



HAL
open science

Analyse du métabolisme et modélisation des flux dans des tiges de tomate infectées par *Botrytis cinerea* sous différentes disponibilités en azote

Nathalie Lacrampe

► **To cite this version:**

Nathalie Lacrampe. Analyse du métabolisme et modélisation des flux dans des tiges de tomate infectées par *Botrytis cinerea* sous différentes disponibilités en azote. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2022. Français. NNT : 2022AVIG0603 . tel-04060116

HAL Id: tel-04060116

<https://theses.hal.science/tel-04060116>

Submitted on 6 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.

THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale n° 536 Agrosociences & Sciences

Spécialité / Discipline de Doctorat :
BIOLOGIEUnité de Recherche Plantes et Systèmes de culture Horticoles
INRAE PACAUnité Mixte de Recherche QualiSud
Avignon université

**Analyse du métabolisme et modélisation des flux
dans des tiges de tomate infectées par *Botrytis cinerea*
sous différentes disponibilités en azote**

Présentée par
Nathalie LACRAMPE

Soutenue publiquement le 19/05/2022 devant le jury composé de :

Dr. Marc BARDIN <i>UR Pathologie végétale – INRAE PACA</i>	Président de jury
Dr. Marie-Christine SOULIÉ <i>Institut Jean-Pierre Bourgin – INRAE Versailles-Grignon</i>	Rapporteuse
Pr. Alain BOUCHEREAU <i>UMR 1349 IGEPP – INRAE Bretagne-Normandie – Agrocampus Ouest – Université de Rennes 1</i>	Rapporteur
Dr. Pierre PÉTRIACQ <i>UMR 1332 BFP – INRAE Bordeaux Nouvelle-Aquitaine</i>	Examineur
Dr. Nadia BERTIN <i>UR 1115 PSH – INRAE PACA</i>	Examinatrice
Dr. Raphaël LUGAN <i>UMR Qualisud – Avignon Université</i>	Directeur de thèse
Dr. François LECOMPTE <i>UR 1115 PSH – INRAE PACA</i>	Invité (Co-encadrant de thèse)
Dr. Sophie COLOMBIÉ <i>UMR 1332 BFP – INRAE Bordeaux Nouvelle-Aquitaine</i>	Invitée (Co-encadrante de thèse)

Résumé

L'influence de la nutrition azotée des plantes sur l'intensité des épidémies causées par les champignons pathogènes est liée à des phénomènes multiples, dont les mécanismes sont encore mal connus. Il est cependant acquis que le métabolisme des tissus de la plante hôte, dont l'activité dépend de la disponibilité en azote, participe à la défense des plantes. L'objectif de ce travail était de comparer le métabolisme de plantes saines et de plantes infectées, en utilisant des gradients de nutrition azotée aboutissant à des niveaux variables de développement fongique, afin d'identifier les processus métaboliques favorables à la résistance. Le pathosystème étudié est la tige de tomate infectée par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, qui constitue une des menaces microbiologiques les plus sérieuses pour la production agricole. Les plantes ont été cultivées à cinq niveaux de nutrition azotée, allant d'un déficit sévère (solution à 0.5 mM de NO_3^-) à un excès (solution à 20 mM de NO_3^-), avec des traitements intermédiaires (solutions à 2, 5 et 10 mM de NO_3^-). Le développement des lésions a suivi une courbe asymptotique décroissante en fonction de la nutrition azotée, conformément à plusieurs expériences précédentes. Des échantillons de tige asymptomatiques, exemptes de tissus fongiques, ont été récoltés en bordure des lésions, ou dans des zones équivalentes chez des plantes non inoculées, avant, et 2, 4 et 7 jours après l'inoculation.

Une analyse de transcription de gènes, ciblée sur le métabolisme des principaux sucres solubles (saccharose, glucose, fructose), a permis de montrer une expression différenciée des gènes codant pour les invertases, saccharose synthases, hexokinases, fructokinases et phosphofructokinases. En comparaison des plantes *mock*-inoculées, les plantes infectées par *B. cinerea* ont présenté à bas niveaux d'azote une répression de la majorité des gènes, tandis qu'ils ont été surexprimés à forte nutrition azotée. Un surcroît d'expression précoce d'un gène de saccharose synthase et de phosphofructokinase, qui semblent être spécifiquement induit par l'infection, a été observé chez les plantes les plus résistantes. Un profilage quantitatif et semi-quantitatif des métabolites primaires et secondaires a indiqué, chez les plantes très sensibles, des contrastes importants entre 0.5 mM et 5 mM d'apport de NO_3^- avec une évolution profonde du métabolisme, alors que les plantes moins sensibles, à forte nutrition azotée, ont présenté peu de molécules marqueurs de l'infection. Une analyse de la croissance des portions de tiges étudiées a montré une croissance en masse chez les plantes infectées, par rapport aux plantes saines, d'autant plus forte que l'azote était limitant. Cette croissance s'est cependant accompagnée d'une baisse (à 2 et 5 mM de NO_3^-) ou d'une absence (à 0.5 mM de NO_3^-) de l'accumulation de protéines qui semblent être nécessaires à la défense. Un modèle de flux métaboliques, de type *flux balance analysis* (FBA), a été développé puis contraint avec les données de croissance et les analyses métabolomiques quantitatives. Les flux calculés sont supérieurs au sein du métabolisme central chez les plantes infectées, avec en particulier une activité accrue du métabolisme azoté, de la glycolyse et de la voie des pentoses-phosphates, à carbone importé équivalent. Enfin, des profils hormonaux établis sur les échantillons ont montré des variations de concentrations des hormones associés à la réponse aux stress comme à la croissance. En particulier, suite à l'inoculation, une diminution précoce de la concentration en acide abscissique (ABA) est associée à la sensibilité.

En conclusion, ce travail illustre l'importance de l'adaptation du métabolisme et de ses déterminants (expression génique, signalisation hormonale) dans la réponse de tissus puits tels que les tiges, suite à l'infection par un champignon nécrotrophe, et souligne l'intérêt des approches combinées et intégrées d'expression de gènes, de métabolomique et de fluxomique pour l'analyse de l'interaction plantes-pathogènes. Le stress azoté, qui modifie profondément le métabolisme constitutif ou induit après l'inoculation, est associé à des facteurs de sensibilité et au blocage apparent de certains mécanismes de défense. Mais nos résultats ne permettent pas d'exclure l'hypothèse d'une influence directe du champignon pour perturber les mécanismes de défense, d'une manière différenciée en fonction du niveau de nutrition azotée des plantes.

Abstract

The influence of plant nitrogen nutrition on the intensity of epidemics caused by pathogenic fungi can be associated to multiple causes, and the underlying mechanisms are still poorly understood. However, it is established that the metabolism of the host tissue, which activity is dependent on nitrogen availability, participates in plant defense. The objective of this work was to compare the metabolism of healthy and infected plants, using nitrogen nutrition gradients leading to variable levels of fungal development, in order to identify metabolic processes favourable for resistance. The system studied was tomato stems infected with the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*, one of the most serious microbiological threats to agricultural production. Plants were grown under five nitrogen nutrition levels, ranging from severe deficit (0.5 mM NO₃⁻ solution) to excess (20 mM NO₃⁻ solution), with intermediate treatments (2, 5, and 10 mM NO₃⁻ solutions). Lesion development followed an asymptotically decreasing curve with the increase in nitrogen nutrition, in accordance with several previous experiments. Asymptomatic stem samples, free of fungal tissues, were harvested near the lesions, or in equivalent areas on mock-inoculated plants, before, and 2, 4, and 7 days after inoculation.

A gene transcription analysis, targeted on the metabolism of main soluble sugars (sucrose, glucose, fructose), showed a differential expression of genes encoding for invertases, sucrose synthases, hexokinases, fructokinases and phosphofructokinases. Compared to mock-inoculated plants, plants infected with *B. cinerea* presented at low nitrogen levels a repression of the majority of genes, while they were over-expressed at high nitrogen nutrition. An early over-expression of a sucrose synthase and a phosphofructokinase gene, which seems to be specifically induced by the infection, was observed in the most resistant plants. Quantitative and semi-quantitative profiling of primary and secondary metabolites indicated, in highly susceptible plants, significant contrasts between 0.5 mM and 5 mM NO₃⁻ supply, with major changes in metabolism, whereas less susceptible plants, under high nitrogen nutrition, showed only few infection-related molecules. A growth analysis of the studied stem portions showed a mass growth of infected plants, compared to healthy ones, all the more strong that nitrogen was limiting. However, this growth was accompanied by a decrease (under 2 and 5 mM NO₃⁻) or an absence (under 0.5 mM NO₃⁻) of protein accumulation that appears to be necessary for defence. A flux balance analysis (FBA) model of metabolic fluxes was developed and then constrained with growth data and quantitative metabolomics analyses. The calculated fluxes were higher within the central metabolism of infected plants, with a particular increased activity of nitrogen metabolism, glycolysis and pentose-phosphate pathway, when fluxes are calculated per unit of imported carbon. Finally, hormonal profiles established on the samples showed variations of concentrations of hormones associated to stress responses as well as growth. In particular, following inoculation, an early decrease in abscisic acid (ABA) concentration was associated with susceptibility.

In conclusion, this work illustrates the importance of metabolic adaptations and their determinants (gene expressions, hormonal signalling) in the response of sink tissues such as stems, following infection by a necrotrophic fungus. It points out the interest of combined and integrated genes expression, metabolomics and fluxomics approaches for the analysis of plant-pathogen interactions. Nitrogen stress, which deeply alters constitutive or induced metabolism after inoculation, is associated with susceptibility factors and apparent blockage of some defence mechanisms. However, our results cannot exclude the hypothesis of a direct influence of the fungus to disrupt the host defense mechanisms, in a differentiated way according to the level of nitrogen nutrition.

