H5O2	3.4	[coumarate-H-H2O] <sup>-</sup>
Caffeoyl-feruloylquinic acid_1	14	530	C26H26O12	529	0.2	99.30%	117,0346	C8H5O	1.5		175,0401	C10H7O3	3.4	[ferulate-H-H2O] <sup>-</sup>
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	15	530	C26H26O12	529	0.9	99.80%	353,0872	C16H17O9	0.3	[M-H] <sup>-</sup>	353,0872	C16H17O9	0.3	[M-H-ferulate] <sup>-</sup>
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucose_3	14	614	C27H34O16	613	0.2	100%				145,029	C9H5O2	0	[coumarate-H-H2O] <sup>-</sup>	
Dicafeoylquinic acid_2	14	516	C25H24O12	515	0.8	99.90%	117,034	C8H5O	0		135,0449	C8H7O2	2.2	[cafeate-H-CH2O2] <sup>-</sup>
Quercetin-rhamnosyl-acetylglucoside	15	652	C29H32O17	651	1.8	99.90%	179,0349	C9H7O4	2.8	[cafeate-H] <sup>-</sup>	301,0341	C15H9O7	0.3	[M-H-rhamnosylacetylglucoside] <sup>-</sup>
Dicoumaroylquinic acid	15	484	C25H24O10	483	1.7	99.90%	271,0247	C14H7O6	1.5	[Quercetin+H] <sup>-</sup>	271,0247	C14H7O6	1.5	Quercetin fragment (ref)
Caffeoyl-prunasin	15	457	C23H23NO6	456	1.8		151,0036	C7H9O4	3.3	[Quercetin fragment (ref)] <sup>-</sup>	151,0036	C7H9O4	3.3	[Quercetin fragment (ref)] <sup>-</sup>

Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_1	15	656 :29H36017	655	1,7	100,00%		145,0296 117,0346	C9H5O2 C8H5O	4,1 5,1	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_2	15	656 :29H36017	655	2,3	99,90%		145,0296 117,0346	C9H5O2 C8H5O	4,1 5,1	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-acetylfructosyl-triacetylglucoside_1	15	656 :29H36017	655	1,7	99,90%		145,0296 117,0346	C9H5O2 C8H5O	4,1 4,3	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_3	16	656 :29H36017	655	1,7	100,00%		145,0296 117,0346	C9H5O2 C8H5O	4,1 5,1	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-acetylfructosyl-triacetylglucoside_2	16	656 :29H36017	655	1,4	100,00%		145,0296 117,0346	C9H5O2 C8H5O	4,1 3,4	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_4	16	656 :29H36017	655	0,9	100,00%		145,0296 117,0346	C9H5O2 C8H5O	3,4 4,3	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_5	16	656 :29H36017	655	1,2	99,90%		145,0296 117,0346	C9H5O2 C8H5O	3,4 3,4	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_1	16	698 :31H38018	697	1,7	99,80%		145,0295 117,0346	C9H5O2 C8H5O	3,4 5,1	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_2	16	698 :31H38018	697	1	99,20%		145,0292 117,0343	C9H5O2 C8H5O	1,4 2,6	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_3	17	698 :31H38018	697	1,4	95,80%		145,0293 117,034	C9H5O2 C8H5O	2,1 0	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_4	17	698 :31H38018	697	1,4	100,00%		145,0293 117,0343	C9H5O2 C8H5O	2,1 2,6	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_5	17	698 :31H38018	697	0,1	100,00%		145,0294 117,0344	C9H5O2 C8H5O	2,8 3,4	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-triacetylfructosyl-diacetylglucoside_1	17	698 :31H38018	697	0,3	99,90%		145,0294 117,0343	C9H5O2 C8H5O	2,8 2,6	[coumarate-H-H2O]- [coumarate-H-CH2O2]-
Coumaroyl-triacetylfructosyl-diacetylglucoside_2	17	698 :31H38018	697	0,3	99,60%					

Putative compound identity	RT (min)	MIM	Raw formula	ESI +				MS/MS (MSE) fragments	
				MS in source fragments				MS/MS (MSE) fragments	
				m/z	raw formula	recision (ppm)	Identity	m/z v formision (f	Identity
Cyanidin-glucoside	9,87	449,108	C21H21O11+	449,11 287,06	C21H21O11 C15H11O6	2,2 3,5	M+ [M-glucoside]+	287 5H11C 2,4 213 13H9O 2,3	[M-glucoside]+
Cyanidin-rhamnosyl-glucoside	10,28	595,166	C27H31O15+	595,17 287,06	C27H31O15 C15H11O6	0 1	M+ [M-rhamnosylglucoside]+	449 1H21O 0,4 287 15H11C 1	[M-rhamnoside]+ [M-rhamnosylglucoside]+
Quercetagetin-glucoside	10,91	480,127	C22H24O12	463,12 301,07	C22H23O11 C16H13O6	0,6 1,7	[M+H2O]+ [M+H2O-glucoside]+	301 16H13C 1,7	[M+H-glucoside]+
Dihydroquercetin-glucosyl rhamnoside	10,21	612,169	C27H32O16	635,16	C27H32O16Na	1,3	[M+Na]+	287 5H21C 1,4	[M+H-Glucosylrhamnoside]
Dihydrokaempferol-glucoside_1	10,46	450,116	C21H22O11	433,11 271,06	C21H21O10 C15H11O5	0 1,5	[M+H2O]+ [M+H-glucoside]+	271 5H11C 1,5	
Kaempferol-acetyl-glucoside	11,18	490,111	C23H22O12	491,12 287,06	C23H23O12 C15H11O6	0 1	[M+H]+ [M+H-acetylhexoside]+	287 5H21C 1	[M+H-acetylhexoside]+
Procyanidin B	11,26	578,142	C30H26O12						
Feruloylquininate	11,39	368,111	C17H20O9	177,06 391,1	C10H9O3 C17H20O9Na	1,7 0,3	[M+H-quininate]+ [M+Na]+	177 10H9O 1,7 145 9H5O2 2,1	[M+H-Feruloyl]+
Coumaroyl-fructosyl-diacetylglucoside_1	11,71	572,174	C25H32O15	595,16	C25H32O15Na	0,3	[M+Na]+	147 9H7O 2,7	
Coumaroyl-fructosyl-diacetylglucoside_2	12,46	572,174	C25H32O15	595,16 611,14 147,04 309,1	C25H32O15Na C25H32O15K C9H7O2 C15H17O7	0,3 0,2 2,7 1	[M+Na]+ [M+K]+ [coumarate+H-H2O]+ [M+H-diacetylglucoside]+	147 9H7O 2,7 119 8H7O 2,5	[coumarate+H-H2O]+ [coumarate+H-CH2O2]+
Dihydrokaempferol-glucoside_2	12,45	450,116	C21H22O11						
Quercetin-rhamnosyl-glucoside_1	12,74	610,153	C27H30O16	611,16 633,14 649,12 303,05	C27H30O16Na C27H30O16K C15H11O7	0,9 26% 0,5 2	[M+H]+ [M+Na]+ [M+K]+ [M+H-rhamnoglucoside]+	303 15H11C 0,3	[M+H-rhamnoglucoside]+
Isoferulic acid	13,18	194,058	C10H10O4	163,04	C9H7O3	1,8	[M+H-OCH3]+	163 9H7O3 1,8	[M+H-OCH3]+
Dicafeoylquinic acid_1	12,98	516,127	C25H24O12	499,12 539,12 555,09 163,04	C25H23O11 C25H24O12Na C25H24O12K C9H7O3	0,6 0,7 0 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [M+K]+ [caffeate+H-H2O]+	163 9H7O 2,5	[caffeate+H-H2O]+
Dicafeoylquinic acid_2	13,26	516,127	C25H24O12	499,12 539,12 555,09 163,04	C25H23O11 C25H24O12Na C25H24O12K C9H7O3	0,6 0,7 0 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [M+K]+ [caffeate+H-H2O]+	163 9H7O 2,5	[caffeate+H-H2O]+
Dicafeoylquinic acid_3	13,39	516,127	C25H24O12	499,12 539,12 555,09 163,04	C25H23O11 C25H24O12Na C25H24O12K C9H7O3	0,6 0,7 0 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [M+K]+ [caffeate+H-H2O]+	163 9H7O 2,5	[caffeate+H-H2O]+
Quercetin-rhamnosyl-glucoside_2	13,52	610,153	C27H30O16	611,16 649,12 633,14 303,05	C27H31O16 C27H30O16K C27H30O16Na C15H11O7	1 2,5 0,9 2	[M+K]+ [M+K]+ [M+Na]+ [M+H-rhamnoglucoside]+	303 5H11C 1,3	[M+H-rhamnoglucoside]+
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside_1	13,7	614,185	C27H34O16	637,17 653,15 597,18	C27H34O16Na C27H34O16K C27H33O15	0,3 0,8 0	[M+Na]+ [M+K]+ [M+H-H2O]+	147 9H7O 2	[coumarate+H-H2O]+
Isorhamnetin-glucoside_1	13,85	478,111	C22H22O12	479,12 317,07 501,1	C22H23O12 C18H13O7 C22H22O12Na	0 1,3 0,6	[M+H]+ [M+H-glucoside]+ [M+Na]+	317 16H13C 0	[M+H-glucoside]+
Dicafeoylquinic acid_1	13,94	516,127	C25H24O12	499,12 539,12 555,09 163,04	C25H23O11 C25H24O12Na C25H24O12K C9H7O3	0,6 0,7 0 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [M+K]+ [caffeate+H-H2O]+	163 9H7O3	
Isorhamnetin-glucoside_2	15,08	478,111	C22H22O12	479,12 317,07 501,1	C22H23O12 C18H13O7 C22H22O12Na	0,6 1,3 0,6	[M+H]+ [M+H-glucoside]+ [M+Na]+	317 16H13C 0,9	[M+H-glucoside]+
Caffeoylcoumaroylquinic acid_1	13,97	500,132	C25H24O11	483,13 523,12 119,05	C25H23O10 C25H24O11Na C8H7O	0,4 0,2 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [coumarate+H-CH2O2]+		
Caffeoylcoumaroylquinic acid_2	14,11	500,132	C25H24O11	483,13 523,12 119,05	C25H23O10 C25H24O11Na C8H7O	0,4 0,2 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [coumarate+H-CH2O2]+		
Caffeoylcoumaroylquinic acid_3	14,17	500,132	C25H24O11	483,13 523,12 119,05	C25H23O10 C25H24O11Na C8H7O	0,4 0,2 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [coumarate+H-CH2O2]+		
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside_2	14,24	614,185	C27H34O16	637,17 597,18	C27H34O16Na C27H33O15	0,6 1	[M+Na]+ [M+H-H2O]+	147 9H7O 2,4	[coumarate+H-H2O]+
Feruloyl fructosyl triacetylglucoside	14,24	644,195	C28H36O17	667,19 683,16	C28H36O17Na C28H36O17K	0,3 0,4	[M+Na]+ [M+K]+	177 10H9O 1,1	[ferulate+H-H2O]+
Caffeoyl-feruloylquinic acid_1	14,42	530,142	C26H26O12	513,14 553,13	C26H25O11 C26H26O12Na	0,2 0,7	[M+H-H2O]+ [M+Na]+	177 10H9O 1,1	[ferulate+H-H2O]+
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	14,51	530,142	C26H26O12	513,14 553,13	C26H25O11 C26H26O12Na	0,6 1,3	[M+H-H2O]+ [M+Na]+	177 10H9O 0	[ferulate+H-H2O]+
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside_3	14,45	614,185	C27H34O16	569,11 637,17	C26H26O12K C27H34O16Na	1,6 2,5	[M+K]+ [M+Na]+	147 9H7O 2	[coumarate+H-H2O]+
Dicafeoylquinic acid_2	14,46	516,127	C25H24O12	499,12 539,12 555,09 163,04	C25H23O11 C25H24O12Na C25H24O12K C9H7O3	0,6 0,7 0 2,5	[M+H-H2O]+ [M+Na]+ [M+K]+ [caffeate+H-H2O]+	163 9H7O 2,5	[caffeate+H-H2O]+
Quercetin-rhamnosyl-acetylglucoside	14,55	652,164	C29H32O17	675,16 291,13 303,05	C29H32O17Na C29H32O17K C15H11O7	0,4 1,6 2	[M+Na]+ [M+H]+ [M+H-rhamnosylacetylglucoside]+		
Dicoumaroylquinic acid	14,88	484,137	C25H24O10	467,13 147,05	C25H23O9 C9H7O2	0,6 4,1	[M+H-H2O]+ [coumarate+H-H2O]+	147 9H7O 2,7 119 8H7O 2,5	[coumarate+H-H2O]+ [coumarate+H-CH2O2]+
Caffeoyl-prunasin	14,96	457,137	C23H23N09	480,13 496,1 163,04	C23H23N09Na C23H23N09K C9H7O3	1,2 0,8 1,2	[M+Na]+ [M+K]+ [caffeate+H-H2O]+	163 9H7O3 1,2 147 9H7O2 0,7	[caffeate+H-H2O]+ [coumarate+H-H2O]+
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_1	15,14	656,195	C29H36O17	695,16 679,19 639,19 393,12 147,04 163,04	C29H36O17K C29H36O17Na C26H35O16 C19H21O9 C9H7O2 C9H7O3	0,4 0,9 3,1 1 0,7 0,6	[M+K]+ [M+Na]+ [M+H-H2O]+ [M+H-diacetylglucoside]+ [coumarate+H-H2O]+ [coumarate+H]+	147 9H7O 0,7 163 9H7O3 0,6	[coumarate+H-H2O]+ [coumarate+H]+

Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_2	15,21	656,195	C29H36O17	695,16 679,19 639,19 393,12 147,04 163,04	C29H36O17K C29H36O17Na C26H35O16 C19H21O9 C9H7O2 C9H7O3	1,3 0,1 1,4 0,8 2 1,2	[M+K] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+H-H2O] <sup>+</sup> [M+H-diacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 163 9H7O3 1,2 119 9H7O 3,4	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-acetylfructosyl-triacetylglucoside_1	15,4	656,195	C29H36O17	695,16 679,19 639,19 351,11 147,04 163,04	C29H36O17K C29H36O17Na C26H35O16 C17H19O8 C9H7O2 C9H7O3	0,4 0,3 0,6 0,9 2,7 1,2	[M+K] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+H-H2O] <sup>+</sup> [M+H-triacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 163 9H7O3 1,8 119 9H7O 3,4	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_3	15,53	656,195	C29H36O17	695,16 679,19 639,19 393,12 147,04 163,04	C29H36O17K C29H36O17Na C26H35O16 C19H21O9 C9H7O2 C9H7O3	0,7 0,1 0,6 0,3 2,7 1,8	[M+K] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+H-H2O] <sup>+</sup> [M+H-diacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 119 9H7O 2,5	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-acetylfructosyl-triacetylglucoside_2	15,56	656,195	C29H36O17	695,16 679,19 351,11 147,04	C29H36O17K C29H36O17Na C17H19O8 C9H7O2	0,3 0,3 1,1 2,7	[M+K] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+H-triacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 119 9H7O 2,5	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_4	15,69	656,195	C29H36O17	695,16 679,19 639,19 393,12 147,04	C29H36O17K C29H36O17Na C26H35O16 C19H21O9 C9H7O2	0,4 0,7 0,2 0,8 2,7	[M+K] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+H-H2O] <sup>+</sup> [M+H-diacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2,7 119 9H7O 2,5	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-diacetylglucoside_5	15,82	656,195	C29H36O17	695,16 679,19 639,19 393,12 147,04	C29H36O17K C29H36O17Na C26H35O16 C19H21O9 C9H7O2	0,6 0 0,2 0,3 2	[M+K] <sup>+</sup> [M+Na] <sup>+</sup> [M+H-H2O] <sup>+</sup> [M+H-diacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 119 9H7O 2,5	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_1	16,19	698,206	C31H38O18	721,19 737,17 393,12 147,04	C31H38O18Na C31H38O18K C19H21O9 C9H7O2	1,2 1,6 0 2	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H-triacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 0,7 119 9H7O 2,5	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_2	16,43	698,206	C31H38O18	721,2 737,17 393,12 147,04	C31H38O18Na C31H38O18K C19H21O9 C9H7O2	0,4 0,3 0,3 1,4	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H-triacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 119 9H7O 3,4	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_3	16,61	698,206	C31H38O18	721,2 737,17 393,12 147,04	C31H38O18Na C31H38O18K C19H21O9 C9H7O2	0,6 1,2 0,3 2	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H-triacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 1,2 119 9H7O 1,7	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_4	16,72	698,206	C31H38O18	721,2 737,17 393,12 147,04	C31H38O18Na C31H38O18K C19H21O9 C9H7O2	0,7 1,1 0,3 1,4	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H-triacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 119 9H7O 2,5	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triacetylglucoside_5	16,75	698,206	C31H38O18	721,2 737,17 393,12 147,04	C31H38O18Na C31H38O18K C19H21O9 C9H7O2	0,4 0,9 0 1,4	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H-triacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 2 119 9H7O 2,5	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-triacetylfructosyl-diacetylglucoside_1	16,96	698,206	C31H38O18	721,19 737,17 435,13 147,04	C31H38O18Na C31H38O18K C21H23O10 C9H7O2	1,7 2 1,4 0,7	[M+Na] <sup>+</sup> [M+K] <sup>+</sup> [M+H-diacetylglucoside] <sup>+</sup> [coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>	147 9H7O2 0 119 9H7O 0,8	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>
Coumaroyl-triacetylfructosyl-diacetylglucoside_2	17,04	698,206	C31H38O18	721,19 119,05	C31H38O18Na C8H7O	1,1 0,8	[M+Na] <sup>+</sup> [coumarate+H-CH2O2] <sup>+</sup>	147 9H7O2 0,7	[coumarate+H-H2O] <sup>+</sup>

**Annexe 3. Compounds identified by UPLC-DAD-ESI-TQMS.** Identification levels: [1] confirmed structure by comparison with authentic standard; [2], probable structure by comparison with data bases and/or literature; [3], MS2 spectrum interpretation. RT, Retention Time.