Remerciements

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement, mon encadrant principal, François Lecompte, qui a accepté de me confier ce projet. Son enthousiasme scientifique m'a poussé à aller toujours plus loin. Sa bienveillance, sa patience dans les moments difficiles et sa disponibilité tout au long de la thèse et pendant la rédaction de ce manuscrit, m'ont permis d'aller au bout de ce projet. Je tiens également à saluer tous les efforts qu'il a fournis pour que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie Raphaël Lugan, mon directeur de thèse, qui m'a appris, la rigueur et la maîtrise des analyses métabolomiques, de la préparation d'échantillons aux analyses multivariées, en passant par la préparation des machines, avec le concept du « un peu mais pas trop ».

J'adresse également mes remerciements à Sophie Colombié, qui a joué un rôle majeur dans l'encadrement de cette thèse, pour son expertise dans la réalisation du modèle, pour avoir toujours avoir été disposée à m'aider avec gentillesse et bonté, et pour son accueil chaleureux lors de mes séjours à Bordeaux. Je tiens à saluer son implication dans ce projet, bien au-delà de ce qui avait été initialement convenu. Je la remercie d'avoir corrigé l'ensemble de mes productions scientifiques. J'ai également apprécié ses nombreux et précieux conseils qui m'ont permis de m'améliorer tout au long de ma thèse.

Je remercie chaleureusement Caroline Baroukh, Mathilde Fagard et Jean-Charles Martin d'avoir répondu présent lors de la formation du comité de suivi de thèse. Leurs conseils ont été très appréciés.

Je remercie également Félicie Lauri et David Roux pour leur soutien lors de mes premiers pas dans l'enseignement. Merci à Félicie pour ses conseils bienveillants lors de mon arrivée à l'université d'Avignon.

Je souhaite profondément remercier Doriane Dumont et Patricia Laugier qui, en plus de me transmettre leurs expertises techniques, m'ont accueilli avec bonne humeur au sein du laboratoire de PSH et des pauses repas.

Je remercie Amira Beroueg, condisciple doctorante de PSH, pour les heures passées à discuter et à se plaindre de notre sort, pour l'entraide et le réconfort dont elle a fait preuve, et par-dessus tout, pour m'avoir fait découvrir les pâtisseries tunisiennes. Merci également à Céline Caboche, dont l'espace vital de travail a été envahi, mais qui a fini par se faire amadouer. Votre amitié m'est très précieuse. Un grand merci aux doctorants de l'université d'Avignon, en particulier Coline Pons, Pauline Le Boulch et Salah Fgaier, avec qui j'ai partagé plus qu'un bureau. Les soirées couscous et autres joyeusetés ont illuminé les semaines d'analyse et de traitement de données.

Enfin, merci à mes parents pour m'avoir protégé et encouragé tout au long de ma vie et de mes études. J'espère vous rendre fier.

Table des matières

Chapitre I

1

Interactions plantes-pathogènes et considérations métaboliques

1. Interaction entre plante hôte et agent pathogène	5
1.1. Mécanismes de défense des plantes	5
1.1.1. Défense constitutive	5
1.1.1.1. Barrières structurales	5
1.1.1.2. Barrières chimiques : Phytoanticipines	6
1.1.2. Défense inductible	7
1.1.2.1. Mécanismes de perception des agents pathogènes	7
1.1.2.2. Voies de signalisation	8
1.1.2.3. Signalisation hormonale	10
1.1.2.4. Réponses de défense	12
1.2. Stratégies de neutralisation des défenses par des agents pathogènes	15
1.2.1. L'agent pathogène <i>Botrytis cinerea</i>	15
1.2.1.1. Développement et propagation	16
1.2.1.2. Contrôle de la maladie	16
1.2.2. Mécanisme d'infection de <i>Botrytis cinerea</i>	18
1.2.2.1. Structures spécialisées de pénétration de la surface des plantes	18
1.2.2.2. Enzymes de dégradation de la paroi	19
1.2.2.3. Production de ROS	20
1.2.2.4. Sécrétion de protéases	20
1.2.2.5. Sécrétion de protéines cérato-platanines	21
1.2.2.6. Sécrétion d'acide oxalique	21
1.2.2.7. Sécrétion de toxine	22
1.2.2.8. Système de détoxification	23
1.2.2.9. Sécrétion de petits ARN	23
1.2.2.10. Perturbation de la signalisation hormonale de l'hôte	24
1.3. Dualité de la résistance	24
2. Importance des ressources carbonées et azotées dans le métabolisme	25
2.1. Assimilation du carbone	25
2.2. Assimilation de l'azote	26
2.3. Devenir du carbone et de l'azote	28
2.4. Rétrocontrôle	29
3. Rôle du métabolisme dans la défense des plantes	32

3.1. Implication du métabolisme primaire et secondaire dans la défense	32
3.2. Effet de l'environnement sur l'interaction plante-pathogène	34
4. Modélisation des flux métaboliques	36
5. Problématique de recherche	40
Références	42

Chapitre II 49

Matériels et méthodes

1. Production du matériel biologique	50
1.1. Croissance des plantes en serre	50
1.2. Transfert des plantes en chambre de culture et inoculation	52
1.3. Inoculation des plantes	53
1.3.1. Préparation de l'inoculum de <i>Botrytis cinerea</i>	53
1.3.2. Inoculation des plantes	53
1.4. Échantillonnage	54
2. Prérequis au dosage des métabolites	54
2.1. Appareils utilisés	55
2.2. Portée de l'analyse	55
2.2.1. Métabolites polaires	56
2.2.2. Métabolites apolaires	56
2.2.3. Acides gras	56
2.2.4. Acides aminés	57
2.2.5. Composés phénoliques	57
2.2.6. Glycoalcaloïdes	57
2.2.7. Phytohormones	57
2.2.8. Autres composés	58
2.3. Choix de la méthode d'extraction	58
2.3.1. Extraction de Bligh and Dyer	58
2.3.1.1. Nombre de molécules détectées	59
2.3.1.2. Répétabilité	60
2.3.1.3. Quantités extraites	60
2.3.1.4. Pourcentage de recouvrement	60
2.3.2. Extraction des acides gras	61
2.3.2.1. Méthode d'extraction	61
2.3.2.2. Choix du matériel	62
2.3.2.3. Extraction liquide-liquide – Récupération des FAMES	62
2.3.2.4. Trans-estérification des N-acyl lipides	63

2.3.2.5. Excès de réactif	64
2.3.2.6. Pourcentage de recouvrement	64
2.4. Quantification absolue	65
2.4.1. Standard interne	65
2.4.2. Calibration externe	65
Références	66
Annexe II	67

Chapitre III 81

Regulation of sugar metabolism genes in the nitrogen-dependent susceptibility of tomato stems to *Botrytis cinerea*

Article	83
Annexe III	95

Chapitre IV 100

A metabolomic perspective on nitrogen-modulated resistance to *Botrytis cinerea* in tomato stems (*Solanum lycopersicum*)

1. Introduction	103
2. Results	106
2.1. N availability determines the metabolic profile before infection	106
2.2. The metabolome of lesion-surrounding tissues of resistant plants is hardly affected by the infection with <i>B. cinerea</i>	107
2.3. Contrasted effects of <i>B. cinerea</i> infection in severely and moderately N-deficient plants	108
3. Discussion	109
3.1. N-starvation impairs growth, water status and increases C / N ratio	109
3.2. Only a few metabolic changes are induced by <i>B. cinerea</i> regardless of N status	111
3.2.1. Galactinol and myo-inositol depletion are revealing of redox disruption after infection	111
3.2.2. Alanine accumulates as a symptom of hypoxia induced by the fungus	113
3.3. Massive reconfigurations occur in the central metabolome upon infection of susceptible plants	114
3.3.1. Glycosyls and TCA cycle activation upon infection could contribute to defense	114
3.3.2. Low-N susceptible plants display atypical glutamate and aspartate accumulation following infection	115

3.4. Defence metabolic pathways are activated by <i>B. cinerea</i> in susceptible plants ..	118
3.4.1. Glutathione	118
3.4.2. Phenolic compounds	119
3.4.3. Steroidal glycoalkaloids	120
3.4.4. Polyamines and GABA	121
3.4.5. Branched-chain amino acids	123
3.4.6. Phytosterols	124
3.5. N-deficiency impairs constitutive and inducible N-related defences	125
4. Conclusions	126
5. Methods	127
5.1. Plant materials	127
5.2. Growth parameters	127
5.3. Chemicals	128
5.4. Metabolites extraction	128
5.5. GC-EI-TOF Analysis	129
5.6. UPLC–DAD–ESI–TQ Analysis	129
5.7. HPLC-FLR Amino acids	131
5.8. Other analysis	131
5.9. Data processing	132
5.9.1. GC-MS	132
5.9.2. Statistics	132
6. Acknowledgments	133
7. Author contributions	133
Références	134
Annexe IV	141

Chapitre V

151

Estimation des flux métaboliques par modélisation sous contraintes

1. Introduction	152
2. Matériels et méthodes	155
2.1. Matériel biologique	155
2.2. Quantification des pools métaboliques et des constituants de la biomasse	155
2.3. Reconstruction du réseau métabolique de tige de tomate	156
2.3.1. Voies et réactions implémentées	157
2.3.2. Réactions d'échanges	158
2.3.3. Matrice de stœchiométrie	159
2.4. Résolution des flux	159

2.4.1. Loi de conservation de la masse	159
2.4.2. État pseudo-stationnaire	160
2.4.3. Fonction objectif	161
2.4.4. Application des contraintes expérimentales	162
2.4.4.1. Flux externes	162
2.4.4.2. Contrainte appliquée à un flux interne	163
2.4.4.3. Expression des flux	163
3. Résultats et discussion	163
3.1. Biomasse expliquée	163
3.2. Croissance	164
3.3. Flux en condition optimale de croissance	165
3.4. Contraste des flux pour les 10 conditions	166
3.5. Assimilation différentielle de carbone et d'azote	167
3.6. Voies métaboliques qui diffèrent selon les traitements	168
3.7. Modification du métabolisme central carboné	170
4. Conclusion	172
Références	175
Annexe V	178

Chapitre VI 191

Effet de la nutrition azotée et de l'infection par *Botrytis cinerea* sur la teneur en phytohormones dans les tiges de tomate

1. Introduction	192
2. Matériel et méthodes	195
3. Résultats	197
3.1. Les niveaux d'hormones avant inoculation traduisent le gradient de nutrition azotée	197
3.2. L'infection par <i>B. cinerea</i> modifie profondément les profils hormonaux des tissus asymptomatiques proximaux	198
3.3. Le niveau d'ABA après infection est corrélé négativement à l'intensité des symptômes	199
4. Discussion	199
Références	204

Chapitre VII 209

Discussion générale et perspectives

Références	217
------------------	-----

Chapitre I

Interactions plantes-pathogènes
et considérations métaboliques

Nathalie Lacrampe

Les plantes, comme tous les organismes, sont contraintes de s'adapter à leur environnement, mais leur caractère sessile confère des particularités à ces adaptations. Les plantes doivent capter les ressources nécessaires à la réalisation des fonctions de croissance, de stockage, de reproduction et d'adaptation à cet environnement. Elles sont assujetties aux variations climatiques et doivent faire face aux agents pathogènes (champignons, bactéries et virus) et ravageurs. Elles doivent également s'adapter à la compétition intra- et inter-espèce pour les ressources.

Il est généralement admis que la défense face aux bioagresseurs a un coût en nutriments et en énergie. En effet, la défense des plantes implique l'activation des cascades de signalisation de gènes de défense et la synthèse de composés secondaires ce qui engendre souvent une perte de biomasse ou de fitness de la plante (Bergelson and Purrington 1996; Heil and Baldwin 2002; Tian *et al.* 2003). En conséquence, les processus de défense ne sont pour l'essentiel activés qu'en cas de nécessité. En absence d'agents pathogènes les défenses sont maintenues au minimum (défense constitutive) afin de favoriser les autres fonctions, en particulier la croissance. Dans le cas où ces défenses constitutives sont insuffisantes, les agents pathogènes sont détectés par la plante hôte et déclenchent des mécanismes de défense spécifique, appelée défense induite.

Les plantes sont en présence d'une multitude d'agents pathogènes mais la majorité d'entre eux n'aboutissent pas à une infection. En effet, dès leurs premiers contacts avec les plantes ces microorganismes se retrouvent face à des barrières physiques et chimiques les empêchant de pénétrer dans les tissus de la plante hôte pour accéder à leurs ressources. La résistance peut également être issue de la perception précoce par la plante de motifs très conservés présents à la surface des microorganismes. Ces résistances dites « non hôte » sont observées face à des organismes non adaptés (Jones and Takemoto 2004). Bien que celles-ci soient très efficaces, chaque plante est sensible à un petit nombre d'agents pathogènes. En effet, certains agents pathogènes ont développé différentes stratégies de virulence leur permettant de contourner les défenses des plantes. Le développement épidémique est la résultante des processus mis en place par la plante pour se défendre et de ceux mis en œuvre par le pathogène pour les contourner ou les abolir.

Après avoir contourné la résistance « non hôte » certains agents pathogènes peuvent se retrouver face à des mécanismes de reconnaissance et de défense très spécifiques de nature

mono- ou oligo-génique aboutissant à une réponse qualitative conduisant à deux phénotypes distincts où la plante est soit malade soit saine. La résistance qualitative est souvent associée à certains agents pathogènes biotrophes qui se nourrissent de tissus vivants et donc développent des mécanismes pour éviter que la plante ne les détecte et mette en place des mécanismes de défense (Zhang *et al.* 2013). D'autres agents pathogènes provoquent chez la plante, la mise en place d'une résistance quantitative conduisant à un panel de phénotypes allant de la sensibilité à la résistance avec une multitude d'intermédiaires (Poland *et al.* 2009). Les agents pathogènes nécrotrophes tuent les cellules de leurs hôtes pour se nourrir. Face à eux, la nature de la résistance est plus généralement quantitative.

Le métabolisme se définit comme l'ensemble des transformations chimiques, d'énergie et de matière se déroulant dans les systèmes vivants. Il permet d'alimenter toutes les fonctions d'un organisme tel que la croissance, la reproduction, le maintien des structures et l'adaptation à l'environnement. Celui-ci peut se décomposer en un métabolisme primaire, correspondant aux voies de synthèse des composés indispensables à la croissance, au développement et à la reproduction, et un métabolisme secondaire correspondant aux voies de synthèse des composés nécessaires à l'adaptation de la plante à son environnement, même si cette classification peut être considérée inadaptée (Rontein *et al.* 2002; Erb and Kliebenstein 2020). Les mécanismes du métabolisme primaire sont très conservés entre les espèces tandis que le métabolisme secondaire est constitué de plusieurs milliers de composés différents d'une espèce à l'autre.

La plante se défend par la production de protéines impliquées dans la perturbation des fonctions cellulaires ou de composés toxiques pour le pathogène mais elle assure dans le même temps le maintien de l'homéostasie cellulaire (maintien du pH, du statut redox, *etc.*). Le statut métabolique de tous les organismes dépend des ressources disponibles et assimilables dans l'environnement. Pour se défendre, une plante qui détecte un agent pathogène adapte son métabolisme à partir d'un état initial conditionné par ses ressources. La sensibilité aux agents pathogènes dépend donc d'une part de la configuration métabolique au moment de l'attaque et d'autre part des ressources disponibles nécessaires à l'adaptation de ce métabolisme initial. Parmi les ressources influençant le métabolisme, l'azote joue un rôle essentiel, car il est le composant principal, avec le carbone, l'hydrogène et l'oxygène, d'un grand nombre de molécules.

L'effet des ressources azotées des plantes sur leur sensibilité aux agents pathogènes est complexe parce que l'azote influence non seulement le métabolisme, la structure et l'architecture des plantes, mais aussi parce que l'azote est détourné par les agents pathogènes pour leur croissance. Il est admis qu'en général une augmentation d'azote favorise l'infection par un biotrophe mais cela n'est pas aussi clair en ce qui concerne les nécrotrophes. Par exemple, *Botrytis cinerea*, champignon nécrotrophe modèle très étudié sur différentes espèces de plantes, est favorisé par une augmentation de la fertilisation azotée sur feuille de fraisier et de laitue mais est défavorisé sur feuille et tige de tomate (Lecompte *et al.* 2010, 2013). Cette opposition amène à s'interroger sur les différences de fonctionnement métaboliques entre les organes et notamment entre les organes sources et les organes puits, chacun ayant leurs spécificités et leurs capacités de défense propres. Une question difficile à résoudre est d'évaluer la part de l'adaptation métabolique dans la résistance.

Pour traiter cette question, l'hypothèse émise est que l'état initial du métabolisme ainsi que sa capacité d'adaptation permettent de prédire, au moins partiellement, le niveau de résistance. Dans ce travail, on s'intéresse au pathosystème tige de tomate / *Botrytis cinerea* qui représente un enjeu agroéconomique majeur. La tomate, premier légume-fruit cultivé au monde, est sensible au champignon nécrotrophe *B. cinerea* dont l'infection en serre se produit généralement sur des tissus nécrotiques ou des plaies d'effeuillage. La propagation sur les tiges peut conduire à la mort de la plante, et l'intense sporulation consécutive au développement des lésions favorise l'infection des plantes voisines, pouvant causer la perte partielle ou totale de la culture. Ce travail de thèse consiste à moduler la sensibilité des tiges de tomate à *B. cinerea* par un gradient de fertilisation azotée pour étudier les évolutions métaboliques qui sont favorables à la résistance, à l'aide d'analyses d'expression de gènes, d'analyses métabolomiques (ciblées et non ciblées), et enfin à l'aide de la modélisation (sous contraintes) de flux métaboliques.

La suite de ce chapitre présente une synthèse bibliographique sur (1) les mécanismes moléculaires de l'interaction plante-pathogène, (2) le métabolisme, en particulier les ressources carbonées et azotées, (3) le rôle du métabolisme dans la défense des plantes et enfin (4) la modélisation métabolique des flux dans ce contexte.