Compound identity	RT (min)	$\lambda$ (nm)	Molecular formula	Ionization mode	Parent adducts	MRM transition (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)	Identification level
<b>Anthocyanins</b>									
Cyanidin-3-O-glucoside	9,97	220 ; 279; 512	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> +	positive	[M+H] <sup>+</sup>	449.1>287.1	25	30	[1]
U_Anthocyanin	10,53	218; 276; 499	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> +	positive	-	433.1>271.1	40	20	[3]
<b>Flavanols</b>									
Epicatechin	10,38	221	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	289>122.58	40	35	[1]
Catechin	8,66	220; 276	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	289.04>122.58	50	35	[1]
<b>Flavones and derivatives</b>									
Naringenin-7-O-glucoside	13,49	219; 327	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	432.9>270.8	20	20	[1]
Luteolin-4-O-glucoside	13,67	219; 347	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	447.15>284.95	40	21	[1]
<b>Flavonols and derivatives</b>									
Quercetin-3-O-galactoside	12,93	219; 315	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	463.25>300	60	28	[1]
Quercetin-3-O-rhamnoside	13,73	265; 346	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	446.92>300.8	50	20	[1]
Quercetin-rutinoside_1	12,79	220; 324	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	609.24>299.95	20	28	[1]
Kaempferol-3-O-glucoside	13,67	265; 346	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	446.9>254.8	60	40	[1]
Kaempferol-3-O-galactoside	13,43	266; 345	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	446.91>283.8	60	30	[1]
Kaempferol-3-O-rutinoside	13,41	265; 349	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	593.4>284.9	20	28	[1]
Isorhamnetin-3-O-rutinoside	13,65	220; 283; 347	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	622.9>314.8	60	30	[1]
Isorhamnetin-3-O-glucoside	13,9	221; 346	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	476.9>313.8	60	30	[1]
<b>Hydroxycinnamic acids and derivatives</b>									
Chlorogenic acid	9,12	325	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	353.14>190.79	10	14	[1]
Cryptochlorogenic acid	8,89	325	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	353.09>172.7	60	14	[1]
Neochlorogenic acid	6,02	324	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	353.14>178.12	40	21	[1]
3,4-Dicaffeoylquinic acid	13,31	325	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	514.7>352.8	40	20	[1]
3,5-Dicaffeoylquinic acid	13,47	327	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	515.31>190.78	30	28	[1]
4,5-Dicaffeoylquinic acid	14	324	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	515>172.8	30	36	[1]
Coumaroylquinic acid	10,07	281; 311; 512	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	337>172.9	40	20	[2]
Dicoumaroylquinic acid	14,94	313	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	483>162.9	10	30	[2]
Coumaroyl-hydroxyferuloylquinic acid	10,56	281; 515.4	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	negative	[M-hydroxyferuloyl] <sup>-</sup>	337>191	10	20	[2]
Feruloylquinic acid	11,47	325	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	367>190.9	25	20	[2]
<b>Amino acids</b>									
Asparagine	1,44	-	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	303.3>171.2	30	32	[1]
Serine	1,88	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	276.2>171.2	34	18	[1]
Glutamine	2,04	-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	317.1>171.2	29	24	[1]
Glutamic acid	3,07	-	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	positive	[M+H+170] <sup>+</sup>	318.2>171.2	42	24	[1]
Arginine	1,8	-	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	345.1>175.3	34	16	[1]
Glycine	2,06	-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	246.3>171.2	31	16	[1]
Aspartic acid	2,51	-	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	positive	[M+H+170] <sup>+</sup>	304.1>171.2	33	24	[1]
Citrullin	3,11	-	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	346.3>171.2	32	32	[1]
Alanine	4,06	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	260.2>171.2	28	24	[1]
Beta-alanine	2,83	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	260.0>171.0	29	24	[2]
Threonine	3,53	-	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	290.2>171.2	32	24	[1]
Gamma-aminobutyric acid (GABA)	4,36	-	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	274.2>171.2	34	24	[1]
Beta-aminoisobutyric acid (BAIBA)	5,11	-	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	274.2>171.2	34	24	[1]
Alpha-aminobutyric acid (AABA)	6,17	-	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	274.3>171.2	30	24	[1]
Proline	5,27	-	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	286.3>171.2	34	24	[1]
Hydroxyproline	1,15	-	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	302.1>171.2	32	40	[2]
Hydroxylysine	6,14	-	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	503.2>171.2	40	32	[2]
Lysine	6,87	-	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	positive	[M+H+170+170] <sup>+</sup>	487.2>171.2	40	35	[1]
Ornithine	6,56	-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	positive	[M+H+170+170] <sup>+</sup>	473.2>171.2	38	26	[1]
Tyrosine	6,9	-	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	352.3>171.2	36	34	[1]
Methionine	6,96	-	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	positive	[M+171] <sup>+</sup>	320.2>171.2	38	24	[1]
Valine	7,11	-	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	288.3>171.2	35	26	[1]
Isoleucine	7,78	-	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	302.3>171.2	34	24	[1]
Leucine	7,85	-	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	302.3>171.2	34	24	[1]
Phenylalanine	7,94	-	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	336.2>171.2	40	24	[1]
Tryptophan	8,04	-	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	375.2>171.2	40	28	[1]
Histidine	1,11	-	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	326.1>110.1	27	35	[1]
L-1-Methylhistidine	1,43	-	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	340.1>170.0	21	24	[1]
L-3-Methylhistidine	1,43	-	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	340.1>170.0	21	24	[1]
Aminoadipic acid	5,02	-	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	332.0>171.0	21	24	[1]
<b>Polyamines</b>									
Sarcosine	3,16	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	positive	[M+171] <sup>+</sup>	260.0>171.0	29	24	[2]
Spermidine	7,47	-	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	positive	[M-2H+CH <sub>3</sub> +170] <sup>+</sup>	328.8>171.1	28	20	[1]
Putrescine	6,9	-	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	positive	[M-H+170+170] <sup>+</sup>	429.2>171.1	32	36	[1]
Cystathionine	6,61	-	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	positive	[M-H+170+170] <sup>+</sup>	563.1>171.0	29	36	[1]
<b>Others</b>									
Ammonium	0,9	-	NH <sub>4</sub> Cl	positive	[M+170] <sup>+</sup>	187.98>171	29	24	[2]
Ethanolamine	2,16	-	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO	positive	[M+170] <sup>+</sup>	232.2>171.2	32	24	[2]
<b>Phytohormones (kinetics 0 hpi, 12 hpi, 24 hpi, 48 hpi)</b>									
Abscisic acid (ABA)	4,37	-	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	positive	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	247>135	30	24	[1]
				positive	[M+H] <sup>+</sup>	265>135	30	24	
Jasmonic acid (JA)	4,86	-	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	positive	[M+H] <sup>+</sup>	211.1>133	30	16	[1]
Jasmonoyl-isoleucine (JA-ile)	5,52	-	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	positive	[M+H] <sup>+</sup>	324.2>151.1	20	16	[2]
12-Oxophytodienoic acid (OPDA)	6,27	-	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	positive	[M+H] <sup>+</sup>	293.2>54.9	30	32	[2]
				positive	[M+H] <sup>+</sup>	293.2>81.1	30	24	
Indole-3-acetic acid (IAA)	3,87	-	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	positive	[M+H] <sup>+</sup>	176.1>130	20	16	[1]
Salicylic acid glucoside (SAG)	1,4	-	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	negative	[M-H] <sup>-</sup>	299>137	48	18	[2]
Salicylic acid (SA)	3,4	-	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	negative	[M+H] <sup>-</sup>	136.9>65	20	24	[1]

**Annexe 4. Symptoms on susceptible and resistant peach genotypes after infestation by *M. persicae*.**  
A. Curled leaves of the susceptible GF305 96 hpi, B. Wilting leaves on resistant Rubira seedlings 48 hpi.  
C. Leaves folded upwards on Rubira 48 hpi. D. High contrast picture of Rubira leaf 48 hpi showing necrotic lesions (clear spots).

A.



D.



B.



C.



**Annexe 5. Selection of DEGs between uninfested genotypes.** Significant variations (p.adj) were determined using the DeSEQ2 package (R) at the threshold  $\alpha = 0.05$ .

ID_Prunus	ID_Arabidopsis	% identity	Ortholog	LFC (RC/GC)	p.adj	Anotation_Arabidopsis
<b>Flavonoid/anthocyanidin metabolism</b>						
Prupe_6G175900	AT1G66370	59,589	No	12,3	1,4E-24	MYB113; Transcription factor
Prupe_5G086700	AT4G22880	79,9	Yes	2,2	1,5E-04	LDOX; Leucoanthocyanidin dioxygenase
Prupe_2G324700	AT5G17050	53,2	Yes	6,7	5,1E-65	UGT78D2; Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase
Prupe_3G013600	AT5G17220	56,8	Yes	8,1	2,3E-200	GSTF12; Glutathione S-transferase F12

**Annexe 6. All DEGs in the susceptible genotype GF305 after *M. persicae* infestation compared to uninfested plants. Significant variations (p.adj) were determined using the DeSEQ2 package (R) at the threshold  $\alpha = 0.05$ . A : total number of *P. persica* homologs ; B : number of homologs also differentially expressed in Rubira after infestation ; C : Number of homologs not expressed or not differentially expressed in the whole dataset.**

ID_Prunus	ID_Arabidopsis	% identity	Ortholog	LCF (GJ/GC)	p.adj	Anotation_Arabidopsis	A	B	C
<b>Defense-related genes</b>									
Prupe_5G025300	AT3G07040	32,5	No	-6,1	3,0E-03	Disease resistance protein RPM1	55	15	37
Prupe_4G155100	AT1G17020	61,64	Yes	2,0	7,9E-03	SRG1; Senescence related gene 1	5	3	2
Prupe_7G265200	AT1G16030	86,23	Yes	2,0	4,9E-02	Heat shock 70 kDa protein 5	1		
<b>Brassinosteroid-related genes</b>									
Prupe_1G520800	AT4G08950	68,2	No	2,7	3,4E-03	Protein EXORDIUM	4	2	
Prupe_7G268600	AT5G16990	70,52	No	3,0	1,7E-07	AER, NADP-dependent alkenal double bond reductase P2	5	3	
Prupe_7G268900	AT5G16990	65,23	No	4,7	7,0E-03	AER, NADP-dependent alkenal double bond reductase P2	4	2	
Prupe_5G129900	AT2G46660	69,9	No	4,6	7,5E-17	EOD3, Cytochrome P450 78A6	1		
Prupe_5G222200	AT1G73830	60,2	Yes	5,7	7,6E-03	Transcription factor BEE3	2	1	
Prupe_4G214900	AT4G21970	43,7	Yes	3,0	1,3E-02	Uncharacterized protein	1	1	
Prupe_2G138500	AT3G60650	30	Yes	3,5	7,8E-03	Uncharacterized protein	1		
<b>Auxin- &amp; Ethylene-related genes</b>									
Prupe_7G192600	AT5G20820	58,5	Yes	4,4	1,1E-07	Auxin-responsive protein SAUR76	1		
Prupe_3G214400	AT2G32530	49,3	No	2,7	1,0E-07	Cellulose synthase-like protein B3	1	1	
Prupe_7G194400	AT1G19210	54,5	Yes	4,5	9,2E-03	Ethylene-responsive transcription factor ERF017	1	1	
Prupe_1G500900	AT1G21910	47,7	Yes	3,7	6,1E-03	Ethylene-responsive transcription factor ERF012	1		
Prupe_6G222600	AT2G23060	71,5	Yes	3,4	5,2E-03	Probable N-acetyltransferase HLS1-like	2	2	
Prupe_7G205200	AT4G29780	59	Yes	2,9	9,1E-04	Uncharacterized protein	1		
Prupe_4G193800	AT4G27280	68,7	Yes	2,9	1,0E-02	KRP1/CM1; Ca <sup>2+</sup> -dependent modulator of ICR1	4	3	
Prupe_2G138500	AT3G60650	30	Yes	3,5	7,8E-03	RGF10; Root meristem growth factor 10	1		
<b>Water stress and ABA-related genes</b>									
Prupe_8G213800	AT1G15520	69	No	2,2	1,6E-05	PDR12; ABC transporter G family member 40	12	3	9
Prupe_8G214100	AT1G15520	67,3	No	2,8	3,0E-07	PDR12; ABC transporter G family member 40	1		
Prupe_7G124100	AT2G36780	53,5	No	2,3	7,9E-03	UDP-glycosyltransferase 73C3	3	1	2
Prupe_2G289500	AT5G51990	63,35	Yes	6,2	8,0E-03	Dehydration-responsive element-binding protein 1D	2	2	
Prupe_6G054100	AT2G30070	71,5	Yes	2,2	2,8E-05	KUP1; Potassium transporter 1	2	2	
<b>Other genes</b>									
Prupe_1G244700	AT1G59960	57,5	No	4,3	7,0E-03	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	4	4	
Prupe_8G268800	AT1G02700	43,9	Yes	2,5	1,1E-02	GATA transcription factor-like protein	1		
Prupe_6G139200	AT5G22250	74,9	Yes	2,6	2,8E-05	Probable CCR4-associated factor 1 homolog 11	2	1	
Prupe_8G066100	AT5G64310	41,26	No	2,8	2,6E-02	Classical arabinogalactan protein 1	4	4	
Prupe_3G164200	AT5G37490	48,8	Yes	3,6	2,3E-02	U-box domain-containing protein 21	2	2	
Prupe_1G348300	AT5G23210	68,5	Yes	2,4	2,8E-03	Serine carboxypeptidase-like 34	1		
Prupe_3G276500	AT3G28340	71,8	Yes	2,8	1,2E-02	Probable galacturonosyltransferase-like 10	1		
Prupe_6G053400	AT2G30090	53,3	Yes	2,9	1,8E-02	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	1		
Prupe_7G089000	AT5G06570	55,2	Yes	2,0	3,4E-03	Probable carboxylesterase 15	2	1	
Prupe_5G116400	AT4G27250	35	No	2,2	3,7E-02	Epimerase domain-containing protein	1		
Prupe_1G486000	AT5G11070	43,75	No	3,2	1,4E-02	Uncharacterized protein	1	1	
Prupe_1G321600	AT3G03280	37,6	No	2,6	2,2E-02	PA DRE protein up-regulated after infection by <i>S. sclerotiorum</i>	2	2	
Prupe_8G098600	AT1G49310	37,5	No	2,9	6,6E-03	Uncharacterized protein	3	1	

**Annexe 7. Selection of DEGs in the resistant genotype Rubira after *M. persicae* infestation, cited in the text and figures.** Significant variations (p.adj) were determined using the DeSEQ2 package (R) at the threshold  $\alpha = 0.05$ .

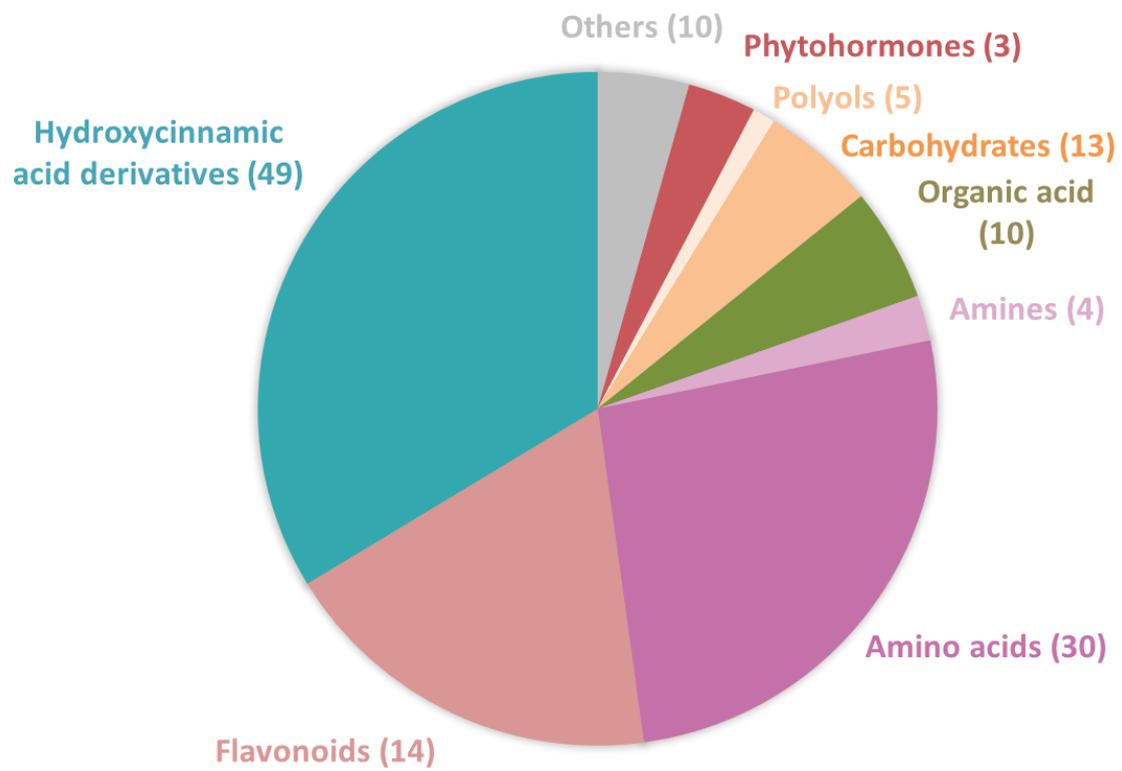
ID_Prunus	ID_Arabidopsis	% identity	Ortholog	LFC (R/RC)	p.adj	Anotation_Arabidopsis
<b>Ribosomal proteins</b>						
Prupe_7G102700	AT3G52580	91	Yes	-1,4	4,5E-02	RPS14C, 40S ribosomal protein S14-3
Prupe_6G300200	AT3G54210	73	Yes	-1,6	3,2E-06	RPL17; 50S ribosomal protein L17
Prupe_6G236800	AT2G37190	89	Yes	-1,4	8,9E-03	RPL12A; 60S ribosomal protein L12-1
Prupe_7G241400	AT5G20160	92	Yes	-1,5	3,2E-04	Ribonucleoprotein
<b>Autophagy</b>						
Prupe_2G200500	AT3G61960	52,206	Yes	1,3	4,8E-02	ATG1A; Autophagy-related protein 1a
Prupe_4G019800	AT1G62040	82,906	No	2,7	1,8E-14	ATG8C; Autophagy-related protein 8c
Prupe_4G215300	AT1G62040	91,453	Yes	1,6	6,7E-04	ATG8C; Autophagy-related protein 8c
Prupe_5G072400	AT4G16520	90,909	Yes	2,4	1,6E-14	ATG8F; Autophagy-related protein 8f
Prupe_1G107100	AT3G15580	76,522	Yes	2,0	2,8E-09	ATG8I; Autophagy-related protein 8i
Prupe_3G004300	AT3G15581	73,684	No	2,8	7,5E-05	ATG8I; Autophagy-related protein 8i
Prupe_1G102400	AT4G30790	66,638	Yes	1,6	1,2E-03	ATG11; Autophagy-related protein 11
Prupe_6G164000	AT3G18770	55,943	Yes	1,4	1,1E-02	ATG13B; Autophagy-related protein 13b
Prupe_4G201900	AT5G54730	45,714	Yes	2,4	1,3E-23	ATG18F; Autophagy-related protein 18f
Prupe_5G165900	AT4G24690	50,538	No	2,5	2,4E-05	NBR1; Neighbor of BRCA1
Prupe_8G193300	AT3G07370	66,545	Yes	1,4	2,3E-02	CHIP; Carboxyl terminus of HSC70-interacting protein
Prupe_7G106600	AT3G12580	61,047	No	6,8	5,6E-06	HSP70-4; Heat shock 70 kDa protein 4
<b>Receptor-like kinases and associated Serine/threonine-protein kinases</b>						
Prupe_4G029800	AT5G15730	46	No	8,3	2,3E-10	CRLK2; Calcium/calmodulin-regulated receptor-like kinase 2
Prupe_1G542300	AT1G09970	64	Yes	5,2	5,3E-116	RLK7; Receptor like protein kinase 7
Prupe_5G001000	AT2G33580	47	Yes	4,8	1,1E-15	LYK5; LysM-containing receptor-like kinase 5
Prupe_7G147500	AT2G33580	36	No	5,6	2,3E-03	LYK5; LysM-containing receptor-like kinase 5
Prupe_3G213100	AT3G21630	57	Yes	1,9	1,1E-08	CERK1; Chitin elicitor receptor kinase 1
Prupe_1G558900	AT4G33430	74	Yes	2,0	4,1E-15	BAK1; Brassinoid insensitive 1-associated receptor kinase 1
Prupe_8G115900	AT4G33950	87	Yes	1,3	9,1E-03	OST1; Open stomata 1
Prupe_1G437500	AT5G42750	48	Yes	1,8	2,3E-03	BK1; BR1 kinase inhibitor 1
Prupe_5G041700	AT5G46570	84	Yes	-1,7	6,9E-04	BSK2; Brassinosteroid-signaling kinase 2
Prupe_2G048900	AT5G46330	35	No	6,8	8,7E-15	FLS2; Flagellin sensitive 2
Prupe_4G076500	AT5G46330	54	Yes	2,3	3,1E-10	FLS2; Flagellin sensitive 2
Prupe_5G170700	AT5G46330	47	No	3,2	7,8E-09	FLS2; Flagellin sensitive 2
Prupe_3G099500	AT3G57750	40	No	8,7	3,4E-12	ZED1; HOPZ-ETI-deficient 1
Prupe_8G149300	AT3G57750	44	No	3,5	1,1E-14	ZED1; HOPZ-ETI-deficient 1
Prupe_8G149500	AT3G57750	50	No	7,6	1,6E-08	ZED1; HOPZ-ETI-deficient 1
Prupe_3G099400	AT3G57710	35	No	3,2	1,0E-09	RKS1; Resistance related kinase 1
Prupe_8G149400	AT3G57710	42	Yes	6,5	6,9E-53	RKS1; Resistance related kinase 1
Prupe_8G149700	AT3G57710	41	No	2,8	3,7E-07	RKS1; Resistance related kinase 1
Prupe_1G270700	AT1G14370	74	Yes	1,6	1,5E-05	PBL2; PBS1-like protein 2
<b>Wall-associated kinases</b>						
Prupe_7G154100	AT1G17910	37	No	2,1	1,5E-08	WAKL13; Putative wall-associated receptor kinase-like 13
Prupe_1G442500	AT1G21270	46	No	6,1	1,6E-09	WAK2; Wall-associated receptor kinase 2
Prupe_4G093300	AT1G21270	46	Yes	7,9	1,3E-07	WAK2; Wall-associated receptor kinase 2
Prupe_4G215700	AT1G21270	33	No	9,0	4,7E-12	WAK2; Wall-associated receptor kinase 2
Prupe_2G325000	AT1G21210	40	No	3,4	2,2E-04	WAK4; Wall-associated receptor kinase 4
Prupe_1G205100	AT1G21230	49	No	9,8	1,6E-14	WAK5; Wall-associated receptor kinase 5
Prupe_5G171500	AT5G50290	64	Yes	-1,8	2,3E-03	Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding protein
Prupe_1G386400	AT2G23450	51	No	2,1	1,2E-07	WAKL14; Wall-associated receptor kinase-like 14
Prupe_7G145100	AT2G23450	55	Yes	2,0	7,3E-12	WAKL14; Wall-associated receptor kinase-like 14
Prupe_3G181200	AT1G16120	46	No	6,5	4,4E-52	WAKL1; Wall-associated receptor kinase-like 1
Prupe_2G240400	AT5G02070	55	No	4,4	3,3E-16	WAKL20; Wall-associated receptor kinase-like 20
Prupe_6G357200	AT1G16130	55	No	8,8	1,7E-04	WAKL2; Wall-associated receptor kinase-like 2
Prupe_1G188400	AT1G16260	47	Yes	5,7	1,9E-02	WAKL8; Wall-associated receptor kinase-like 8
Prupe_2G139700	AT1G16260	48	No	5,0	9,5E-03	WAKL8; Wall-associated receptor kinase-like 8
Prupe_3G181800	AT1G69730	44	No	4,3	1,2E-04	WAKL9; Wall-associated receptor kinase-like 9
<b>Nucleotide binding leucine-rich repeat domain proteins and associated helpers and transcription factors</b>						
Prupe_5G025300	AT3G07040	32,5	No	12,1	3,0E-02	Disease resistance protein RPM1
Prupe_1G389500	AT4G33300	55	Yes	3,5	2,5E-41	ADR1-LIKE 1; Activated disease resistance 1 like 1
Prupe_8G199800	AT3G25070	43	Yes	1,9	5,5E-10	RIN4; RPM1-interacting protein 4
Prupe_1G402700	AT2G05940	67	No	5,9	1,4E-03	RIPK; RPM1-induced protein kinase
Prupe_7G198400	AT2G05940	72	Yes	3,5	1,4E-25	RIPK; RPM1-induced protein kinase
Prupe_7G138600	AT5G66900	38	No	4,4	2,0E-57	NRG1; N requirement gene 1; Probable disease resistance protein
Prupe_7G138700	AT5G66900	43	No	2,3	2,0E-04	NRG1; N requirement gene 1; Probable disease resistance protein
Prupe_7G138900	AT5G66900	40	No	7,4	7,3E-40	NRG1; N requirement gene 1; Probable disease resistance protein
Prupe_7G139500	AT5G66900	42	Yes	3,8	5,4E-19	NRG1; N requirement gene 1; Probable disease resistance protein
Prupe_7G139600	AT5G66900	42	No	1,5	3,1E-02	NRG1; N requirement gene 1; Probable disease resistance protein
Prupe_7G139700	AT5G66900	36	No	5,0	1,5E-04	NRG1; N requirement gene 1; Probable disease resistance protein
Prupe_7G139800	AT5G66900	41	No	1,8	1,2E-03	NRG1; N requirement gene 1; Probable disease resistance protein
Prupe_2G019500	AT3G52430	27	No	3,8	5,9E-52	SAG101; Senescence associated gene 101
Prupe_3G279300	AT3G52430	25	Yes	2,3	1,3E-22	SAG101; Senescence associated gene 101
Prupe_3G279000	AT3G52430	26	No	3,6	5,7E-45	PAD4; Lipase-like PAD4
Prupe_4G276500	AT3G52430	38	Yes	5,9	1,4E-46	PAD4; PHYTOALEXIN DEFICIENT 4
Prupe_5G180900	AT3G48090	39	No	2,8	3,5E-30	EDS1; Enhanced disease susceptibility 1
Prupe_5G181000	AT3G48090	40	Yes	3,9	1,4E-47	EDS1; Enhanced disease susceptibility 1
Prupe_5G22360	AT1G73805	52	Yes	8,6	1,3E-88	SARD1; Protein SAR DEFICIENT 1
Prupe_6G315700	AT5G57580	37	No	3,4	2,6E-23	CBP60B; Calmodulin-binding protein 60 B
Prupe_4G036400	AT5G57580	62	No	1,5	1,9E-05	CBP60B; Calmodulin-binding protein 60 B
Prupe_7G160100	AT3G50950	61	Yes	5,6	4,9E-59	ZAR1; HOPZ-activated resistance 1

Lectin-domain containing receptor kinase						
Prupe_6G260000	AT2G37710	67	Yes	6,9	5,54E-25	LECRK41; L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1
Prupe_8G022700	AT5G42120	54	Yes	5,4	1,5E-04	LECRK56; L-type lectin-domain containing receptor kinase S.6
Prupe_6G282700	AT5G01550	53	Yes	7,6	6,1E-09	LECRK63; Lectin-domain containing receptor kinase VI.3
Prupe_7G258800	AT3G16030	56	No	6,0	5,6E-06	CES101; G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase CES101
Prupe_4G033000	AT1G61500	51	Yes	7,3	3,3E-17	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase
MAP kinases						
Prupe_1G564100	AT4G08500	69	No	1,3	4,3E-02	MEKK1; Mitogen-activated protein kinase kinase 1
Prupe_2G175200	AT4G01370	88	Yes	1,6	8,0E-07	MPK4; Mitogen-activated protein kinase 4
Prupe_6G091700	AT3G45640	86	Yes	3,4	8,0E-42	MPK3; Mitogen-activated protein kinase 3
Prupe_1G325700	AT1G73670	66	No	1,4	4,0E-02	MPK15; Mitogen-activated protein kinase 15
Prupe_5G236900	AT1G73500	66	No	3,8	2,0E-27	MEKK9; Mitogen-activated protein kinase kinase 9
Prupe_4G270800	AT1G53570	60	Yes	1,5	6,1E-06	MAPKKK3; Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
Prupe_1G389800	AT5G66850	57	No	4,0	1,3E-42	MAPKKK5; Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
Prupe_3G099000	AT5G67080	38	No	2,2	1,9E-04	MAPKKK19; Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19
Hypersensitive response						
Prupe_1G203300	AT4G28460	47	No	9,1	3,0E-11	PIP1; PAMP-induced secreted peptide 1
Prupe_6G228500	AT4G37290	40	Yes	9,2	2,4E-11	PIP2; PAMP-induced secreted peptide 2
Prupe_7G171200	AT4G35000	79	Yes	1,5	7,1E-05	APX3; Ascorbate peroxidase 3
Prupe_5G011300	AT4G35090	89	Yes	2,0	1,3E-06	CAT2; Catalase 2
Prupe_5G170000	AT4G23810	45	Yes	3,1	7,2E-12	WRKY53; Transcription factor WRKY53
Prupe_5G107400	AT1G64060	77	Yes	2,3	4,1E-12	RBOHF; Respiratory burst oxidase homolog protein F
Prupe_7G090800	AT3G10660	68	No	4,8	1,2E-21	CPK2; Calcium-dependent protein kinase 2
Prupe_7G064300	AT5G19450	79	No	2,3	1,7E-17	CPK8; Calcium-dependent protein kinase 8
Prupe_4G213800	AT3G20410	75	Yes	1,8	4,8E-08	CPK9; Calcium-dependent protein kinase 9
Prupe_4G233300	AT5G23580	44	No	5,5	1,6E-02	CPK12; Calcium-dependent protein kinase 12
Prupe_1G412900	AT4G33000	72	Yes	1,5	2,3E-02	CBL10; Calcineurin B-like protein 10
Prupe_5G122100	AT4G26570	60	No	-2,7	6,4E-04	CBL3; Calcineurin B-like protein 3
Prupe_2G188700	AT5G24270	63,5	No	3,3	2,4E-03	CBL4; Calcineurin B-like protein 4
Prupe_1G392900	AT5G25110	71	Yes	1,9	1,7E-05	CIPK25; CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 25
Prupe_2G195900	AT1G01140	76	Yes	1,8	1,0E-07	CIPK9; CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 9
Prupe_5G186400	AT5G62740	65	Yes	2,6	6,63E-13	HIR1; HYPERSENSITIVE INDUCED REACTION 1
Prupe_1G268100	AT1G69840	93	Yes	1,7	2,69E-06	HIR2; HYPERSENSITIVE INDUCED REACTION 2
Prupe_2G281600	AT5G51570	87	Yes	1,4	6,33E-04	HIR4; HYPERSENSITIVE INDUCED REACTION 4
Prupe_7G158900	AT3G50930	65	Yes	2,6	1,26E-16	HSR4; HYPER-SENSITIVITY-RELATED 4
Prupe_7G097100	AT3G11660	62	Yes	1,5	4,54E-03	NHL1; NDR1/HIN1-LIKE 1
Prupe_4G051500	AT1G28380	64	Yes	2,0	2,73E-13	NLS1; NECROTIC SPOTTED LESIONS 1
Prupe_1G141000	AT5G18650	82	Yes	2,4	1,01E-11	MEL1; MYB30-INTERACTING E3 LIGASE 1
Nitric oxide						
Prupe_1G505400	AT1G77760	78	Yes	2,4	4,6E-02	NR1; Nitrate reductase 1
Systemic acquired resistance / Salicylic acid / Piceolic acid						
Prupe_4G055900	AT4G18470	47	Yes	-2,2	9,76E-07	SNI1; SUPPRESSOR OF NPR1-1
Prupe_8G153800	AT2G14610	64	Yes	8,2	1,0E-80	PR-1; Pathogenesis related protein 1
Prupe_8G153100	AT2G14580	65	No	6,8	2,8E-05	PR-1; Pathogenesis related protein 1
Prupe_8G153500	AT2G14580	65	No	4,8	1,6E-02	PR-1; Pathogenesis related protein 1
Prupe_8G153700	AT2G14580	65	Yes	7,3	1,4E-07	PR-1; Pathogenesis related protein 1
Prupe_7G050700	AT1G75040	55	No	9,0	1,2E-21	PR-5; Pathogenesis related protein 5
Prupe_7G050900	AT1G75040	50	No	7,9	2,5E-54	PR-5; Pathogenesis related protein 5
Prupe_7G051300	AT1G75040	50	No	11,1	2,1E-28	PR-5; Pathogenesis related protein 5
Prupe_7G051500	AT1G75040	52	No	6,9	1,1E-05	PR-5; Pathogenesis related protein 5
Prupe_1G328500	AT1G70840	40	No	3,0	7,4E-03	MLP31; Major latex protein 31 (PR-10 protein)
Prupe_1G128700	AT1G24020	37	No	5,1	4,0E-37	ML423; Major latex protein 423 (PR-10 protein)
Prupe_7G267900	AT2G43820	55	Yes	3,5	7,16E-24	SGT1; Salicylic acid glucosyltransferase 1
Prupe_7G142200	AT2G23620	60	Yes	-1,9	6,67E-05	MES1; METHYL ESTERASE 1
Prupe_6G168500	AT4G39460	80	Yes	-1,7	1,35E-08	SAMT1; S-ADENOSYLMETHIONINE TRANSPORTER 1
Prupe_4G107800	AT5G45110	62	No	1,6	2,66E-07	NPR3; NPR1-LIKE PROTEIN 3
Prupe_7G037900	AT3G12250	77	No	1,8	8,70E-13	TGA6; TGACG MOTIF-BINDING FACTOR 6
Prupe_3G005700	AT1G02450	35	No	2,5	1,75E-06	NIMIN1; NIM1-INTERACTING 1
Prupe_7G248700	AT1G02450	48	Yes	-2,8	3,13E-14	NIMIN1; NIM1-INTERACTING 1
Prupe_1G309800	AT3G25882	36	Yes	6,8	2,42E-12	NIMIN2; NIM1-INTERACTING 2
Prupe_6G046900	AT2G38470	48	Yes	5,7	1,16E-63	WRKY33; Transcription factor WRKY33
Prupe_2G265000	AT3G56400	41	Yes	6,0	5,95E-65	WRKY70; Transcription factor WRKY70
Prupe_1G509100	AT2G13810	66	No	12,7	2,9E-14	ALD1; AGD2-like defense response protein 1
Prupe_1G558600	AT2G13810	70	Yes	8,5	2,1E-11	ALD1; AGD2-like defense response protein 1
Prupe_2G302000	AT5G52810	66	Yes	2,1	1,1E-07	SARD4; SAR DEFICIENT 4
Prupe_7G193500	AT1G19250	70	Yes	9,7	2,2E-14	FMO1; Probable flavin-containing monooxygenase 1
Prupe_8G177100	AT1G19250	43	No	2,9	2,6E-11	FMO1; Probable flavin-containing monooxygenase 1
Prupe_7G189800	AT4G33150	72	Yes	3,1	1,8E-10	LKR/SDH; Alpha-aminoacidic semialdehyde synthase
Prupe_3G091800	AT1G80460	81	Yes	2,4	6,43E-16	GLU1; GLYCEROL INSENSITIVE 1
Prupe_1G179900	AT5G48485	48	No	-2,1	6,99E-03	DIR1; Defective in Induced Resistance
Prupe_6G046900	AT2G38470	48	Yes	5,7	1,2E-63	WRKY33; Transcription factor WRKY33
Prupe_6G286000	AT2G38470	60	No	4,8	2,5E-36	WRKY33; Transcription factor WRKY34
Jasmonic acid biosynthesis						
Prupe_3G239900	AT1G13280	70	No	2,1	2,6E-06	AOC4; Allene oxide cyclase 4
Prupe_2G184100	AT2G46370	66	Yes	1,5	9,1E-04	JAR1; Jasmonic acid-amido synthetase 1
Prupe_2G246000	AT2G39940	73	Yes	1,6	5,7E-07	COI1; Coronatine-insensitive protein 1
Prupe_4G273300	AT5G63970	73	Yes	11,3	4,2E-04	RGLG3; E3 ubiquitin-protein ligase RGLG3
Prupe_7G129300	AT4G05160	65	Yes	2,2	3,04E-05	4CLL7; 4-coumarate-CoA ligase-like 7