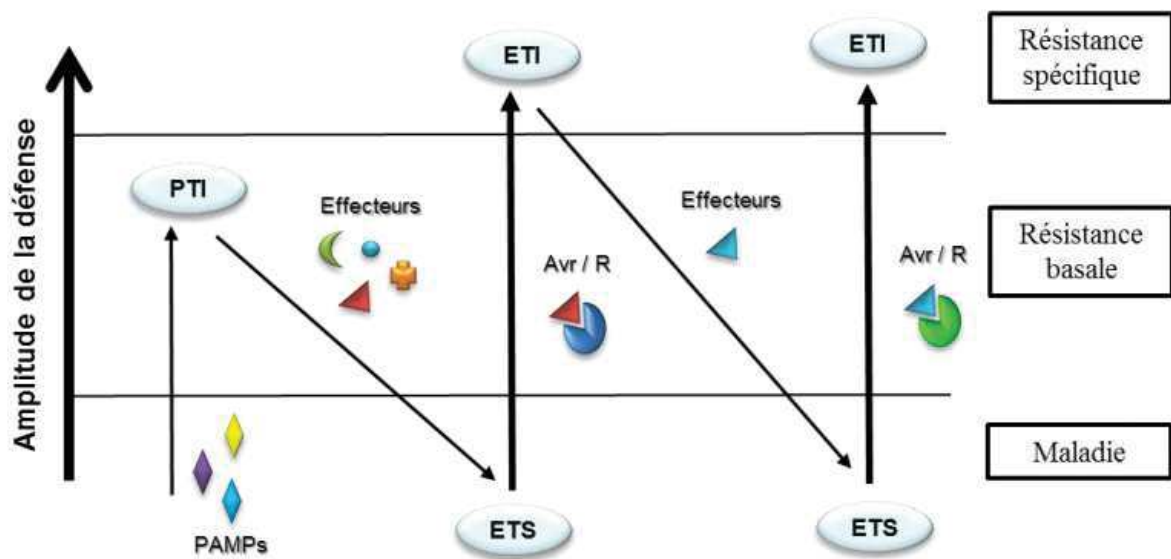


Figure I.1 : Modèle en zig-zag

Ce modèle illustre le système immunitaire des plantes et la coévolution des mécanismes de défense et d'attaque des plantes et des agents pathogènes. PTI, *PAMP-triggered immunity* ; ETS, *effector-triggered susceptibility* ; ETI, *effector-triggered immunity*. (D'après Jones and Dangl 2006)

1. Interaction entre plante hôte et agent pathogène

1.1. Mécanismes de défense des plantes

La coévolution des agents pathogènes et des plantes entraîne le développement continu de nouvelles stratégies d'attaques et de survie pour les deux partenaires de l'interaction. Le modèle dit « en zig-zag » (Figure I.1), d'écrit par Jones et Dangl (2006), permet d'illustrer les différents niveaux de résistance présents chez les plantes, leurs efficacités et leurs spécificités. Un premier niveau de résistance basale (ou PTI pour *PAMP-triggered immunity*), peu spécifique et peu intense, permet de limiter la propagation de nombreux pathogènes. En réponse à cela, les pathogènes ont mis en place des systèmes leur permettant de contourner ce premier niveau de défense. Cela engendre une sensibilité des plantes au pathogène appelée *effector-triggered susceptibility* (ETS). Un second niveau de défense (ou ETI pour *effector-triggered immunity*), plus spécifique au pathogène, permet aux plantes de résister à cette nouvelle attaque. En réponse à ces mécanismes de défense, les pathogènes vont à leur tour trouver de nouvelles armes pour combattre et/ou déjouer les défenses des plantes, qui mettront à nouveau tout en œuvre pour trouver une nouvelle parade.

1.1.1. Défense constitutive

Le premier niveau de défense des plantes est constitué par des barrières physiques et chimiques préexistantes qui ont pour fonction d'empêcher les micro-organismes de pénétrer les tissus de l'hôte. Il s'agit de mécanismes de défense passifs et constitutifs.

1.1.1.1. Barrières structurales

Les organes végétaux sont recouverts de structures extracellulaires telles que la cuticule et la paroi (à base de lignine et de subérine) qui régulent les échanges entre la plante et son environnement en jouant le rôle de barrière, de transport et de perméabilité pour les agents pathogènes (Nawrath *et al.* 2013). La cuticule est composée d'un squelette de cutine qui est un polyester composé de monomères lipidiques et de glycérol. Ce polymère hydrophobe constitue une barrière protectrice pour la plante vis à vis de son environnement (limitation des pertes d'eau, protection contre les pathogènes, bouclier contre l'excès d'UV, *etc.*) (Yeats and Rose 2013). Les polymères structuraux de la paroi végétale tel que la lignine assurent

également une protection passive très efficace. La lignine dont la composition est variable entre les organismes et les tissus, est un polymère de monolignols (synthétisés à partir de la phénylalanine) dont les majeurs sont l'alcool p-coumaroyl, l'alcool conniféryl et l'alcool syringyl (Boerjan *et al.* 2003). La présence de lignine rend la paroi cellulaire plus résistante à la pression mécanique et moins accessible aux enzymes de dégradation de la paroi cellulaire sécrétés par certains pathogènes (Jayamohan and Kumudini 2011). En outre, certaines espèces de plante possèdent des structures spécialisées qui les protègent contre les agents pathogènes et les herbivores tel que les épines ou les trichomes (Gutschick 1999). Ces derniers peuvent sécréter des composés de défense toxiques ou répulsifs contre ces bioagresseurs.

1.1.1.2. Barrières chimiques : Phytoanticipines

Les phytoanticipines sont des métabolites secondaires toxiques contre un grand nombre d'agents pathogènes. Ces molécules peuvent être constitutivement présentes dans les plantes saines ou synthétisées après infection à partir de composés précurseurs (VanEtten *et al.* 1994). Afin de limiter leur toxicité pour la plante, certains de ces métabolites sont présents en surface, d'autres sont stockés sous forme inactive puis activés après attaque, enfin certains peuvent être séquestrés dans la vacuole ou dans les trichomes avant d'être libérés lors de la décompartmentation cellulaire. Différents métabolites secondaires constitutifs possèdent une activité antimicrobienne. Les principaux appartiennent aux saponines, aux glycosides cyanogènes et aux glucosinolates (Osborn 1996; Iriti and Faoro 2009). Les saponines sont des composés glycosylés comme l' α -tomatine, un glycoalcaloïde stéroïdien présent dans la majorité des organes de la tomate (Keukens *et al.* 1995; Friedman 2002). Ce métabolite pouvant s'accumuler jusqu'à 5% de la masse fraîche (Kim *et al.* 2014), possède une activité antimicrobienne par l'intermédiaire d'interaction avec des 3- β -hydroxy-sterols tel que le cholestérol induisant la dislocation des membranes du pathogène. Les glycosides cyanogènes induisent une résistance à certains herbivores et leur dégradation entraîne la libération de cyanure d'hydrogène (HCN), substance toxique (Zagrobelyny *et al.* 2004; Gleadow and Møller 2014). C'est le cas par exemple de la prunasine synthétisée par les plantes du genre *prunus*. Enfin les glucosinolates sont des glycosides contenant du sulfure et des dérivés d'acides aminés (Fahey *et al.* 2001; Halkier and Gershenzon 2006).

1.1.2. Défense inductible

Lorsque les défenses constitutives ne sont pas suffisantes, une réponse immunitaire se met en place suite à la reconnaissance d'un agent pathogène. Celle-ci peut se faire via des molécules communes à de nombreux microbes (y compris les non-pathogènes) ou bien via des facteurs de virulence spécifiques des agents pathogènes (Jones and Dangl 2006). Dans ce cas les défenses de plante sont adaptées au pathogène (Glazebrook 2005b).

1.1.2.1. Mécanismes de perception des agents pathogènes

La *PAMP-triggered immunity* (PTI) est une réponse immunitaire immédiate, précoce et transitoire des plantes contre les agents pathogènes (Monaghan and Zipfel 2012; Miller *et al.* 2017). Elle est déclenchée suite à la reconnaissance extracellulaire d'un agent pathogène par l'intermédiaire de *pathogen (or microbial) -associated molecular pattern* (PAMPs/MAMPs), ou de *damage-associated molecular pattern* (DAMPs). Les PAMPs/MAMPs sont des motifs moléculaires très conservés chez les agents pathogènes et nécessaires à leur survie ou à leur pathogénicité, comme par exemple la chitine chez les champignons ou la flagelline chez les bactéries. Les DAMPs sont des produits de dégradation d'une activité microbienne, tel que les oligogalacturonides issus de la dégradation des parois cellulaires. Cette reconnaissance est assurée par des *pattern recognition receptors* (PRRs) qui se classent en deux groupes : (1) *trans-membrane receptor-like kinase* (RLKs) avec un domaine extracellulaire riche en leucine, un domaine cytosolique kinase Ser/Thr et un domaine transmembranaire, et (2) *trans-membrane receptor-like protein* (RLPs) avec domaine extracellulaire riche en leucine et un domaine transmembranaire mais pas de domaine de signalisation interne (Boller and Felix 2009; Greeff *et al.* 2012a; b). L'interaction entre PAMPs/MAMPs ou DAMPs et PRRs initie diverses voies de signalisation déclenchant les mécanismes de défense principalement associés à la résistance « non hôte ».

Afin d'établir une interaction compatible conduisant à la prolifération, les agents pathogènes doivent supprimer, contourner ou faire face à la PTI. Pour cela, ils sécrètent des molécules, appelés effecteurs, à l'intérieur des cellules de la plante hôte (Lo Presti *et al.* 2015; Toruño *et al.* 2016). Ces molécules peuvent être des métabolites secondaires, des petits ARN ou des protéines, et possèdent une certaine toxicité pour la plante hôte ou protègent l'agent pathogène et favorisent sa propagation. Certains effecteurs peuvent moduler le métabolisme

de la plante afin d'initier des voies de signalisation pour promouvoir des réponses bénéfiques à l'agent pathogène conduisant à l'*effector-triggered susceptibility* (ETS). En revanche, ces effecteurs peuvent être reconnus par des récepteurs intracellulaires appartenant à la famille des protéines *nucleotide-binding/leucine-rich-repeat* (NB-LRR ou NLR) impliqués dans la mise en place de l'*effector-triggered immunity* (ETI) (Dodds and Rathjen 2010; Cui *et al.* 2015). L'ETI repose sur l'interaction entre les effecteurs de l'agent pathogène appelés « facteurs d'avirulence » (Avr) et les récepteurs intracellulaires de la plante appelés « protéines de résistance » (R). Cette « résistance gène pour gène » est exploitée lors de la sélection de variétés résistantes (Flor 1971; Hammond-Kosack and Parker 2003).

La PTI et l'ETI sont interconnectés, elles partagent des mécanismes de réponse très conservés comme les voies de signalisations et l'activation de gènes de défense (Dodds and Rathjen 2010; Bjornson and Zipfel 2021). Cependant la réponse immunitaire issue de l'ETI est plus robuste et plus durable que celle issue de la PTI (Li *et al.* 2020).

1.1.2.2. Voies de signalisation

La reconnaissance d'un agent pathogène via la PTI ou l'ETI mène à l'activation de cascades de signalisations complexes responsables de nombreux changements moléculaires et physiologiques (Bigeard *et al.* 2015). Parmi les premiers évènements figurent des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique détectées au stade précoce de l'interaction. Ces modifications se manifestent par des flux d'ions et par des variations de la concentration en calcium intracellulaire. Les flux d'ions agissent en amont et sont suivis par d'autres évènements cellulaires, en particulier une production de monoxyde d'azote (NO) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que l'activation de cascades de phosphorylation.

Le calcium (Ca^{2+}) agit comme un second messager important dans les cellules végétales (Thor 2019). La concentration de Ca^{2+} cytosolique libre change rapidement en réponse à divers signaux endogènes ou environnementaux. L'élévation de la concentration de calcium dans les cellules végétales suite à l'activation de canaux et de pompes présents sur la membrane plasmique, est un évènement précoce essentiel lors des réponses de défense des plantes (Blume *et al.* 2000; Moeder *et al.* 2019; Zhao *et al.* 2021). Cette augmentation de Ca^{2+} est reconnue par des *Ca²⁺-binding proteins* qui traduisent les signaux calciques en réponses cellulaires par la régulation d'effecteurs en aval (Cheval *et al.* 2013; Aldon *et al.* 2018). La

plupart des *Ca²⁺-binding proteins* possèdent des motifs *EF-hand*, structure en hélice-boucle-hélice responsable de la liaison d'un ion Ca^{2+} et sont regroupés dans une superfamille composée de trois sous-famille : (1) les calmodulines (CaMs) et les *calmodulin-like proteins* (CML), (2) les *Ca²⁺-dependant protein kinase* (CDPK) et (3) les *calcineurin B-like protein* (CBL) et leurs protéines kinases d'interaction. Une fois le signal transmis, un système d'efflux du Ca^{2+} rétablit un niveau basal en ion calcium grâce à des pompes $Ca^{2+}/ATPase$ et des échangeurs Ca^{2+}/H^+ .

Les cascades de signalisation impliquent de nombreux évènements associés à des modifications post-traductionnelles et en particulier l'état de phosphorylation de certaines protéines associées à des processus de régulation (Park *et al.* 2012). En plus de récepteurs spécifiques, d'autres protéines peuvent être impliquées indirectement dans la reconnaissance de l'agent pathogène et joue un rôle d'adaptateur de signalisation (Zipfel 2009; Kadota *et al.* 2019). Parmi les protéines kinases impliquées dans ces cascades, on trouve trois types de protéines très conservées dans le vivant : les *mitogen-associated proteins kinases* (MAPK), les *MPAK kinases* (MAPKK) et les *MAPKK kinases* (MAPKKK) (Devendrakumar *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2018). En réponse à un stimulus, une MAPKKK active par phosphorylation une MAPKK qui a son tour phosphoryle une MAPK. La MAPK phosphorylée est active et cible diverses protéines tel que d'autres kinases, des enzymes et des facteurs de transcriptions (Tena *et al.* 2011).

L'accumulation rapide et localisée d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est l'une des premières réponses à l'infection par des agents pathogènes (Qi *et al.* 2017; Sang and Macho 2017). Les ROS sont des éléments de signalisation impliqués dans la mise en place de la défense des plantes. Ils sont naturellement produits par la NADPH oxydase (NOX, aussi appelé *respiratory burst oxidase homolog* ou RBOH), complexe enzymatique membranaire qui catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par l'oxygène produisant du $NADP^+$, des protons et des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Ces deux derniers réagissent ensuite sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) pour former du H_2O_2 . Après la reconnaissance d'un agent pathogène, l'activité de la NOX est stimulée par l'augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule et par sa phosphorylation par des CDKs et MAPKs (Yoshioka *et al.* 2015; Marcec *et al.* 2019; Wang *et al.* 2020). L'augmentation de Ca^{2+} cytosolique est également responsable de l'augmentation de la production de

monoxyde d'azote (NO) généré soit à partir de nitrite par la nitrate réductase (NR), soit à partir d'arginine par une activité *nitric oxide synthase-like* (NOS-like) (Durner and Klessig 1999; Yoshioka *et al.* 2011; Bellin *et al.* 2013). Le NO induit à son tour une augmentation de la concentration en calcium en activant les canaux calciques intracellulaires. Les ROS diffusent dans le cytosol et activent les voies des MAPKs/CDKs ainsi que plusieurs réponses de défense comme l'expression de gènes de défense, la production de phytoalexines et conduisent à la mort cellulaire liée à la réponse hypersensible (HR) (Huang *et al.* 2002; Wimalasekera *et al.* 2011).

La coordination de l'ensemble de ces éléments de signalisation orchestre les événements plus tardifs tel que l'activation de facteurs de transcription qui entraîne une reprogrammation génétique et des modifications physiologiques de la plante conduisant à la réponse de défense. Les défenses se traduisent généralement par la biosynthèse de composés antimicrobiens, de protéines *pathogenesis-related* (PR) et par un renforcement de la paroi.

1.1.2.3. Signalisation hormonale

Les phytohormones sont des composés essentiels à la régulation de processus biologiques variés comme la croissance et le développement mais également les mécanismes de défense des plantes lors de stress abiotiques et biotiques (Williams 2012). Les réactions de défenses biotiques sont principalement coordonnées par l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). La balance hormonale active des réponses de défense spécifiques et adaptées contre un pathogène donné (Thomma *et al.* 1998; Glazebrook 2005a; Pieterse *et al.* 2012). Ainsi, pendant longtemps, le SA était décrit comme l'hormone clé de la défense contre les pathogènes biotrophes, alors que le JA et l'ET étaient associés à la défense contre les pathogènes nécrotrophes. Des relations antagonistes entre les voies SA et JA/ET ont été rapportées ainsi qu'une action synergique du JA avec l'ET. De nombreux travaux montrent que la signalisation hormonale est bien loin d'être aussi simple avec la présence de relations croisées entre les hormones très complexes et très finement régulées au cours du stress biotique (Bari and Jones 2009; Robert-Seilaniantz *et al.* 2011; Verma *et al.* 2016; Aerts *et al.* 2021).

Les voies de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) sont activées après la reconnaissance d'un agent pathogène. Les formes activées du SA (la forme glycosylé SAG et la forme méthylé

volatile MeSA) sont transportés dans les différents organes de la plante conduisant à la mise en place de la résistance systémique acquise (SAR) (Durrant and Dong 2004). De plus, l'accumulation de SA contribue aussi à la mise en place de la résistance locale par l'activation de NRP1 (*non-expressor of PR 1*) (Vlot *et al.* 2009; Fu and Dong 2013). NRP1 interagit avec des facteurs de transcription activant le promoteur des gènes de réponse au SA, tel que les gènes PRs, ce qui conduit à l'activation des défenses et notamment à la mise en place de la mort cellulaire programmée (PCD). L'acide jasmonique conjugué avec l'isoleucine (JA-Ile), forme active de l'hormone, est reconnu par le récepteur COI1 (*coronatine insensitive 1*) responsable de l'ubiquitination et de la dégradation des JAZs (*jasmonate ZIM transcription factors*), répresseurs des facteurs de transcription MYC et ERF qui régulent les gènes effecteurs liés au JA (Xie *et al.* 1998; Chini *et al.* 2007; Wager and Browse 2012). La voie MYC est généralement associée à la défense contre les herbivores alors que la voie ERF est activée par l'infection de pathogènes nécrotrophes. L'éthylène (ET) est une hormone volatile qui peut agir aussi bien comme un régulateur positif ou négatif des défenses (Adie *et al.* 2007; Robert-Seilaniantz *et al.* 2011). La production simultanée de JA et d'ET après infection par des pathogènes nécrotrophes entraîne l'induction de la voie ERF et la répression de la voie MYC.

Les autres hormones telles que l'acide abscissique (ABA), les auxines, l'acide gibberellique (GA), les cytokinines (CKs) et les brassinostéroïdes (BRs) sont principalement associées au développement des plantes, mais sont également impliquées dans des voies de signalisation de défense contre les agents pathogènes (Bari and Jones 2009; Pieterse *et al.* 2012). Elles interviennent par interaction directe ou indirecte avec les voies de signalisation du SA, JA et ET. L'acide abscissique (ABA) est un inducteur de la voie MYC, il induit la régulation des gènes activés par le JA (Anderson *et al.* 2004; Flors *et al.* 2005; Adie *et al.* 2007). Il intervient également dans le dépôt de callose favorable à la défense des plantes (Flors *et al.* 2005; Oide *et al.* 2013). L'acide gibbérellique (GA) stimule la dégradation des protéines DELLAs, régulateurs négatifs de la croissance qui agissent sur les microorganismes nécrotrophes en induisant l'expression de gènes dépendant du JA et ET, et contribuent à la sensibilité aux pathogènes biotrophes en réprimant les voies dépendantes du SA (Navarro *et al.* 2008). L'acide indole-3-acétique (IAA), représentant la famille des auxines, est un antagoniste des voies de signalisation du SA et peut aussi agir de façon indirecte sur la défense par ses effets sur le développement des plantes (Kazan and Manners 2009; Čarná *et al.* 2014).

Les cytokinines (CKs) modulent la voie du SA (Sakakibara 2005; Choi *et al.* 2011) alors que les brassinostéroïdes (BRs) modulent la réponse immunitaire différemment selon les pathosystèmes (Bajguz *et al.* 2020; Ortiz-Morea *et al.* 2020).