Abscisic acid biosynthesis and signaling pathway						
Prupe_4G150100	AT3G14440	75	Yes	3,7	8,8E-07	NCED3; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
Prupe_6G150900	AT1G04580	62	Yes	1,4	2,7E-02	AAO; Abscisic-aldehyde oxidase related
Prupe_7G133100	AT5G67030	72	Yes	1,9	5,8E-05	ZEP; Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic
Prupe_6G138600	AT1G52340	46	No	-5,2	8,7E-07	ABA2; Xanthoxin dehydrogenase
Prupe_1G186500	AT2G43350	64	Yes	2,1	2,6E-10	GPX3; Probable glutathione peroxidase 3, mitochondrial
Prupe_8G057600	AT4G09570	84	Yes	1,7	7,6E-10	CPK4; Calcium-dependent protein kinase 4
Prupe_8G115900	AT4G33950	87	Yes	1,3	1,0E-02	SRK2E; Serine/threonine-protein kinase
Prupe_8G267700	AT1G65690	54	Yes	5,1	3,1E-15	NHL6; NDR1/HIN1-like protein 6
Prupe_7G097100	AT3G11660	62	Yes	1,5	4,5E-03	NHL1; NDR1/HIN1-like protein 1
Prupe_4G185600	AT1G52920	69	Yes	2,0	3,6E-05	GCR2; LanC-like protein GCR2
Prupe_8G126600	AT4G34000	48	Yes	1,9	1,5E-10	ABF3; ABSICISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 6
Auxin biosynthesis, regulation, transport						
Prupe_7G031400	AT1G73590	64	No	-2,0	1,9E-04	PIN1; Auxin efflux carrier component 1
Prupe_6G360300	AT5G16530	73	Yes	-3,3	9,3E-04	PIN5; Auxin efflux carrier component 5
Prupe_8G018200	AT1G77110	67	Yes	-3,5	6,9E-11	PIN6; Auxin efflux carrier component 6
Prupe_1G103800	AT2G47000	73	No	-1,9	2,0E-02	ABC transporter
Prupe_1G104100	AT2G47000	73	No	6,5	3,5E-54	ABC transporter
Prupe_1G406300	AT3G13980	47	Yes	-3,5	1,9E-28	Protein BIG GRAIN 1-like A
Prupe_7G203200	AT3G42800	39	Yes	-4,3	5,8E-06	Protein BIG GRAIN 1-like C
Prupe_4G088000	AT2G34650	68	Yes	-2,3	3,9E-07	PID; Protein kinase PINOID
Prupe_4G148800	AT1G17140	52	Yes	-2,3	8,8E-06	ICR1; Interactor of constitutive active ROPs 1
Prupe_1G413900	AT5G11790	78	Yes	-2,2	3,5E-06	NDL2; N-MYC DOWNREGULATED-LIKE 2
Prupe_5G152800	AT5G63420	72	Yes	-1,5	6,0E-03	RNJ; Ribonuclease J
Prupe_3G075300	AT1G80360	72	Yes	2,3	8,4E-21	ISS1; Aromatic aminotransferase
Prupe_3G295000	AT5G14420	73	No	1,4	4,2E-03	RGLG2; E3 ubiquitin-protein ligase
Prupe_1G322300	AT1G71090	74	Yes	2,1	2,0E-10	PILS2; Protein PIN-LIKES 2
Prupe_3G044500	AT4G33090	57	No	3,8	2,4E-12	APM1; Aminopeptidase M1
Prupe_7G250800	AT1G15690	89	No	2,4	3,7E-08	AVP1; Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1
Prupe_1G468500	AT5G11320	72	Yes	-3,9	2,3E-12	YUC4; Probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA4
Prupe_1G453400	AT5G25620	74	Yes	-2,1	1,1E-03	YUC6; Indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA6
Prupe_8G252500	AT1G48910	50	No	2,3	2,7E-09	YUC10; Probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA10
Prupe_6G005900	AT1G55320	70	Yes	-2,4	2,7E-14	AAE18; Probable acyl-activating enzyme 18
Prupe_6G040000	AT3G10870	54	No	5,5	6,2E-48	MES17; Methyltransferase 17
Other Phytohormones						
Prupe_5G106200	AT4G11280	68	Yes	3,4	7,7E-16	ACS6; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6
Prupe_5G176300	AT4G11280	29	No	1,4	2,8E-03	ACS6; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6
Prupe_5G061800	AT4G17500	58	Yes	5,3	1,6E-37	ERF1B; Ethylene-responsive transcription factor 1B
Prupe_2G272300	AT4G17500	50	No	5,5	9,7E-52	ERF1B; Ethylene-responsive transcription factor 1B
Prupe_1G382900	AT1G75080	64	Yes	-1,6	2,3E-02	BZR1; Protein BRASSINAZOLE-RESISTANT 1
Prupe_7G264200	AT4G30610	74	Yes	-1,7	9,6E-03	BRS1; BRI1 suppressor
Polyols						
Prupe_2G288800	AT5G51970	81	yes	1,6	1,4E-02	Sorbitol dehydrogenase
Prupe_4G240300	AT5G51970	76	No	2,3	9,1E-03	Sorbitol dehydrogenase
Prupe_8G142900	AT5G51970	76	No	4,9	2,4E-26	Sorbitol dehydrogenase
Prupe_8G143000	AT5G51970	76	No	5,2	8,3E-22	Sorbitol dehydrogenase
Prupe_8G100900	AT3G18830	68	No	4,9	4,8E-17	PLT5; Polyol transporter 5
Prupe_8G100700	AT3G18830	65	No	3,5	1,8E-13	PLT5; Polyol transporter 5
Prupe_8G101200	AT3G18830	71	No	2,0	1,8E-14	PLT5; Polyol transporter 5
Prupe_8G101500	AT3G18830	65	No	2,3	3,3E-05	PLT5; Polyol transporter 5
Prupe_7G231500	AT3G18830	55	No	-5,2	8,7E-04	PLT5; Polyol transporter 5
Glyoxylate metabolism						
Prupe_1G155800	AT5G27600	76	Yes	1,3	2,3E-02	LACS7; Long chain acyl-CoA synthetase 7, peroxisomal
Prupe_5G065100	AT4G16760	80	Yes	1,5	8,3E-04	ACX1; Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
Prupe_7G067100	AT4G16760	74	No	-3,6	4,2E-11	ACX1; Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
Prupe_6G181800	AT5G65110	83	Yes	1,9	1,9E-04	ACX2; Acyl-coenzyme A oxidase 2, peroxisomal
Prupe_1G003300	AT2G33150	86	Yes	1,6	3,9E-06	PED1; 3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal
Prupe_8G206400	AT2G33150	76	No	1,5	4,1E-05	PED1; 3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal
Prupe_3G219100	AT3G21720	84	Yes	4,3	2,5E-34	ICL; Isocitrate lyase
Prupe_1G541200	AT4G37870	82	Yes	4,3	1,1E-28	PCK1; Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) 1
Prupe_4G170500	AT1G53240	85	Yes	-1,8	5,6E-09	MDH; malate dehydrogenase 1 mitochondriale
Prupe_4G058400	AT3G15020	82	Yes	-2,1	3,9E-06	MDH; malate dehydrogenase 2 mitochondriale
Prupe_4G116700	AT4G20070	71	Yes	2,1	2,6E-03	AAH; Allantoate deiminase
Prupe_4G045000	AT4G04955	73	Yes	3,3	3,2E-22	ALN; Allantoinase
Prupe_4G245700	AT4G34890	77	Yes	1,8	9,9E-09	XDH1; Xanthine dehydrogenase 1
Prupe_4G216900	AT4G26910	70	Yes	-2,0	1,1E-03	ODH; Oxoglutarate dehydrogenase
Prupe_2G151800	AT1G12550	52	No	-2,2	6,2E-05	HPR3; Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase
Prupe_3G048100	AT1G17650	77	Yes	-1,6	4,0E-04	GLYR2; Glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 2, chloroplastic
Prupe_4G258800	AT2G13360	86	Yes	2,2	5,6E-06	AGT1; Glyoxylate aminotransferase 1
Prupe_4G082600	AT3G14420	88	No	2,9	3,4E-20	GOX1; Glycolate oxidase
Glutamine and ammonium metabolisms						
Prupe_6G054800	AT3G47340	85	Yes	4,5	1,1E-29	ASN1; Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] 1
Prupe_2G269800	AT5G07440	89	Yes	2,1	1,3E-04	GDH2; Glutamate dehydrogenase 2
Prupe_2G311700	AT5G53460	83	Yes	2,5	3,5E-17	GLT1; Glutamate synthase 1
Prupe_4G089000	AT4G21120	72	Yes	4,0	3,8E-33	CAT1; Cationic amino acid transporter 1
Prupe_4G118600	AT2G34960	79	No	3,2	8,2E-16	CAT5; Cationic amino acid transporter 5
Prupe_4G118700	AT2G34960	68	Yes	6,0	8,2E-16	CAT5; Cationic amino acid transporter 5
Prupe_3G211600	AT3G21670	74	Yes	1,4	3,7E-02	NPF6.4; Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.4
Prupe_2G110400	AT1G32450	71	No	3,9	1,5E-08	NPF7.3; Protein NRT1/ PTR FAMILY 7.3
Prupe_1G052400	AT4G13510	80	Yes	1,8	2,1E-07	AMT1; Ammonium transporter 1
Prupe_1G505400	AT1G77760	78	Yes	2,4	4,2E-02	NIA1; Nitrate reductase [NADH] 1
Prupe_3G300900	AT5G40780	83	Yes	5,5	7,8E-43	LHT1; Lysine/histidine transporter 1

Urea cycle / Proline metabolism						
Prupe_1G463900	AT3G57560	70	Yes	-1,6	2,0E-03	NAGK; Acetylglutamate kinase, chloroplatic
Prupe_8G115600	AT2G19940	81	Yes	-2,3	5,2E-10	NAGPR; N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
Prupe_6G093800	AT1G29900	82	Yes	-1,7	3,6E-07	CARB; Carbamoyl-phosphate synthase large chain, chloroplatic
Prupe_1G376500	AT1G75330	79	Yes	-1,8	1,6E-17	OTC; Ornithine carbamoyltransferase
Prupe_6G250400	AT2G37500	75	Yes	-1,4	5,3E-03	ArgJ; Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ, chloroplatic
Prupe_5G153100	AT4G24830	79	Yes	-2,9	5,9E-19	ASSY; Arginosuccinate synthase
Prupe_7G058500	AT4G24830	79	No	-1,5	8,4E-06	ASSY; Arginosuccinate synthase
Prupe_3G092300	AT4G08900	30	No	2,2	8,7E-04	ARGAH1; Arginase 1
Prupe_2G076400	AT4G08870	68	No	6,8	3,5E-06	ARGAH2; Arginase 2
Prupe_5G019100	AT5G45380	79	Yes	2,0	5,2E-08	DUR3; Urea-proton symporter
Prupe_4G068700	AT4G18910	63	Yes	2,0	4,2E+64	NIP1; Aquaporin Nodulin-26-like major intrinsic protein
Prupe_5G138000	AT4G10380	82	Yes	2,0	4,7E-04	NIP5; Aquaporin Nodulin-26-like major intrinsic protein
Prupe_3G096600	AT1G80760	78	Yes	-1,9	1,6E-03	NIP6; Aquaporin Nodulin-26-like major intrinsic protein
Prupe_2G097000	AT4G35100	36	No	2,9	1,9E-03	PIP2; Aquaporin Plasma membrane intrinsic protein
Prupe_4G083300	AT5G46180	75	Yes	1,4	2,7E-02	DELTA-OAT; Ornithine aminotransferase, mitochondrial
Prupe_7G045400	AT5G14800	59	No	4,0	9,7E-17	PROC1; Pyrroline-5-carboxylate reductase
Prupe_3G243500	AT5G38710	60	Yes	2,1	1,1E-05	POX2; Proline dehydrogenase 2
Prupe_6G262300	AT3G55610	75	No	1,5	4,6E-03	P5CS2; Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase
Prupe_5G187700	AT5G62530	81	Yes	1,5	9,2E-03	ALDH12A1; Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 12A1, mitochondrial
Methionine metabolism						
Prupe_7G009200	AT5G17920	89	Yes	-1,6	1,9E-03	MS1; 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1
Prupe_5G129800	AT1G64660	76	Yes	3,8	8,0E-35	MGL; Methionine gamma-lyase
Leucine, isoleucine, valine biosynthesis						
Prupe_6G116600	AT3G10050	68	No	-4,0	3,4E-02	OMR1; Threonine dehydratase
Prupe_5G043100	AT3G48560	80	Yes	-1,4	2,6E-02	ALS; Acetolactate synthase
Prupe_3G094300	AT1G80560	82	Yes	-1,5	4,3E-07	IMDH2; 3-isopropylmalate dehydrogenase 2
Prupe_1G003100	AT3G23940	82	Yes	-3,2	7,7E-21	DHAD; Dihydroxy-acid dehydratase
Prupe_1G416900	AT3G49680	59	No	3,0	1,7E-03	BCAT3; Branched-chain-amino-acid aminotransferase 3
Prupe_1G417000	AT3G49680	61	No	3,4	1,2E-02	BCAT3; Branched-chain-amino-acid aminotransferase 3
Lysine and histidine metabolism						
Prupe_8G007000	AT1G31230	80	Yes	-2,7	8,6E-10	AKHSDH1; Aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1
Prupe_1G334400	AT1G14810	81	Yes	-1,9	5,0E-05	ASADH; Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
Prupe_7G270700	AT3G59890	83	No	-2,0	1,6E-13	DAPB2; 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase 2
Prupe_6G152500	AT3G59890	81	Yes	-2,1	4,6E-13	DAPB2; 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase 2
Prupe_8G156100	AT4G33680	81	No	-4,1	1,8E-19	AGD2; LL-diaminopimelate aminotransferase
Prupe_8G092300	AT5G11880	80	Yes	-1,5	1,9E-06	LYSA2; Diaminopimelate decarboxylase 2
Prupe_7G196700	AT1G54100	81	Yes	2,0	2,4E-12	ALDH7B4; Aldehyde dehydrogenase family 7 member B4
Prupe_7G189800	AT4G33150	72	Yes	3,1	1,8E-10	LKR/SDH; Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase
Prupe_8G090900	AT4G39120	66	Yes	-1,6	8,7E-04	HISN7; Bifunctional phosphatase IMPL2, chloroplatic
Beta-alanine and Beta-aminobutyrate biosynthesis						
Prupe_4G264100	AT5G12200	81	No	1,8	8,4E-12	PYD2; Dihydropyrimidinase
Prupe_8G070200	AT5G64370	84	Yes	2,0	1,3E-08	PYD3; Beta-ureidopropionase
Shikimate pathway						
Prupe_2G143700	AT2G45300	77	Yes	-1,8	2,5E-07	EPSPS; 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
Prupe_1G393400	AT5G10870	67	Yes	2,2	4,3E-09	CM2; Chorismate mutase 2
Prupe_1G281400	AT1G69370	66	Yes	-3,2	8,4E-23	CM3; Chorismate mutase 3
Prupe_6G119200	AT1G08250	80	Yes	-1,4	3,6E-02	PDT6; Arogenate dehydratase/prephenate dehydratase 6
Phenylpropanoid and flavonoids biosynthesis						
Prupe_6G040400	AT2G30490	86	Yes	-1,6	1,2E-04	CYP73A5; Trans-cinnamate 4-monooxygenase
Prupe_2G326300	AT1G65060	70	No	-1,9	1,2E-04	4CL3; 4-coumarate-CoA ligase 3
Prupe_3G101400	AT5G48930	68	No	-3,8	8,6E-06	HCT; Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase
Prupe_1G580300	AT2G40890	80	No	-2,1	4,2E-06	CYP98A3; C3'H; p-coumaroylshikimate/quininate 3'-hydroxylase
Prupe_8G135300	AT3G19450	78	Yes	1,6	2,4E-06	CAD4; Cinnamyl alcohol dehydrogenase 4
Prupe_6G207700	AT4G37980	75	No	9,1	1,1E-11	CAD7; Cinnamyl alcohol dehydrogenase 7
Prupe_1G002900	AT5G13930	85	No	-2,6	6,1E-20	CHS; Chalcone synthase
Prupe_1G003000	AT5G13930	85	Yes	-2,0	6,8E-06	CHS; Chalcone synthase
Prupe_2G225200	AT3G55120	71	Yes	-2,6	7,3E-29	Chalcone isomerase
Prupe_1G376400	AT5G42800	70	Yes	-2,9	2,5E-18	DFR; Dihydroflavonol 4-reductase
Prupe_7G168300	AT3G51240	81	Yes	-1,9	1,6E-11	F3H; Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase
Prupe_1G502700	AT5G08640	61	Yes	-4,2	1,8E-02	FLS; Flavonol synthase
Prupe_2G199600	AT5G54160	56	No	-3,1	3,5E-08	OMT1; Flavone 3'-O-methyltransferase 1