Les différentes voies de signalisation hormonale sont en interaction les unes avec les autres avec des effets synergiques, antagonistes et additifs (Aerts *et al.* 2021). De plus, la réponse hormonale est le résultat cumulé de l'activation des défenses et du statut de la plante, nécessitant une régulation fine. En effet, le type d'hormones préférentiellement impliqué dans la défense est déterminé par les stratégies d'attaque des bioagresseurs, et l'homéostasie est considérablement influencée par le statut de la plante (stade de développement ou les stress abiotiques).

1.1.2.4. Réponses de défense

L'ensemble des cascades de signalisation mises en place après la perception de l'agent pathogène induit la reprogrammation de l'expression de gènes de défense nécessaire à l'établissement des réponses qui ont pour objectif de limiter la croissance du pathogène. Ainsi, la paroi cellulaire est le siège de réorganisations structurales et chimiques qui se manifestent par le dépôt de lignine ou de callose, l'accumulation de métabolites et le recrutement de protéines à activité antimicrobienne. Toutes ces réponses sont également responsables de la mise en place de la réponse hypersensible (HR) et de la résistance systémique acquise (SAR).

◆ *Renforcement de la paroi cellulaire*

La paroi cellulaire constitue une barrière physique passive à la pénétration des pathogènes. Cependant, après infection, la composition pariétale est modifiée (Chowdhury *et al.* 2019). Ainsi, la lignine s'accumule en réponse à un agent pathogène notamment dans le cas de pression mécanique (Yang *et al.* 2018; Yan *et al.* 2019). De même, des dépôts de callose se forment à proximité des lésions bloquant ainsi les plasmodesmes (Wang *et al.* 2021). Ce polymère de beta-1,3-glucanes est synthétisé par des callose synthases activées par l'augmentation de la teneur en calcium intracellulaire. La formation de callose est finement régulée par les composés hormonaux tels que l'ABA et le MeJA qui suppriment la formation de callose alors que l'ET et le SA contribuent à la stimulation de sa synthèse. La paroi est

également renforcée par *cross-linking* oxydatif des glycoprotéines sous l'action des ROS (Brisson *et al.* 1994; Mnich *et al.* 2020).

◆ *Sécrétion de phytoalexines*

A la différence des phytoanticipines, les phytoalexines sont des composés synthétisés en réponse aux agents pathogènes (VanEtten *et al.* 1994; Dixon 2001; Ahuja *et al.* 2012; Bizuneh 2021). Ces métabolites secondaires jouent un rôle dans la protection des plantes contre un grand nombre de pathogènes et trouvent également une application dans la promotion de la santé humaine. Il existe de nombreuses phytoalexines différentes appartenant à diverses familles chimiques. Leurs structures dépendent principalement du type de plantes qui les synthétisent. Par exemple, les isoflavonoïdes prédominent dans les plantes de la famille des *Fabaceae*, les sesquiterpénoïdes dans la famille des *Solanaceae*, les diterpènes dans la famille des *Poaceae*, les indoles dans la famille des *Brassicaceae*.

La camalexine est la phytoalexine majeure chez *Arabidopsis* (Ahuja *et al.* 2012). Elle est issue de la conversion du tryptophane en indole-3-acétaldoxime, intermédiaire de biosynthèse de la camalexine, des indole glucosinolates et des auxines. La production de camalexine est associée aux voies de signalisation hormonale et à la production de ROS en réponse à un large répertoire d'agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes. Cependant, son mode d'action sur les agents pathogènes est mal compris. Il semble qu'elle puisse détruire les membranes bactériennes et induire l'apoptose des cellules fongiques.

◆ *Protéines pathogenesis-related (PR)*

Les protéines *pathogenesis-related* (PR) sont induites au cours de la réponse de défense des plantes aux attaques de bioagresseurs et de facteurs de stress abiotiques. Ces protéines possèdent généralement des activités antimicrobiennes et présentent un haut degré de spécificité vis-à-vis des agents pathogènes. Les niveaux de transcription de plusieurs gènes PR peuvent être utilisés comme marqueurs de la réponse de défense spécifique dans les tissus végétaux. Ces protéines PR sont classées en 17 familles sur la base de leurs séquences d'acides aminés, de leurs propriétés biochimiques et de leur activité biologique (Sudisha *et al.* 2012). Des différences de structure et/ou de fonction entre les protéines appartenant à une même famille sont très souvent observées. Les β -1,3-glucanases (PR-2) et les chitinases (PR-3, -4, -8

et -11) exercent une activité hydrolytique sur la paroi cellulaire de champignon. La famille des PR-7, qui regroupent les endoprotéases, les PR-12 (defensin), les PR-13 (thionin) et certaines protéines de transfert de lipides (PR-14), exercent leur activité contre des pathogènes bactériens et fongiques. Certaines protéines PR génèrent de l' H_2O_2 et contribuent au renforcement de la paroi, c'est le cas des PR-15 (oxalate oxidase) et PR-16 (*oxalate oxidase-like protein*) qui possèdent une activité superoxyde dismutase et des PR-9 qui sont des peroxydases.

◆ *Réponse hypersensible (HR)*

La réponse hypersensible (HR) est une réponse de défense caractéristique des interactions entre plantes et agents pathogènes (Mur *et al.* 2008; Balint-Kurti 2019) avec une mort cellulaire programmé (PCD) localisée au site d'infection qui peut entraîner l'apparition de lésions nécrotiques. Cette résistance locale limite le développement des agents pathogènes biotrophes en réduisant l'accès au nutriment mais provoque l'effet inverse chez les nécrotrophes puisqu'ils se nourrissent de tissus morts. La HR est initiée par les NLR suite à la reconnaissance d'effecteurs pathogènes ou par le NO et H_2O_2 produit en masse lors de l'*oxydative burst*.

Les voies de la réponse hypersensible conduisent à divers types de PCD qui impliquent la vacuole (Dickman and Fluhr 2013). Dans un type de HR, la vacuole fusionne avec le plasmalemma sans détruire la vacuole. Le contenu de la vacuole, y compris les protéines PR, est ensuite libéré dans l'espace extracellulaire, interférant ainsi avec la croissance des agents pathogènes. Lors de HR suivant une infection virale ou sous l'action de l'acide oxalique, l'intégrité de la membrane vacuolaire est compromise, entraînant la libération de protéases dans le cytoplasme puis la mort cellulaire.

◆ *Résistance systémique acquise (SAR)*

La résistance systémique acquise (SAR) est un état de résistance à large spectre, sans spécificité à l'infection initiale, qui se propage dans la plante entière par l'intermédiaire du système vasculaire (Fu and Dong 2013). Cette protection durable est nécessaire à la plante pour se défendre contre des attaques ultérieures d'agents pathogènes. La SAR peut même être transmise à la descendance par régulation épigénétique (Luna and Ton 2012).

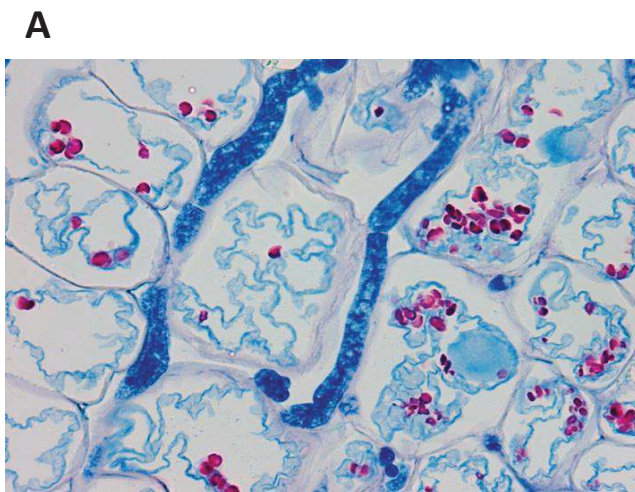


Figure I.2 : Plante de tomate infectée par *Botrytis cinerea*

(A) Coupe histologique de pétiole de tomate colonisé par *B. cinerea* (grossissement x400). (B) Lésion nécrotique causée par *B. cinerea* sur une tige de tomate.

L'établissement de la SAR est sous le contrôle du SA par l'intermédiaire de la protéine NPR1, et de l'acide N-hydroxypipécolique (NHP), métabolite secondaire synthétisé à partir de la lysine (Zeier 2021). La SAR est associée à l'augmentation de SA et NHP au niveau du site d'infection et également dans les tissus non-infectés. La SAR induit l'activation de gènes de défense et la production de phytoalexines dans les tissus distaux au site infection.

1.2. Stratégies de neutralisation des défenses par des agents pathogènes

Dans certains cas d'infection par des agents pathogènes virulents, les plantes hôtes s'avèrent sensibles et développent des symptômes de maladie. Cela signifie que malgré l'activation des défenses de la plante hôte les agents pathogènes sont capables de réaliser l'infection et de se multiplier dans la plante. Cette capacité est en grande partie associée à la mise en place de facteurs de virulence de nature variée : des protéines sécrétés (effecteurs), des toxines et des analogues de phytohormones qui contribuent à manipuler le métabolisme de la plante hôte pour contrecarrer la mise en place de défense.

Ces stratégies sont différentes suivant le pathogène étudié. Ici on se concentre sur les mécanismes déployés par *Botrytis cinerea*.

1.2.1. L'agent pathogène *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un champignon filamenteux de la famille des ascomycètes (Elad *et al.* 2016). Il est responsable de la pourriture grise reconnaissable par le développement d'un chancre de couleur beige/brun sur le tissu infecté (Figure I.2). Ce microorganisme polyphage, capable d'infecter plus de 200 espèces de plantes différentes sans spécificité d'organe, cause d'énormes dégâts en agriculture maraîchère, viticole et horticole en pré- et en post-récolte. Cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et donc dans certains cas la perte de la récolte.