**Annexe 8. Metabolites detected by GC-MS and LC-MS analyses, classified according to their metabolic family.**



**Annexe 9. Metabolites variations between uninfested genotypes.** GC: GF305 control; GI: GF305 infested; RC: Rubira control; RI: Rubira infested. The p.value of a Kruskal Wallis test is given, at threshold  $\alpha = 0.05$ . (1) Class : (I), primary metabolites; (II), secondary metabolites; (PH), phytohormone. (2) p-value of a Kruskal Wallis test followed by a Conover (\*) post-hoc test. (3) p-value of Conover post-hoc test for pairwise comparisons of RC vs Gc; GI vs GC; RI vs RC.

Compound identity	Class (1)	Family	Identification level	GF305-Control		GF305-Infested		Rubira-Control		Rubira-Infested		p-value (2)		p-value (3)		Log2 ratios	
				Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	RC vs GC	GI vs GC	RI vs RC	RC/GC	GI/GC	R/RC
Dihydroquercetin-glucosyl-rhamnoside	II	Flavonols and derivatives	[3]	1	0	1	0	45028 ± 8452	b	45903 ± 6715	b	6.4E-03	1.0E+00	1.0E+00	3.5	0.0	-0.1
Cyanidin-rhamnosyl-glucoside	II	Anthocyanins	[3]	1	0	1	0	54238 ± 5636	b	40616 ± 6715	b	4.9E-03	1.0E+00	1.0E+00	3.6	0.0	-0.2
U_Antioxyannin	II	Anthocyanins	[3]	204	± 239	118	± 204	45365 ± 8452	a	1930380 ± 1471738	b	9.8E-03	1.0E+00	1.0E+00	3.7	0.0	0.1
Kaempferol-acetyl-glucoside	II	Flavonols and derivatives	[3]	1	0	1	0	4190 ± 1478	b	4989 ± 931	b	6.0E-03	1.0E+00	1.0E+00	3.8	0.0	0.3
Quercetagetin-glucoside	II	Flavonols and derivatives	[3]	1	0	2	± 2	3468 ± 2049	b	5121 ± 1678	b	7.4E-03	1.0E+00	1.0E+00	3.9	0.0	0.6
Cyanidin-3-O-glucoside	II	Anthocyanins	[3]	158482 ± 171331	± 173331	78956 ± 126831	± 126831	2177711 ± 48465638	b	18222 ± 5132	b	1.1E-02	1.0E+00	1.0E+00	4.0	0.0	0.1
Quercetin-3-O-rhamnoside	II	Flavonols and derivatives	[3]	966 ± 482	± 482	1395 ± 364	± 364	11964 ± 2422	bc	18222 ± 5132	b	5.13E-03	1.0E+00	1.0E+00	4.1	0.0	3.6
Quercetin-rhamnosyl-acetylglucoside	II	Flavonols and derivatives	[3]	10315 ± 1410	± 1410	11568 ± 3044	± 3044	41820 ± 81663	b	6.7E-03	b	6.7E-03	1.0E+00	1.0E+00	4.2	0.0	3.6
Quercetin-rhamnoside_2	II	Flavonols and derivatives	[3]	4378 ± 862	± 862	5391 ± 2698	± 2698	31208 ± 10957	b	53990 ± 12162	b	4.0E-03	1.0E+00	1.0E+00	4.3	0.0	3.8
Urea	I	Others	[1]	112 ± 38	± 38	101 ± 22	± 22	330 ± 86	b	1554 ± 274	c	5.4E-03	1.0E+00	1.0E+00	4.4	0.0	3.8
Glyoxylic acid	I	Organic acids	[2]	98 ± 29	± 29	86 ± 14	± 14	254 ± 63	b	1109 ± 193	c	4.3E-03	1.0E+00	1.0E+00	4.5	0.0	3.1
Arginine	I	Amino acids	[1]	2866534 ± 729294	± 729294	2896703 ± 1017186	± 1017186	2200389 ± 11597589	b	53E03	b	1.2E-02	1.0E+00	1.0E+00	4.6	0.0	3.9
U_Ketone	I	Carbohydrates	[3]	5 ± 2	± 2	3 ± 0	± 0	10 ± 4	b	172 ± 67	b	3.4E-03	1.0E+00	1.0E+00	4.7	0.0	3.6
Quercetin-rutinoides_1	II	Flavonols and derivatives	[3]	22495 ± 332	± 332	17099 ± 332	± 332	38763 ± 6825	b	39296 ± 3158	b	3.0E-02	4.8E-01	1.0E+00	4.8	0.0	0.0
Coumaroylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[2]	1333422 ± 156647	± 156647	923994 ± 80194	± 80194	738655 ± 1934633	c	421827 ± 421827	bc	1.3E-02	4.8E-01	1.0E+00	4.9	0.0	0.2
Cystathionine	I	Amines	[3]	4159 ± 589	± 589	10437 ± 4221	± 4221	3319 ± 542	b	1028 ± 280	c	3.2E-02	5.0E-02	4.2E-01	5.0	0.0	-1.7
U_Glucopyranose	I	Carbohydrates	[3]	102 ± 14	± 14	85 ± 7	± 7	79 ± 6	c	127 ± 24	a	6.0E-03	1.9E-01	6.4E-05	5.1	0.0	3.7
Sarcosine	I	Amines	[3]	806914 ± 116430	± 116430	612956 ± 48917	± 48917	79291 ± 2486207	b	444620 ± 444620	a	5.5E-03	2.5E-02	6.0E-02	5.2	0.0	3.0
Hydroxyproline	I	Amino acids	[3]	342152 ± 57755	± 57755	284136 ± 27515	± 27515	29763 ± 355883	b	86176 ± 355883	a	8.5E-01	6.0E-02	8.5E-01	5.3	0.0	3.8
U_Mannopyranose	I	Carbohydrates	[3]	45 ± 5	± 5	34 ± 3	± 3	32 ± 1	b	57 ± 11	a	6.0E-03	6.3E-03	1.1E-04	5.4	0.0	3.8
Caffoyl-coumaroylquinic acid_2	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	45705 ± 4143	± 4143	34719 ± 1339	± 1339	32459 ± 7493	b	41429 ± 5035	ab	3.3E-02	5.3E-02	1.3E-01	5.5	0.0	0.4
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside_1	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	13021 ± 1040	± 1040	10817 ± 1419	± 1419	9216 ± 1074	b	10930 ± 1651	ab	4.6E-02	1.8E-02	4.2E-01	5.6	0.0	0.2
Serine	I	Amino acids	[1]	14976871 ± 2019159	± 2019159	12765693 ± 353155	± 353155	1414994 ± 26307824	b	3614379 ± 3614379	c	3.6E-03	8.3E-04	5.6E-01	5.7	0.0	3.3
Alanine	I	Amino acids	[1]	8049356 ± 1313113	± 1313113	21171 ± 680	± 680	18783 ± 4835	bc	16792 ± 1166	c	6.9E-03	3.1E-01	8.1E-01	6.0	0.0	4.2
Coumaroyl-diacylfructosyl-diacylglucoside_3	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	14959 ± 3618	± 3618	11808 ± 1921	± 1921	2208 ± 1288	b	1289 ± 1086	b	2.6E-02	6.2E-03	1.0E+00	6.2	0.0	0.3
Coumaroyl-diacylfructosyl-triacetylglucoside_2	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	8231 ± 2046	± 2046	5911 ± 927	± 927	144 ± 5070	b	580 ± 2.2E-02	ab	4.4E-02	3.9E-01	2.4E-01	6.3	0.0	0.4
Isoleudine	I	Amino acids	[3]	1604438 ± 285688	± 285688	1359335 ± 62406	± 62406	136955 ± 7125451	b	1009886 ± 1009886	c	4.0E-03	1.0E+00	1.0E+00	6.4	0.0	-0.1
Coumaroyl-diacylfructosyl-triacetylglucoside_3	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	5403 ± 1389	± 1389	3899 ± 471	± 471	3545 ± 294	b	2794 ± 573	b	1.4E-02	4.6E-01	1.0E+00	6.5	0.0	0.2
Threonine	I	Amino acids	[1]	8670845 ± 1309276	± 1309276	645473 ± 258277	± 258277	499589 ± 793272	b	811518 ± 811518	a	1.4E-04	8.7E-03	5.0E-04	6.6	0.0	0.6
Feruloylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	14834 ± 1512	± 1512	11263 ± 926	± 926	9084 ± 763	b	13874 ± 6	a	1.1E-02	1.2E-01	2.1E-03	6.7	0.0	3.6
Caffoyl-coumaroylquinic acid_3	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	17323 ± 2785	± 2785	12791 ± 2176	± 2176	10419 ± 3850	b	14241 ± 2969	ab	3.3E-02	1.0E-02	2.6E-01	6.7	0.0	0.5
Coumaroyl-triacetylfructosyl-diacylglucoside_1	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	6224 ± 1203	± 1203	5337 ± 962	± 962	3639 ± 622	bc	2665 ± 600	c	7.1E-03	7.0E-03	9.7E-01	7.1	0.0	0.4
Coumaroyl-triacetylfructosyl-triacetylglucoside_1	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	3451 ± 674	± 674	2445 ± 309	± 309	1991 ± 478	c	3851 ± 284	a	6.6E-03	3.3E-03	7.1E-02	7.2	0.0	0.4
Coumaroyl-diacylfructosyl-triacetylglucoside_1	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	2791 ± 681	± 681	1980 ± 20	± 20	1608 ± 324	c	2208 ± 100	d	2.9E-03	1.8E-07	1.6E-05	7.3	0.0	0.5
1-Aminoocyclopropanecarboxylic acid (ACC)	PH	Phytohormones	[1]	294 ± 573	± 573	2937 ± 957	± 957	1687 ± 435	b	90770 ± 35627	c	5.3E-03	1.7E-02	1.0E+00	7.4	0.0	0.5
Glycine	I	Amino acids	[1]	1084017 ± 272435	± 272435	899456 ± 82950	± 82950	144418 ± 665976	b	96521 ± 665976	b	3.1E-02	2.4E-02	1.0E+00	7.5	0.0	0.2
Sorbitol	I	Polyols	[1]	9563 ± 2964	± 2964	8399 ± 1010	± 1010	5210 ± 435	b	1158 ± 90	c	4.4E-03	8.7E-03	1.0E+00	7.6	0.0	0.1
Protyndin B	II	Flavonols and derivatives	[3]	2801 ± 292	± 292	2242 ± 266	± 266	1965 ± 256	b	1718 ± 548	ab	3.8E-02	3.1E-02	1.0E+00	7.7	0.0	0.2
3,5-Dicaffeoylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	119880 ± 4293	± 4293	92812 ± 9456	± 9456	6323 ± 20889	b	114560 ± 18138	a	1.9E-02	2.9E-01	6.8E-03	7.8	0.0	0.9
Coumaroyl-diacylfructosyl-diacylglucoside_1	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	6192 ± 1010	± 1010	5027 ± 1079	± 1079	892 ± 892	bc	2214 ± 602	c	7.1E-03	9.7E-01	3.1E-01	7.9	0.0	0.5
Alpha-amobutyric acid (ABA)	I	Amino acids	[3]	172142 ± 30108	± 30108	144076 ± 9657	± 9657	8904 ± 15591	b	208715 ± 31138	b	7.1E-03	4.3E-03	5.3E-01	8.0	0.0	0.2
Isorhamnetin-3-O-rutinoides	II	Flavonols and derivatives	[3]	3244 ± 268	± 268	2266 ± 590	± 590	1674 ± 126	b	1871 ± 940	b	2.9E-02	1.3E-02	1.0E+00	8.1	0.0	0.5
Coumaroyl-diacylfructosyl-diacylglucoside_5	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	31561 ± 5257	± 5257	21064 ± 4003	± 4003	1620 ± 1651	b	1367 ± 187	b	1.1E-02	8.1E-03	1.0E+00	8.2	0.0	0.2
Coumaroyl-triacetylfructosyl-triacetylglucoside_3	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	5872 ± 871	± 871	4314 ± 977	± 977	2976 ± 231	b	3136 ± 837	b	3.5E-02	5.5E-03	1.0E+00	8.3	0.0	0.1
Catechin	I	Flavonols and derivatives	[3]	133205 ± 21984	± 21984	82462 ± 38187	± 38187	69318 ± 12386	b	73407 ± 21056	ab	4.2E-02	4.1E-01	1.0E+00	8.4	0.0	0.2
Isoleucine	I	Amino acids	[3]	4224 ± 679	± 679	2653 ± 529	± 529	2874 ± 287	c	2874 ± 287	c	8.0E-03	1.5E-01	6.5E-02	8.5	0.0	0.2
Coumaroyl-diacylfructosyl-diacylglucoside_4	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	10646 ± 2085	± 2085	7240 ± 1539	± 1539	5105 ± 426	bc	4620 ± 345	c	4.0E-03	4.1E-04	3.2E-02	8.6	0.0	0.2
3,4-Dicaffeoylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[1]	133400 ± 27469	± 27469	94135 ± 11220	± 11220	65377 ± 11666	b	116767 ± 12118	ac	1.7E-04	1.3E-02	1.1E-03	8.7	0.0	0.5

Compound identity	Class (1)	Family	Identification level	GF305-Control		GF305-Infested		Rubira-Control		Rub-Infested		P-value (2)	P-value (3)		Log2 ratios		
				Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		RC vs GC	GI vs GC	RC/GC	GI/GC	R/RC
Naringenin-7-O-glucoside	II	Flavones and derivatives	[1]	38980 ± 3789	a	31956 ± 10105	ab	18330 ± 8178	b	16479 ± 4880	b	1.6E-02	1.0E+00	1.0E+00	-1.1	0.3	0.2
Caffeoyl-pumasin	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	8728 ± 554	a	6147 ± 183	bc	4089 ± 673	b	7063 ± 897	c	4.0E-03	5.1E-04	2.6E-04	-1.1	0.5	0.8
Beta-aminoisobutyric acid (BABA)	I	Amino acids	[1]	44904 ± 7372	a	43642 ± 5912	a	20913 ± 3551	b	74935 ± 11146	c	4.2E-03	1.0E+00	4.6E-06	-1.1	0.0	0.8
Tyrosine	I	Amino acids	[1]	861317 ± 122127	a	730555 ± 105535	a	##### ± 41982	b	1448328 ± 330659	c	4.0E-03	1.0E+00	3.1E-06	-1.1	0.2	0.9
Kaempferol-3-O-rutinoside	II	Flavonols and derivatives	[1]	42920 ± 8070	a	39661 ± 9682	ab	19371 ± 3377	bc	25369 ± 4548	bc	8.9E-03	1.0E+00	4.4E-01	-1.1	0.1	0.4
Amino adipic acid	I	Amino acids	[1]	51923 ± 12482	a	50697 ± 21617	a	22621 ± 10281	b	291360 ± 100779	c	4.2E-03	1.0E+00	4.6E-06	-1.2	0.0	3.7
Caffeoyl-coumaroylquinic acid_1	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	7953 ± 758	a	5208 ± 392	ab	3400 ± 1010	b	4762 ± 710	b	9.0E-03	1.3E-01	1.9E-01	-1.2	0.6	0.5
Kaempferol-3-O-galactoside	II	Flavonols and derivatives	[1]	505680 ± 178039	a	595652 ± 206351	a	##### ± 95041	b	352531 ± 71180	ab	1.9E-02	1.0E+00	2.8E-01	-1.3	0.2	0.8
Coumaroyl-fructosyl-triacetylglucoside_2	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	5629 ± 1727	a	3621 ± 717	b	2317 ± 267	c	2975 ± 301	b	3.8E-03	5.0E-02	7.1E-03	-1.3	0.6	0.4
Dicoumaroylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[2]	211338 ± 53588	a	148283 ± 55314	ab	86402 ± 21789	b	103274 ± 29103	b	2.2E-02	1.0E+00	1.0E+00	-1.3	0.5	0.3
Isorhamnetin-3-O-glucoside	II	Flavonols and derivatives	[1]	274398 ± 38641	a	204343 ± 57447	ab	##### ± 42370	bc	70251 ± 39699	c	9.0E-03	1.0E+00	1.0E+00	-1.3	0.4	0.7
4,5-Dicaffeoylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[1]	71128 ± 8811	a	41419 ± 6878	bc	28033 ± 6676	b	52671 ± 11082	c	5.2E-03	2.1E-05	3.6E-03	-1.3	0.8	0.9
Coumaroyl-triacetylfructosyl-diacylglucoside_2	II	Hydroxycinnamic acid acetylglucoside esters	[3]	1349 ± 329	a	856 ± 221	ab	527 ± 83	bc	415 ± 127	c	6.9E-03	3.1E-01	8.1E-01	-1.4	0.7	0.3
Tryptophan	I	Amino acids	[1]	961917 ± 151166	ab	859461 ± 95051	ac	##### ± 40406	c	1341745 ± 264958	b	5.3E-03	6.0E-01	2.4E-05	-1.4	0.2	0.8
Caffeoyl-feruloylquinic acid_1	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	1566 ± 159	a	1226 ± 44	b	587 ± 129	c	1147 ± 134	b	5.0E-03	3.4E-05	9.3E-03	-1.4	0.4	0.0
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	8680 ± 271	a	6360 ± 589	b	3156 ± 657	c	6143 ± 1062	b	5.2E-03	1.7E-05	2.8E-02	-1.4	0.4	0.0
Valine	I	Amino acids	[1]	16614220 ± 5324113	a	11935974 ± 4338857	ab	##### ± 1002132	c	9760207 ± 1093698	b	8.2E-03	1.7E-01	2.3E-02	-1.8	0.5	0.0
Glucose	I	Carbohydrates	[1]	5908 ± 3805	a	5045 ± 1987	ab	1672 ± 348	bc	1557 ± 565	c	1.4E-02	1.0E+00	1.0E+00	-1.8	0.2	0.1
U_Arabinose-2-ulose-bis-dimethyl-azetal	I	Carbohydrates	[3]	725 ± 65	a	560 ± 100	ab	200 ± 42	bc	166 ± 69	c	6.2E-03	3.8E-01	1.0E+00	-1.9	0.4	0.3
Phenylalanine	I	Amino acids	[1]	4061776 ± 810644	a	3622241 ± 79023	a	##### ± 47384	b	9447349 ± 189727	c	4.0E-03	1.0E+00	3.1E-06	-1.9	0.2	0.3
Dicaffeoylquinic acid_2	I	Amino acids	[3]	5060 ± 830	a	2883 ± 446	b	1305 ± 370	c	3236 ± 540	b	4.6E-03	2.5E-03	1.5E-03	-2.0	0.8	0.3
Dihydrokaempferol-glucoside_2	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	6560 ± 2033	a	5812 ± 2962	a	872 ± 727	b	1663 ± 1048	b	8.7E-03	1.0E+00	1.0E+00	-2.9	0.2	0.9
Isorhamnetin-glucoside_2	II	Flavonols and derivatives	[3]	2156 ± 932	a	1182 ± 936	ab	257 ± 238	b	1174 ± 1440	ab	7.3E-02	1.0E+00	1.0E+00	-3.1	0.9	0.2
Isopropylmalic acid	I	Organic acids	[2]	980 ± 449	a	914 ± 651	a	20 ± 4	b	21 ± 7	b	1.0E-02	1.0E+00	1.0E+00	-5.6	0.1	0.1

**Annexe 10. Metabolites variations induced by *M. persicae* in GF305.** GC: GF305 control; GI: GF305 infested; RC: Rubira control; RI: Rubira infested. The p.value of a Kruskal Wallis test is given, at threshold  $\alpha = 0.05$ . (1) Class : (I), primary metabolites; (II), secondary metabolites; (PH), phytohormones. (2) p-value of a Kruskal Wallis test followed by a Conover (\*) post-hoc test. (3) p-value of Conover post-hoc test for pairwise comparisons of RC vs Gc; GI vs GC; RI vs RC.

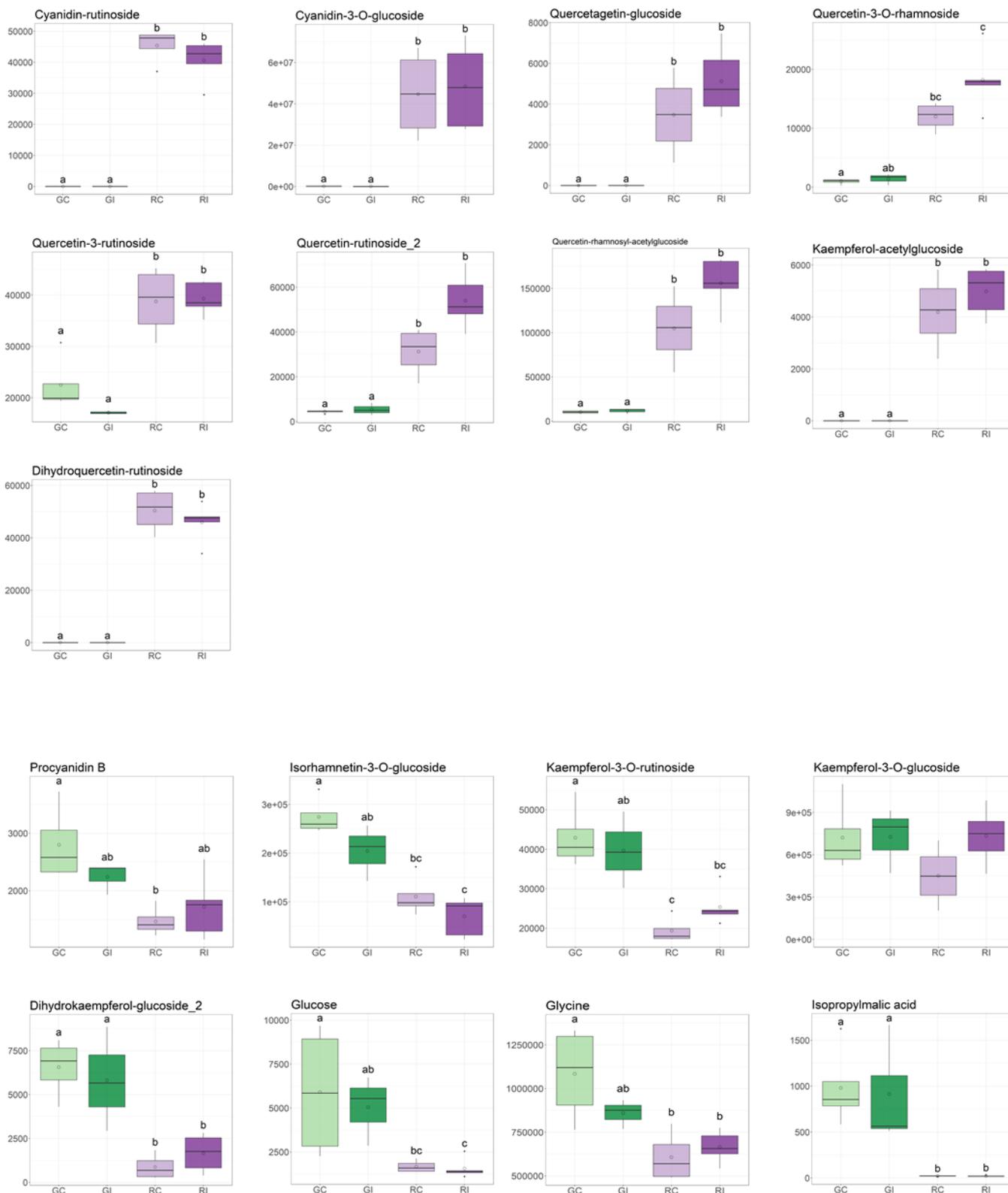
Compound identity	Class (1)	Family	Identification level	GF305-Control		GF305-Infested		Rubira-Control		Rub-Infested		p-value (2)	p-value (3)			Log2 ratios		
				Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		RC / GC	GI / GC	RI / RC			
Dicafeoylquinic acid_2	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	5060 ± 830	a	2883 ± 446	b	1305 ± 370	c	3236 ± 540	b	4.6E-03	9.3E-06	2.5E-03	1.5E-03	-2.0	0.8	1.1
				71128 ± 8811	a	41419 ± 6878	bc	28033 ± 6676	b	52674 ± 11082	c	5.7E-03	2.1E-05	3.6E-03	1.5E-03	-2.0	0.8	0.6
4,5-Dicafeoylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	4224 ± 479	a	2653 ± 529	bc	2052 ± 426	b	2874 ± 287	c	8.2E-03	1.5E-04	2.1E-02	3.2E-02	-1.0	0.3	0.3
				5629 ± 1727	a	3621 ± 717	b	2317 ± 267	c	2975 ± 301	b	3.8E-03	2.6E-06	5.0E-02	7.1E-03	-1.0	0.3	0.3
Coumaroyl-fructosyl-triaetylglicoside_2	II	Hydroxycinnamic acid acetylglicoside esters	[3]	8728 ± 554	a	6147 ± 183	bc	4089 ± 673	b	7083 ± 897	c	4.0E-03	4.8E-06	5.1E-04	2.6E-04	-1.0	0.3	0.3
				133400 ± 27469	a	94135 ± 12820	bc	63577 ± 11666	b	110767 ± 12118	bc	7.0E-03	1.7E-04	1.3E-02	1.1E-03	-1.0	0.3	0.3
3,4-Dicafeoylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[1]	2791 ± 681	a	1980 ± 20	b	1608 ± 324	c	2208 ± 100	d	2.9E-03	1.8E-07	1.7E-05	1.6E-05	-1.0	0.3	0.3
				36066921 ± 5126510	a	25613608 ± 1848593	bc	29331658 ± 2665877	ab	25215603 ± 2194381	c	9.0E-03	5.9E-01	3.5E-03	1.8E-02	-1.0	0.3	0.3
Coumaroyl-diacetylfructosyl-triaetylglicoside_1	I	Amino acids	[3]	8680 ± 271	a	6360 ± 589	b	3156 ± 657	c	6143 ± 1062	b	5.3E-03	1.7E-05	2.6E-02	8.4E-03	-1.0	0.3	0.3
				8670845 ± 1309276	a	6455473 ± 258277	b	5321379 ± 499369	b	7932272 ± 811518	a	6.2E-03	1.4E-04	6.7E-03	5.0E-04	-1.0	0.3	0.3
Caffeoyl-feruloylquinic acid_2	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	45 ± 5	a	34 ± 3	b	32 ± 1	b	57 ± 11	a	6.0E-03	6.3E-03	4.0E-02	1.1E-04	-1.0	0.3	0.3
				1566 ± 159	a	1226 ± 44	b	597 ± 129	c	1147 ± 134	b	5.0E-03	1.3E-05	3.4E-02	9.3E-03	-1.0	0.3	0.3
Threonine	I	Amino acids	[1]	8670845 ± 1309276	a	6455473 ± 258277	b	5321379 ± 499369	b	7932272 ± 811518	a	6.2E-03	1.4E-04	6.7E-03	5.0E-04	-1.0	0.3	0.3
				45 ± 5	a	34 ± 3	b	32 ± 1	b	57 ± 11	a	6.0E-03	6.3E-03	4.0E-02	1.1E-04	-1.0	0.3	0.3
U_Mannopyranose	I	Carbohydrates	[3]	1566 ± 159	a	1226 ± 44	b	597 ± 129	c	1147 ± 134	b	5.0E-03	1.3E-05	3.4E-02	9.3E-03	-1.0	0.3	0.3
				45 ± 5	a	34 ± 3	b	32 ± 1	b	57 ± 11	a	6.0E-03	6.3E-03	4.0E-02	1.1E-04	-1.0	0.3	0.3
Caffeoyl-feruloylquinic acid_1	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	1566 ± 159	a	1226 ± 44	b	597 ± 129	c	1147 ± 134	b	5.0E-03	1.3E-05	3.4E-02	9.3E-03	-1.0	0.3	0.3
				45 ± 5	a	34 ± 3	b	32 ± 1	b	57 ± 11	a	6.0E-03	6.3E-03	4.0E-02	1.1E-04	-1.0	0.3	0.3

**Annexe 11. Metabolites variations induced by infestation in Rubira.** GC: GF305 control; GI: GF305 infested; RC: Rubira control; RI: Rubira infested. The p.value of a Kruskal Wallis test is given, at threshold  $\alpha = 0.05$ . (1) Class : (I), primary metabolites; (II), secondary metabolites; (PH), phytohormones. (2) p-value of a Kruskal Wallis test followed by a Conover (\*) post-hoc test. (3) p-value of Conover post-hoc test for pairwise comparisons of RC vs Gc; GI vs GC; RI vs RC.