B. cinerea est l'organisme modèle très étudié des phytopathogènes nécrotrophes. Il peut également survivre comme saprophyte (sur matière morte ou en déperissement), sous forme de conidie (spores mitotiques issus de la reproduction asexuée), de mycélium ou de sclérotés (masse mycélienne dense enchâssé dans un cortex rigide) (Carisse 2015; Molly and Grant-Downton 2015). Il est aussi capable de coloniser les plantes en interne, vraisemblablement en tant qu'endophyte, sans provoquer de symptômes de maladie ou de

stress (van Kan *et al.* 2014). *B. cinerea* est la forme asexuée de *Botryotinia fuckeliana* qui est très rarement observé dans la nature.

1.2.1.1. Développement et propagation

B. cinerea se développe principalement sous un climat humide (90 – 95 %) et tempéré (entre 17 et 23°C) mais supporte de forts écarts de température, et se développe jusqu'à 0°C à condition que l'humidité reste élevée (Carisse 2015; Molly and Grant-Downton 2015). Les plantes hôtes sont généralement contaminées à partir de conidies attaquant des tissus affaiblis, flétris, ou des lésions apparues lors de la culture (effeuillage ou attaque d'insectes ravageurs). En présence de forte humidité et de nutriment abondant, un tube germinatif est émis et le mycélium croît et produit des conidiophores longs et ramifiés sur lesquels sont formées les conidies. La libération des conidies nécessite une chute soudaine de l'humidité et une augmentation de température (condition généralement réunies à l'aube). Les conidies sont ensuite disséminées par l'air, la pluie ou les insectes et peuvent infecter d'autres plantes.

1.2.1.2. Contrôle de la maladie

Il n'existe pas de variété de plante commerciale résistante à *B. cinerea*, mais il existe des différences de sensibilité entre les variétés. Le contrôle de la pourriture grise résulte donc d'une combinaison de sensibilité variétale, de pratique culturale et de lutte chimique ou biologique. Actuellement, aucune des méthodes disponibles ne permet de garantir une efficacité totale contre *B. cinerea* sur les cultures.

◆ *Pratique culturale*

Il existe plusieurs méthodes prophylactiques permettant de limiter l'installation et la propagation de *B. cinerea* (Elad 2015). Le contrôle du taux d'humidité est une méthode couramment utilisée dans la lutte contre *B. cinerea*. Favoriser la circulation de l'air en diminuant la densité des plantes ou utiliser des systèmes de ventilation avec chauffage en serre permettent de diminuer l'hygrométrie. Par ailleurs, l'élimination de tissus infectés ou sénescents permet de réduire les sources d'inoculum de *B. cinerea*. De plus, il a été montré que la lumière proche UV favorise la sporulation de *B. cinerea* (Tan and Epton 1973), ainsi l'utilisation de filtres absorbant la lumière proche UV est un des moyens de lutte. Enfin la

nutrition de la plante joue un rôle important dans la défense et peut modifier la sensibilité de la plante. A l'inverse certaines pratiques culturales comme l'effeuillage peuvent favoriser l'installation de la maladie en créant des blessures humides favorables à l'installation de *B. cinerea*.

◆ *Lutte chimique*

La lutte chimique consiste en l'utilisation de fongicides pour tuer ou ralentir la progression du champignon (Fillinger and Walker 2016). La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles du champignon comme la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire. Cependant l'utilisation de fongicides peut entraîner le développement de souches résistantes. Actuellement, on observe des résistances à la majorité des familles de fongicides utilisés contre *B. cinerea*.

◆ *Lutte biologique*

La protection biologique consiste à utiliser des organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des bioagresseurs. De manière plus générale, il existe de nombreux produits ayant montré une activité contre *B. cinerea* et utilisés comme fongicides d'origine naturelle, par exemple, des extraits de plantes ou des microorganismes antagonistes (Nicot *et al.* 2015). Ces agents de protection biologique agissent selon plusieurs modes d'action. La compétition nutritive consiste en la réduction de la concentration en nutriments disponibles pour le pathogène via l'intervention de microorganismes inhibant la germination des conidies de *B. cinerea*. Certaines bactéries utilisées en protection biologique possèdent la capacité de changer les caractéristiques de surfaces des feuilles de plantes empêchant le processus de fixation et de croissance des pathogènes. D'autres agents de protection biologique agissent par antibiose c'est-à-dire inhibition du pathogène grâce à la production de métabolites secondaires toxiques comme par exemple le peptaibol, la gliotoxine, la gramicidine S ou la pyrrolnitrine. L'hyper parasitisme consiste en l'utilisation d'un parasite spécifique qui pénètre et détruit les cellules du pathogène comme par exemple *Gliocladium roseum* ou *Pythium periplocum*, qui parasitent *B. cinerea*. Certains agents de lutte biologique interfèrent avec les processus de pathogénicité en diminuant l'activité des enzymes de dégradation de la paroi (cutinase, pectinase, *etc.*) ou en dégradant l'acide oxalique, molécule

produit par *B. cinerea* lors de l'interaction avec la plante hôte. Enfin certains mécanismes de lutte biologique reposent sur la stimulation des défenses induites de la plante de manière locale ou systémique par un organisme non pathogène. Cela peut induire un épaissement des structures pariétales, la stimulation de voies métaboliques secondaires permettant la synthèse de substances antimicrobiennes ou de composés impliqués dans la signalisation ou l'accumulation de protéines de défense. Bien que la protection biologique soit de plus en plus utilisée son efficacité en culture n'est pas garantie. En effet, les conditions environnementales imprévisibles et fluctuantes peuvent influencer la survie, la mise en place et l'activité des agents de lutte biologique, ou l'efficacité des produits de biocontrôle.

1.2.2. Mécanisme d'infection de *Botrytis cinerea*

Afin de se développer au sein de la plante hôte, *B. cinerea* comme d'autres pathogènes virulents doit contourner les barrières de défense mises en place par la plante (van Kan 2006; Choquer *et al.* 2007; González-Fernández *et al.* 2015). Pour cela *B. cinerea* utilise des mécanismes variés tel que la sécrétion de protéines (enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, oxydoréductases, cérato-platanines) et de composés toxiques (botrydial, acide oxalique). Il est également capable de moduler l'immunité de la plante hôte.

La première étape de l'infection consiste à franchir les barrières physiques à la surface des plantes tels que la cuticule ou les cires. *B. cinerea* peut contourner ces barrières en pénétrant les tissus de la plante par des ouvertures naturelles comme les stomates ou les blessures. Le champignon a également développé des structures spécialisées lui permettant de percer la surface des tissus sains.

1.2.2.1. Structures spécialisées de pénétration de la surface des plantes

Après leur atterrissage, les conidies se fixent à la surface de la plante, dans un premier temps par le biais d'interactions hydrophobes entre l'hôte et les conidies liées à la présence d'eau, et dans un deuxième temps, à travers la gaine sécrétée par le tube germinatif (Chethana *et al.* 2021). Afin de faciliter la pénétration, certains pathogènes développent des structures cellulaires, appelés appressoria, spécifiques de l'infection, qui se forment en fin de tube germinatif et forment un pic de pénétration hautement mélanisé qui exerce une pression mécanique capable de percer la cuticule. *B. cinerea* développe des renflements de type

appressoria, appelés coussins d'infection (Choquer *et al.* 2021). Ces structures spécialisées présentent un renforcement de la paroi fongique lié à la présence de mélanine mais sans exercer une pression mécanique. Ce renforcement de la paroi pourrait être un moyen de protection contre les défenses de la plante hôte. De plus, les coussins d'infection produisent de la chitine déacétylase, une enzyme qui catalyse la désacétylation de la chitine en chitosan. La présence de chitosan participe au renforcement de la paroi fongique et permet également à *B. cinerea* d'échapper à la détection par le système immunitaire de la plante hôte. Enfin, les coussins d'infections sont également impliqués dans le métabolisme de *B. cinerea* car ils surexpriment des gènes codant pour des transporteurs et des enzymes du catabolisme des sucres.

1.2.2.2. Enzymes de dégradation de la paroi

Afin de pénétrer la surface de la plante hôte, *B. cinerea* sécrète des enzymes impliquées dans la dégradation de la cuticule, des cires et des polysaccharides pariétaux (González-Fernández *et al.* 2015). Ces enzymes, rassemblées sous le nom *cell wall degrading enzymes* (CWDE), permettent la colonisation fongique en dégradant les tissus végétaux mais aussi la libération de résidus osidiques assimilables par le champignon pour sa croissance. Les gènes codant pour des CWDE sont généralement présents en de multiples copies dans le génome de *B. cinerea*.

B. cinerea sécrète des lipases et des cutinases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons esters présentes dans la cuticule et dans les cires hydrophobes présentes à la surface des plantes. Afin de dégrader les polysaccharides pariétaux, *B. cinerea* sécrète différentes pectinases, cellulases, et hemicellulases. Parmi les pectinases, les endo-polygalacturonases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons osidiques des domaines homogalacturonane présents dans la pectine. Les exo-polygalacturonases catalysent l'hydrolyse d'un résidu d'acide galacturonique de l'extrémité non réductrice du galacturonane, fournissant au champignon des composés de faible masse moléculaire pouvant être facilement absorbés. Les pectine estérases catalysent la déstérification de la pectine afin qu'elle soit hydrolysable par les polygalacturonases. Les cellulases sont des β -glucosidases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons β -1,4-glycosides du polymère de cellulose. Les

endo- β -1,4-xylanases hydrolysent le squelette polysaccharidique lié en β -1,4 du xylane, qui constitue le principal composant hémicellulosique de la paroi cellulaire végétale.