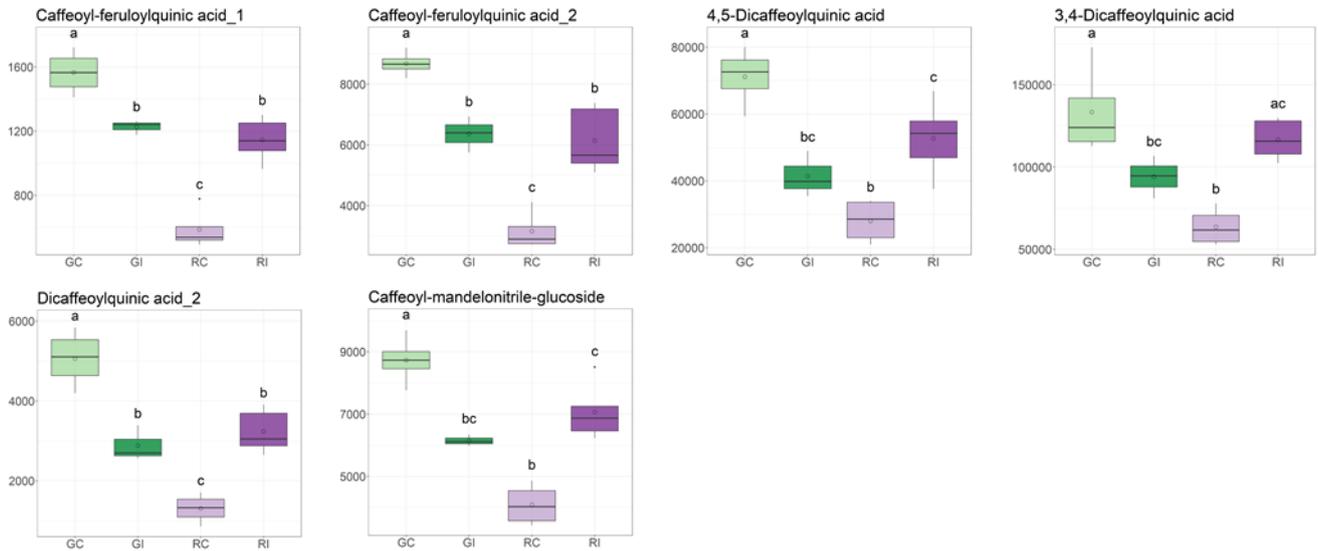
Compound identity	Class (1)	Family	Identification level	GF305-Control		GF305-Infested		Rubine-Control		Rub-Infested		p-value (2)		p-value (3)		Log2 ratios	
				Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	RC vs GC	GI vs GC	RI vs RC	RC/GC	GI/GC	RI/RC
1-Aminocyclohexanecarboxylic (ACC)	PH	Phytohormones	(1)	2943	± 373	1	± 0	1687	± 435	1	± 0	2.4E-03	1.0E+00	8.4E08	0.0	0.0	2.0
	PH	Phytohormones	(1)	5	± 2	3	± 0	10	± 4	10	± 4	5.3E-03	1.7E-03	2.1E05	0.8	0.0	5.7
D_-xetose	I	Carbohydrates	(3)	68156	± 1437	3	± 0	34801	± 15045	34801	± 15045	3.4E-03	1.8E02	5.5E03	1.1	0.6	7.7
	PH	Phytohormones	(1)	5323	± 12482	50697	± 21617	22621	± 10281	22621	± 10281	5.1E-03	5.4E02	1.7E05	1.0	0.2	7.7
Piperonic acid	I	Amino acids	(1)	4051776	± 810644	362241	± 79023	1070174	± 47384	9447349	± 1897727	4.2E-03	3.6E03	4.6E06	1.2	0.0	7.7
	I	Amino acids	(1)	1604388	± 285888	1359335	± 62406	1006969	± 136955	7125451	± 1009886	4.0E-03	1.9E03	3.1E06	1.9	0.2	7.7
Phenylalanine	I	Amino acids	(1)	605667	± 160164	510058	± 85636	647239	± 106531	4193810	± 525276	7.3E-03	1.0E+00	3.3E02	0.1	0.2	7.7
	I	Amino acids	(1)	216537	± 99423	135518	± 25304	353689	± 150835	1977388	± 543867	1.2E-02	1.0E+00	3.3E02	0.1	0.2	7.7
Isoleucine	I	Amino acids	(1)	21	± 3	16	± 1	18	± 4	98	± 14	7.6E-03	7.7E-01	2.9E02	0.7	0.7	2.5
	I	Amino acids	(2)	112	± 38	101	± 22	330	± 86	1554	± 274	4.4E-03	1.2E02	1.7E03	0.2	0.4	2.4
Ornithine	I	Others	(2)	98	± 29	86	± 14	254	± 63	1109	± 193	4.3E-03	1.1E02	2.3E02	0.6	0.2	2.2
	I	Others	(2)	806914	± 116430	612956	± 48917	601808	± 79291	2486207	± 444620	5.5E-03	2.5E02	2.2E02	0.4	0.2	1.1
Beta-alanine	I	Amines	(1)	861317	± 122127	730555	± 105535	389156	± 41982	1448328	± 330659	4.0E-03	1.9E03	7.9E05	0.4	0.4	1.0
	I	Amines	(1)	961917	± 151166	859461	± 95051	372604	± 40406	1341745	± 264958	5.3E-03	1.9E03	3.1E06	1.1	0.2	1.9
Tyrosine	I	Amino acids	(1)	44804	± 7372	43642	± 5912	20913	± 3551	74935	± 11146	4.2E-03	2.8E03	2.4E05	1.1	0.2	1.8
	I	Amino acids	(1)	740443	± 193807	762847	± 96924	876114	± 227755	2889030	± 314015	1.4E-02	3.6E03	4.6E06	1.1	0.0	1.7
Tryptophan	I	Amino acids	(1)	1541	± 477	1410	± 352	1869	± 270	5013	± 907	1.4E-02	8.1E01	3.3E02	0.2	0.0	1.4
	I	Amino acids	(1)	14976871	± 2019159	12765693	± 353155	10455947	± 1414994	26307824	± 3614379	3.6E-03	1.0E+00	4.3E02	0.3	0.1	1.4
Leucine	I	Amino acids	(1)	5060	± 830	2883	± 446	13005	± 370	3236	± 540	4.6E-03	5.6E-01	1.7E06	0.5	0.2	1.3
	I	Amino acids	(3)	172142	± 30108	141076	± 9657	89041	± 15591	204715	± 31138	7.2E-03	2.5E03	1.5E03	2.0	0.8	1.3
Hydroxylysine	I	Hydroxycinnamic acids and derivatives	(1)	576	± 69	505	± 40	502	± 82	1083	± 138	1.2E-02	1.0E+00	3.2E03	0.2	0.3	1.1
	I	Hydroxycinnamic acids and derivatives	(2)	16614220	± 5324113	11939371	± 4338857	4744487	± 1002132	9760207	± 1093698	8.2E-03	1.5E04	2.3E02	1.8	0.5	1.0
Dicaffeoylquinic acid 2	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	(1)														
	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	(1)														
Alpha-aminobutyric acid (AABA)	I	Amino acids	(1)														
	I	Amino acids	(1)														
Benzylglutyranside	II	Others	(2)														
	I	Amino acids	(1)														
Valine	I	Amino acids	(1)														
	I	Amino acids	(1)														



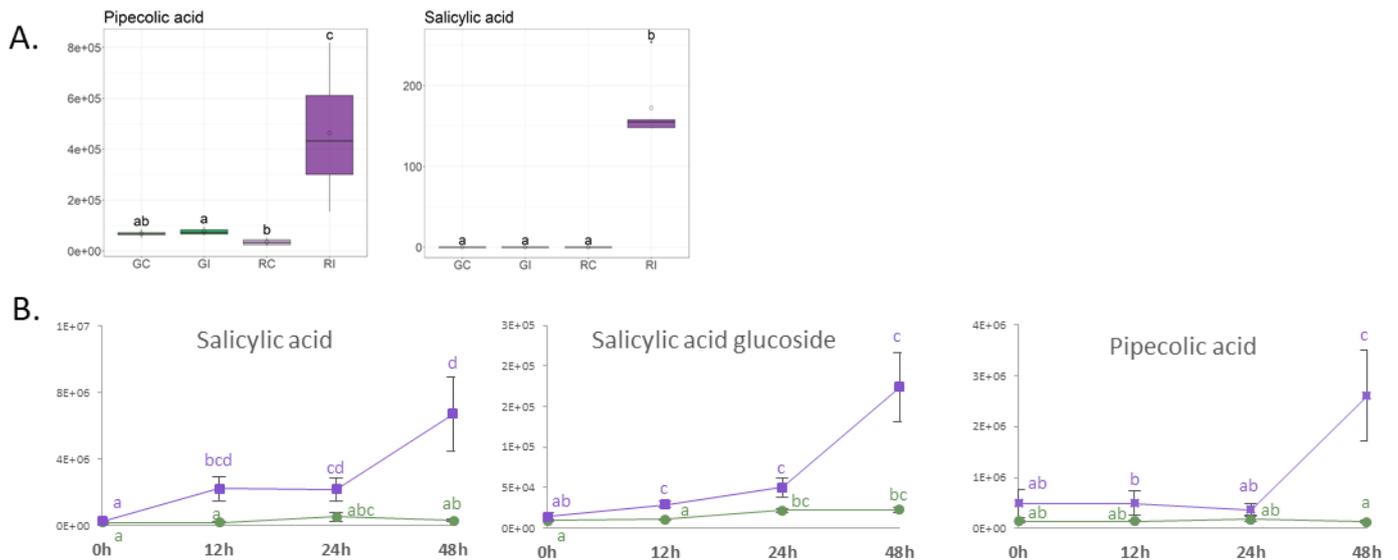
**Annexe 12. Selection of metabolites differentially accumulated between uninfested GF305 and Rubira.** The metabolites belong to the cluster 2.2.2 of the HCA presented in figure 26. Differences between conditions are indicated by letters according to a Conover post-hoc test following a Kruskal Wallis test ( $p$ -value < 0.05). GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.



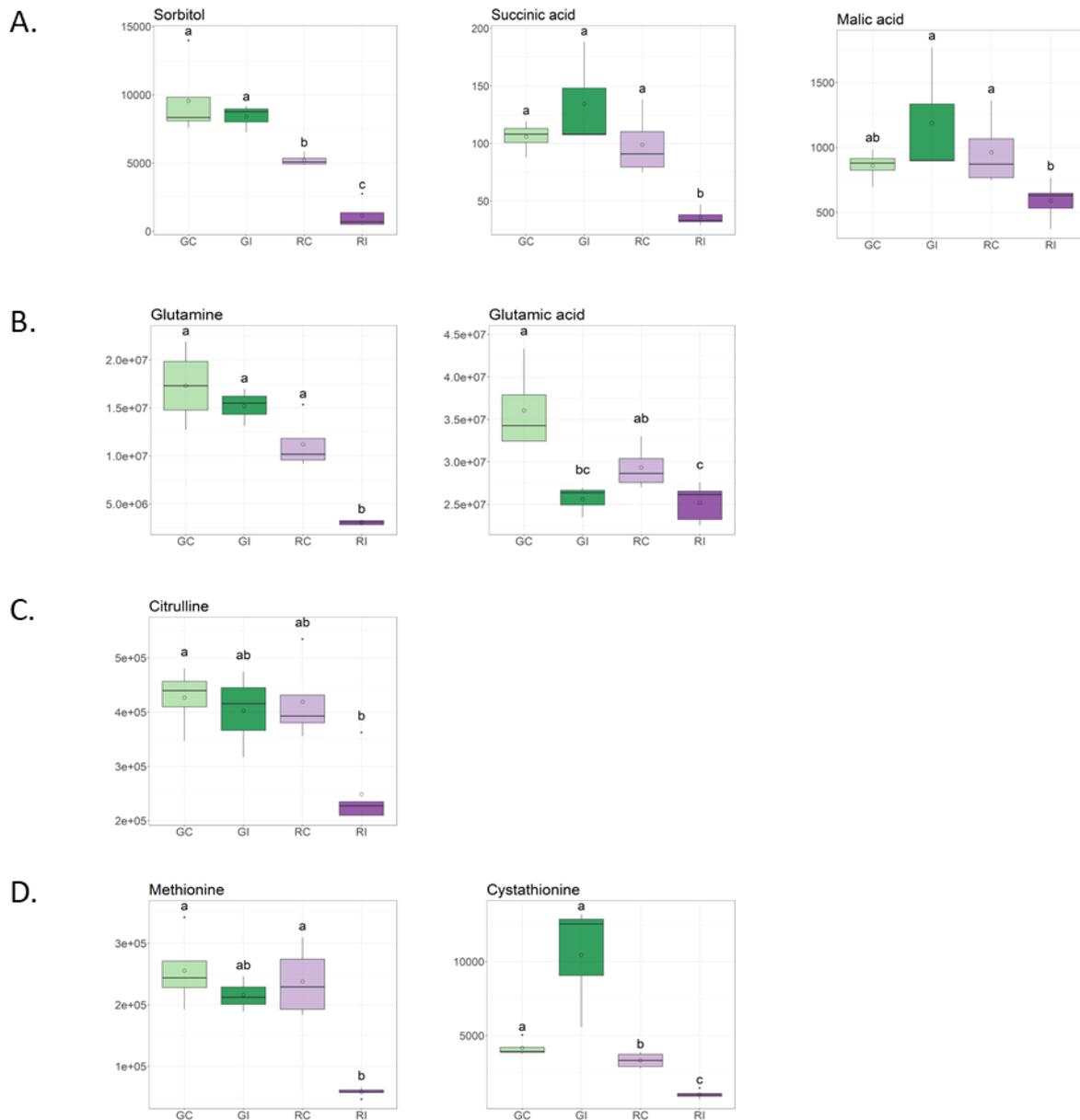
**Annexe 13. Selection of metabolites decreasing 48 hpi in GF305 but increasing in Rubira.** The metabolites belong to the cluster 2.1 of the HCA presented in figure 26. Differences between conditions are indicated by letters according to a Conover *post-hoc* test following a Kruskal Wallis test ( $p$ -value < 0.05). GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.



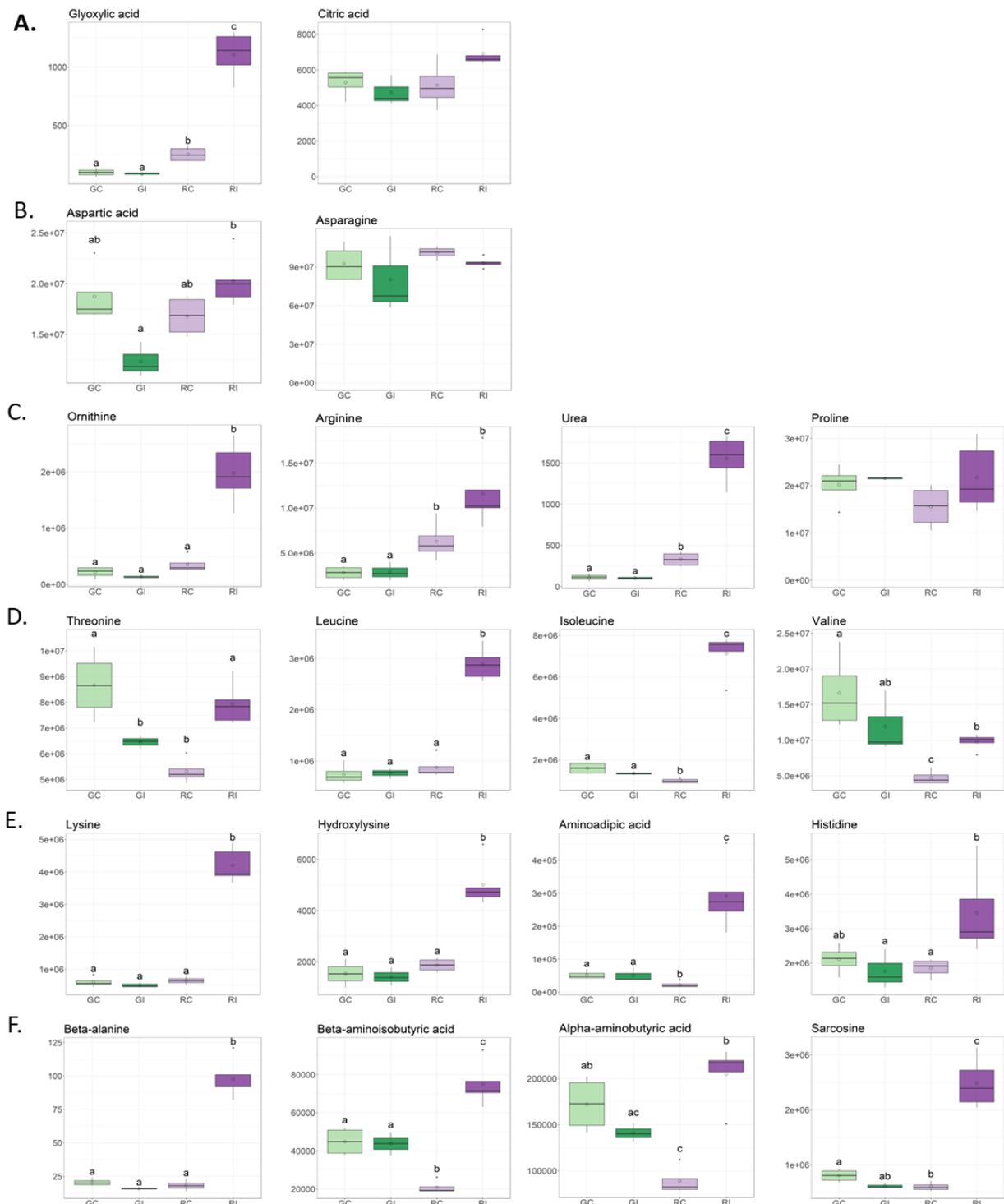
**Annexe 14. Variations of phytohormones. A.** Selection of metabolites increasing 48 hpi in Rubira. **B.** time-course variations of phytohormones from 0 to 48 hpi. Differences between conditions are indicated by letters according to a Conover *post-hoc* test following a Kruskal Wallis test ( $p$ -value < 0.05). GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.



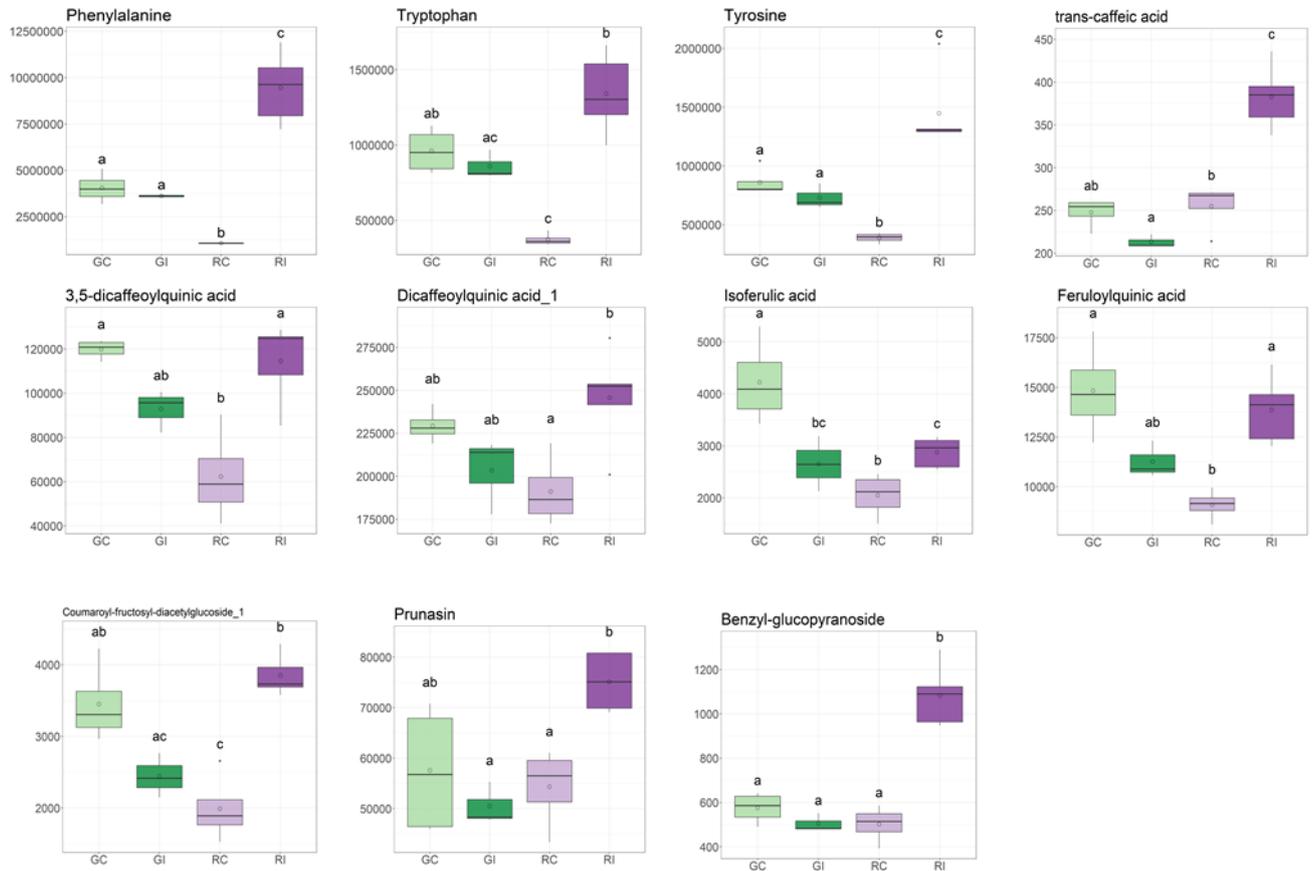
**Annexe 15. Selection of metabolites decreasing 48 hpi in Rubira. A. Central carbon metabolites. B. Central nitrogen metabolites. C. Urea cycle metabolites. D. Sulfur metabolites.** The metabolites belong to the cluster 2.2. of the HCA presented in figure 26. Differences between conditions are indicated by letters according to a Conover post-hoc test following a Kruskal Wallis test ( $p$ -value < 0.05). GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.



**Annexe 16. Selection of primary metabolites increasing 48 hpi in Rubira.** **A.** Central carbon metabolites. **B.** Central nitrogen metabolites. **C.** Urea cycle metabolites. **D.** Branched-chain amino acids. **E.** Lysine metabolisme and histidine. **F.** Other metabolites. The metabolites belong to the cluster 1.1. of the HCA presented in figure 26. Differences between conditions are indicated by letters according to a Conover post-hoc test following a Kruskal Wallis test ( $p$ -value < 0.05). GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.

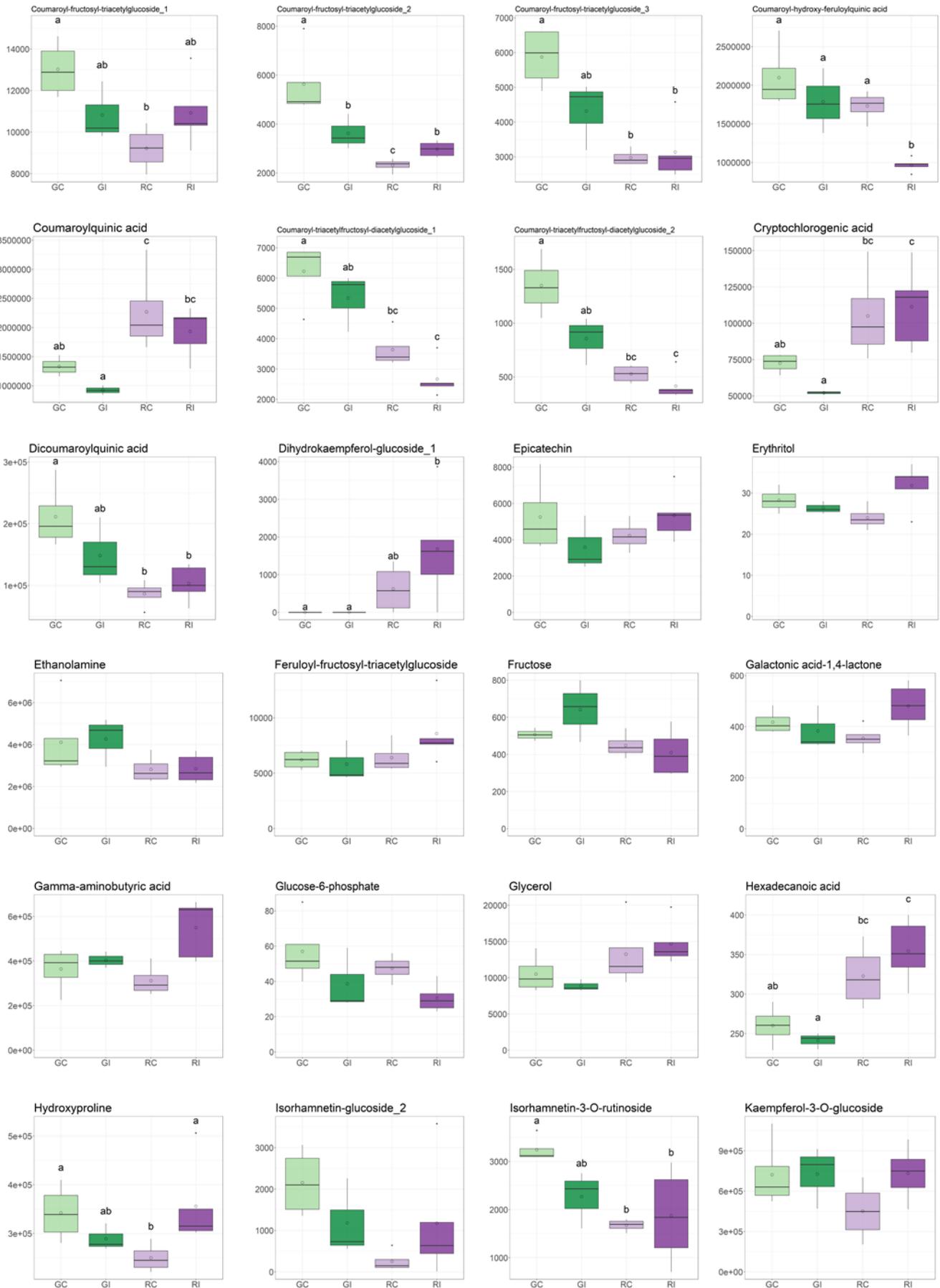


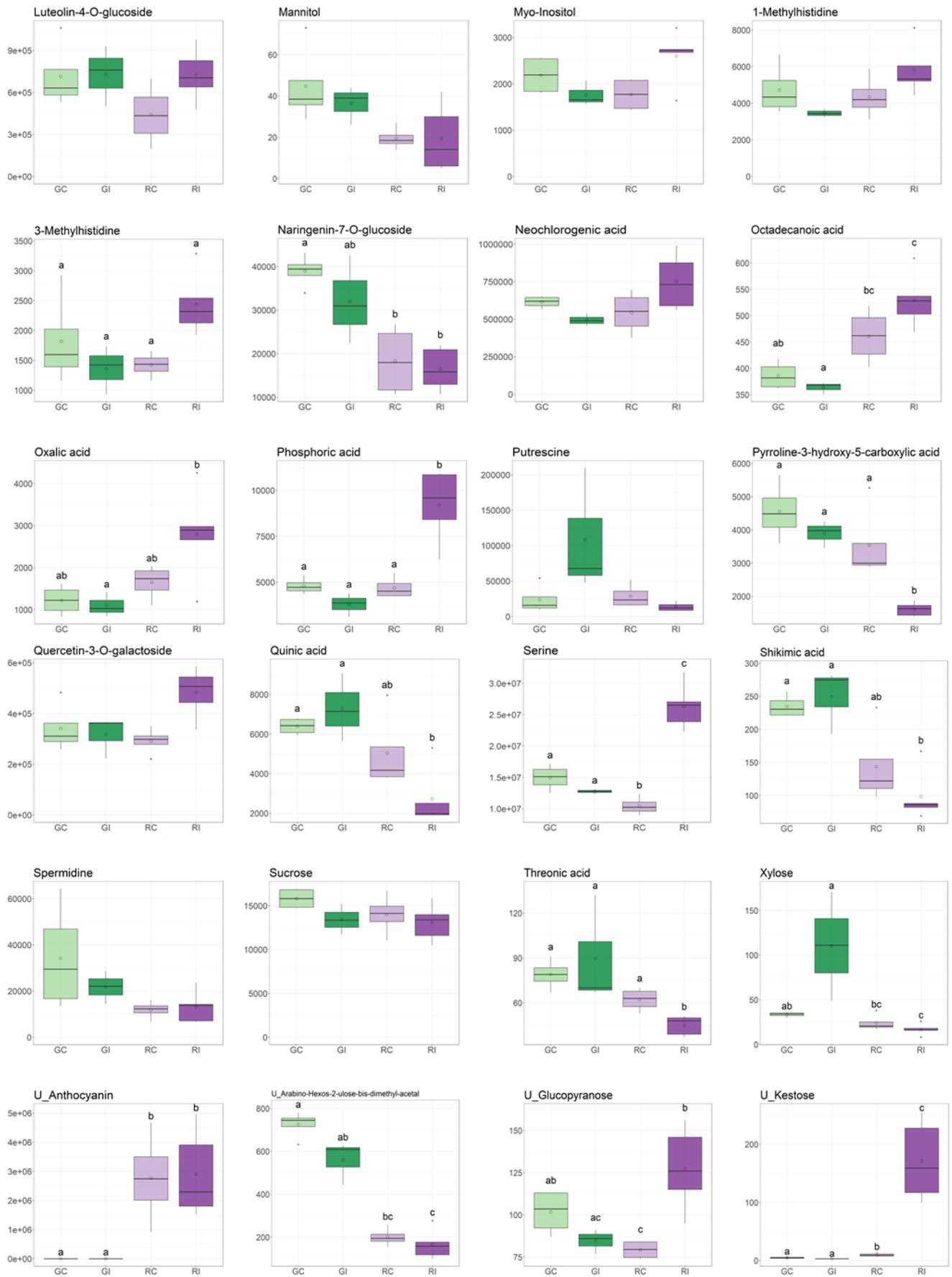
**Annexe 17. Selection of secondary metabolites increasing 48 hpi in Rubira.** The metabolites belong to the cluster 1.1. of the HCA presented in figure 26. Differences between conditions are indicated by letters according to a Conover post-hoc test following a Kruskal Wallis test ( $p$ -value  $< 0.05$ ). GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.

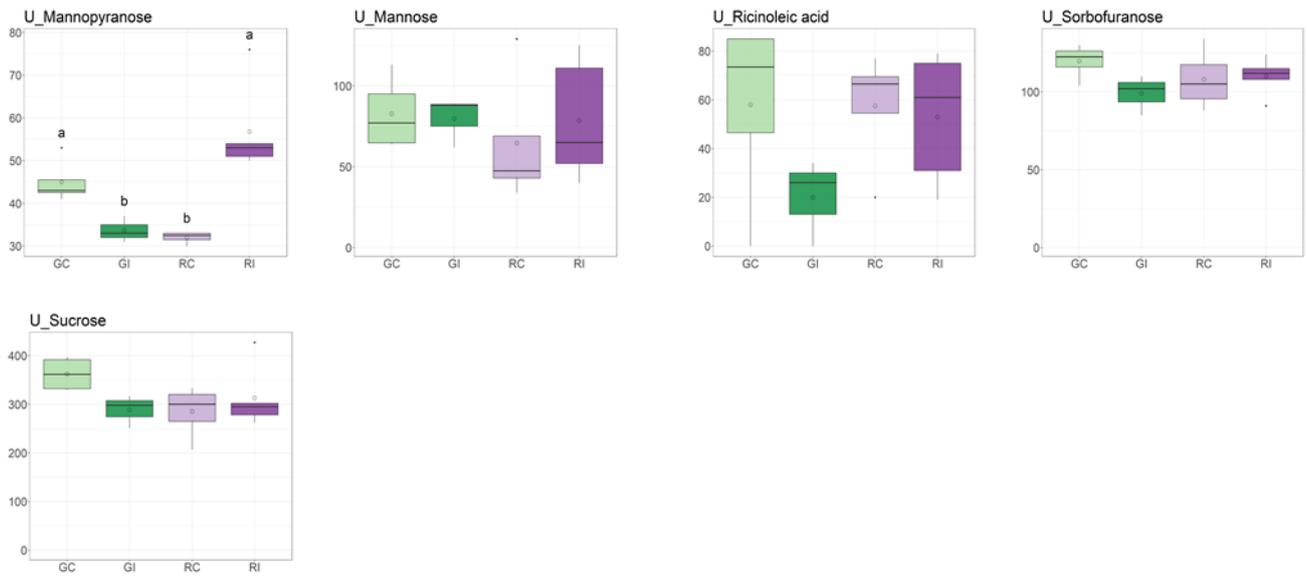


**Annexe 18. Variations of other metabolites 48 hpi.** Differences between conditions are indicated by letters according to a Conover post-hoc test following a Kruskal Wallis test ( $p$ -value < 0.05). GC, GF305 control; GI, GF305 infested; RC, Rubira control; RI, Rubira infested.









#### Annexe 19. Séquence de la PDS et ALD1 choisie pour le VIGS.

##### Phytoème désaturase (PDS) :

5'- AGAAAGCTGAAGAACACATATGATCATCTACTTTTTAGCAGAAGTCCTCTTTTAAGTGTCTATG  
CCGACATGTCCGTAACATGTAAGGAATATTACAATC - 3'

##### AGD2-like defense response protein 1 (ALD1) :

5' – ATGTACAAGTTTCCTGCTAGTACATTAGTGTCCCATGCAATCATATTGCAGCCTGTTATTGTTTCAGGCCGTT  
TCAAGACCCAAAAGGACCTACTTGGTTGTCGTACAAAGGTACCTCGCAATGTAACATGGAGAAATTGCGGAA  
TGGCTATTTGTTTC – 3'

## Résumé

Parmi les nombreux ravageurs auxquels les plantes sont confrontées, les pucerons sont certainement ceux qui causent le plus de dommages aux cultures en raison de leur multiplication rapide, des dégâts directs qu'ils occasionnent et des virus phytopathogènes qu'ils transmettent. Le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*, Sulzer) est un ravageur généraliste qui s'attaque à un large panel de plantes incluant le pêcher, son hôte primaire, mais également de nombreux hôtes secondaires de familles botaniques diverses dont différentes espèces cultivées. Des travaux antérieurs ont mis en évidence des accessions de pêcher présentant une résistance à *M. persicae* conférée par le locus *Rm* et caractérisée par un phénomène d'antixénose qui provoque rapidement le départ des pucerons. L'objectif de notre travail était d'identifier par une approche intégrée de transcriptomique et de métabolomique les facteurs impliqués dans l'expression de la résistance du pêcher à *M. persicae* afin d'aboutir à une description quasi exhaustive des fonctions biologiques activées ou réprimées par l'infestation. Notre démarche a consisté à comparer les réponses à l'infestation de deux génotypes de pêcher, GF305 sensible à *M. persicae* et Rubira porteur du gène de résistance *Rm2*. Nous avons concentré principalement notre étude sur le temps de 48h après infestation qui correspond à la mise en place effective d'une résistance induite par *Rm2*.

L'analyse transcriptomique comparative *via* RNAseq des deux variétés de pêcher a mis en évidence une réponse très limitée de GF305 à l'infestation alors que nous avons observé une reconfiguration profonde du transcriptome chez Rubira. Une tendance similaire a été observée dans les profils métaboliques. Cette reconfiguration transcriptionnelle s'est traduite par une répression de gènes intervenant dans des fonctions de croissance et développement et par une surexpression des gènes de défense ce qui témoigne d'une réorientation du fonctionnement cellulaire au profit de la défense. Cette observation a été confortée par la réduction importante de pools métaboliques de carbone, d'azote et de soufre et par l'accumulation de conjugués d'acide caféique ayant des propriétés anti-appétentes ou toxiques vis à vis des pucerons. Parmi les gènes de défense, la surexpression des récepteurs PRR et NLR suggère une activation conjointe des deux branches du système immunitaire des plantes, PTI et ETI. De plus, l'enrichissement en gènes liés au stress oxydatif, couplé à l'activation de voies métaboliques génératrices de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> telles que la synthèse photorespiratoire de glyoxylate et l'activation du cycle futile P5C/proline, souligne l'implication probable de la synthèse des ROS dans la résistance de Rubira à *M. persicae*. L'apparition de lésions nécrotiques révélatrices d'une réaction hypersensible pourrait également être imputée à un burst oxydatif en réponse à l'infestation. Le déclenchement d'une réponse systémique acquise a également été suggéré par l'activation du métabolisme des acides salicylique et pipécolique. Enfin, l'implication de l'acide pipécolique dans la résistance des plantes aux pucerons étant très peu documentée, nous avons cherché à déterminer le rôle de ce composé dans la résistance du pêcher. Nous avons étudié l'effet d'un apport exogène en acide pipécolique d'une part sur le comportement de fuite de *M. persicae* ainsi que sur le développement des colonies aphidiennes et d'autre part sur le profil métabolique des apex. Bien que cette expérimentation n'ait pas montré la capacité de l'acide pipécolique à induire la résistance, elle a apporté de nouveaux éléments concernant les marqueurs métaboliques inductibles par cette molécule.

En conclusion, ce travail illustre l'ampleur et la complexité de l'expression de la résistance à *M. persicae* conférée par *Rm2* et souligne l'intérêt de l'intégration de données transcriptomiques et métabolomiques pour l'analyse de l'interaction plante/pucerons. Ces connaissances fonctionnelles seront cruciales pour exploiter les sources de résistance naturelles et contrôler durablement les populations aphidiennes.