1.2.2.3. Production de ROS

Dès la reconnaissance de l'agent pathogène, les cellules végétales produisent des ROS engendrant un *oxidative burst*. Ces ROS dérivés de la plante servent de signal pour avertir les cellules voisines et conduisent à la mise en place de la HR favorable au développement des agents pathogènes nécrotrophes. Ainsi, au lieu de supprimer l'*oxidative burst* des plantes, *B. cinerea* exploite cette réaction de défense et même y contribue (Heller and Tudzynski 2011; Zhang *et al.* 2020). En effet, *B. cinerea* produit des ROS par des enzymes tel que NADPH oxydase (NOX), glucose oxydase (GOD), glyoxal oxydase (GLOX), qui s'accumulent rapidement dans les extrémités des hyphes ou autour de la paroi cellulaire pénétrée pendant le processus infectieux. Afin de se protéger contre cette surproduction de ROS les cellules fongiques produisent également des systèmes antioxydants non-enzymatiques (principalement le glutathion mais aussi l'ascorbate, les caroténoïdes, *etc.*) et enzymatiques (principalement des thioredoxines mais aussi des catalases, des superoxyde dismutases (SOD), des peroxidases, *etc.*).

1.2.2.4. Sécrétion de protéases

Les protéases sont généralement impliquées dans la dégradation des protéines et le recyclage des acides aminés, mais aussi dans plusieurs réseaux de régulation. Lors de l'infection des plantes, les protéases des agents pathogènes sont importantes pour la dégradation des tissus de l'hôte et pour cibler les composants clés de l'immunité de la plante (Santos and Figueiredo 2021). Les protéases sont les protéines les plus abondantes dans le sécrétome de *B. cinerea* au moment de l'infection.

Les protéases peuvent être différenciées selon le résidu catalytique impliqué dans le clivage de la liaison peptidique. Les protéases aspartiques, à cystéine et à sérine sont parmi les plus communes. Elles se caractérisent par la présence de deux résidus d'acide aspartique dans le motif catalytique. Plusieurs protéases aspartiques ont été identifiées chez *B. cinerea* (Have *et al.* 2010). Elles ont des rôles distincts, notamment la génération d'acides aminés nécessaires à la croissance du champignon, le ramollissement de la paroi cellulaire afin de

favoriser la colonisation fongique, et la dégradation des protéines de défense de l'hôte. Certaines de ces protéases pourraient même servir d'effecteurs. Les protéases à cystéine, ou thiol protéases, possèdent une triade Cys-His-Asn au niveau du site actif, et leur activité optimale se situe à un pH acide. Les protéases à cystéine de *B. cinerea* sont impliquées dans l'autophagie et pourraient être des acteurs importants dans la stratégie de croissance invasive du pathogène. Enfin, les protéases à sérine possèdent une triade catalytique constituée de résidus histidine, sérine et asparagine, mais l'ordre de la séquence dépend du type spécifique de protéase à sérine. Plusieurs dizaines de protéases à sérine ont été identifiées chez *B. cinerea* dont certaines jouent un rôle dans la formation des sclérotés ou lors de l'infection des hyphes (Espino *et al.* 2010; Liu *et al.* 2020).

1.2.2.5. Sécrétion de protéines cerato-platanines

Les protéines de la famille des cérato-platanines n'ont été identifiées que chez les champignons (Baccelli 2015). Ce sont de petites protéines (de 120 à 130 acides aminés), sécrétées ou localisées dans la paroi cellulaire, possédant un seul domaine structurel. Leurs fonctions n'ont pas encore été bien définies à ce jour. Les plantes sont capables de reconnaître ces protéines cerato-platanines qui agissent comme des MAMPs/PAMPs, entraînant l'activation des réponses de défense. La protéine BcSpl1 est l'une des protéines majoritaires du sécrétome de *B. cinerea*. Sa production est induite, lors de l'infection de plantes, par l'éthylène (Frías *et al.* 2011). Cette protéine est nécessaire à la virulence du champignon et semble induire la HR chez la plante hôte.

1.2.2.6. Sécrétion d'acide oxalique

L'acide oxalique est un facteur de virulence nécessaire à la pathogénicité de *B. cinerea* (Jiao *et al.* 2022). Cet acide organique est synthétisé dans la voie du glyoxylate, soit par l'oxaloacétate acétylhydrolase, qui catalyse l'hydrolyse de l'oxaloacétate (OAA) en acide oxalique et acide acétique, soit par la glyoxylate oxidase qui catalyse l'oxydation de l'acide glyoxylique en acide oxalique en libérant de l' H_2O_2 . La sécrétion d'acide oxalique par *B. cinerea* a plusieurs effets sur la plante hôte.

Du fait de sa capacité à infecter divers organes et espèces de plante qui possèdent différents pH, *B. cinerea* est capable de surveiller et d'ajuster le pH externe afin qu'il lui

devienne favorable. En effet, la sécrétion d'acide oxalique par *B. cinerea* lui permet d'acidifier le pH autour de 4 - 5 au niveau du site d'infection. Pour cela, *B. cinerea* possède un système de régulation spécifique du pH qui agit par le biais d'une seule voie de signalisation (Rasclé *et al.* 2018). Cette voie est composée des produits de six gènes *pal* et cible le facteur de transcription à doigt de zinc PacC (qui active les gènes exprimés dans des conditions alcalines et réprime les gènes exprimés dans des conditions acides). L'acidification du pH permet d'augmenter l'activité des protéines sécrétées telles que les protéases aspartiques actives à pH 3 - 4 ou les polygalacturonases qui présentent une activité maximale à pH 3.1 (Manteau *et al.* 2003). De plus, un pH acide inhibe les activités des enzymes associées à la défense de plantes et influence la transcription de certaines protéines PR.

En plus de ces effets sur le pH, l'acide oxalique est capable de chélater les ions calcium incorporés dans la pectine la rendant encore plus accessible aux pectinases. L'acide oxalique inhibe également les réactions de défense précoces de plante en générant un environnement réducteur qui inhibe la synthèse et l'activation des oxydases de la plante. Cette inhibition entrave la production de H₂O₂ et freine l'*oxidative burst* et la transduction du signal associé. Cependant, une fois l'infection établie, l'acide oxalique induit la génération de ROS végétaux suivi de la PCD du tissu hôte, dont le résultat profite directement à l'agent pathogène (Williams *et al.* 2011).

1.2.2.7. Sécrétion de toxine

B. cinerea produit deux familles de toxines, les botryanes avec le sesquiterpène botrydial et ses dérivés et les botcinines avec le polycétide acide botcinique et ses dérivés. Le botrydial induit, chez la plante hôte, une accumulation de ROS par l'intermédiaire de la production rapide d'acide phosphatidique (PA), un phospholipide qui joue le rôle de second messager (D'Ambrosio *et al.* 2018). Le botrydial induit également d'autres mécanismes de défense de la plante tel que le dépôt de callose, la HR et l'expression de protéines PR qui sont régulées par les voies du SA et du JA (Rossi *et al.* 2011). L'acide botcinique a un rôle redondant à botrydial dans la virulence de *B. cinerea* car il a été montré que la perte de la production d'acide botcinique n'affecte pas la virulence alors que les doubles mutants qui ne produisent ni d'acide botcinique ni de botrydial présentent une virulence nettement réduite (Dalmais *et al.* 2011).

1.2.2.8. Système de détoxification

Pour réussir à infecter et à coloniser une plante hôte, les agents pathogènes doivent surmonter un répertoire de composés de défense doté de larges propriétés antimicrobiennes (Westrick *et al.* 2021). Pour cela les composés de défense des plantes doivent être reconnus par les agents pathogènes entraînant la production d'enzymes de détoxification. Ces enzymes peuvent être des enzymes de dégradation des composés de défense ou des transporteurs générant l'efflux pour maintenir les composés de défense à des seuils non létaux. Par exemple, *B. cinerea* exprime une tomatinase, enzyme responsable de la dégradation de l' α -tomatine (glycoalcaloïde de défense produit dans la tomate) inhibant l'effet antimicrobien (Quidde *et al.* 1998). *B. cinerea* est également capable de contourner le resveratrol (polyphénol stilbénolide produit dans la vigne) par dimérisation oxydative par des laccases (Schouten *et al.* 2008). De plus, *B. cinerea* exprime des transporteurs de type ABC (*ATP binding cassette*), qui utilise l'ATP, le MFS (*major facilitator superfamily*) et le gradient chimio-osmotique pour détoxifier les cellules de composés de défense tels que la camalexine (Pedras *et al.* 2011).

1.2.2.9. Sécrétion de petits ARN

Les petits ARN (sRNAs), tels que les petits ARN interférents (siRNAs) et les microARN (miRNAs) qui déclenchent l'interférence ARN (RNAi) sont importants dans la régulation et le réglage fin des gènes d'immunité des plantes (Muhammad *et al.* 2019). *B. cinerea* est capable de transmettre des effecteurs Bc-sRNA dans les cellules de l'hôte pour inactiver d'importants gènes d'immunité de l'hôte en détournant la machinerie RNAi de l'hôte. Par exemple, Bc-siR3.2 cible des gènes associés aux voies de transduction du signal des MAPKs ou Bc-siR37 qui cible des gènes impliqués dans la défense contre *B. cinerea* et codant pour un facteur de transcription lié à l'immunité, une pectine-lyase et une kinase réceptrice à répétition riche en leucine (LRR) (Weiberg *et al.* 2013a; Wang *et al.* 2017). La plupart des Bc-sARN qui présentent des gènes cibles prédits pour la plante hôte sont dérivés de loci de rétrotransposons à longue répétition terminale (LTR) qui ont été associés à des régions génomiques à évolution rapide liées à la virulence.

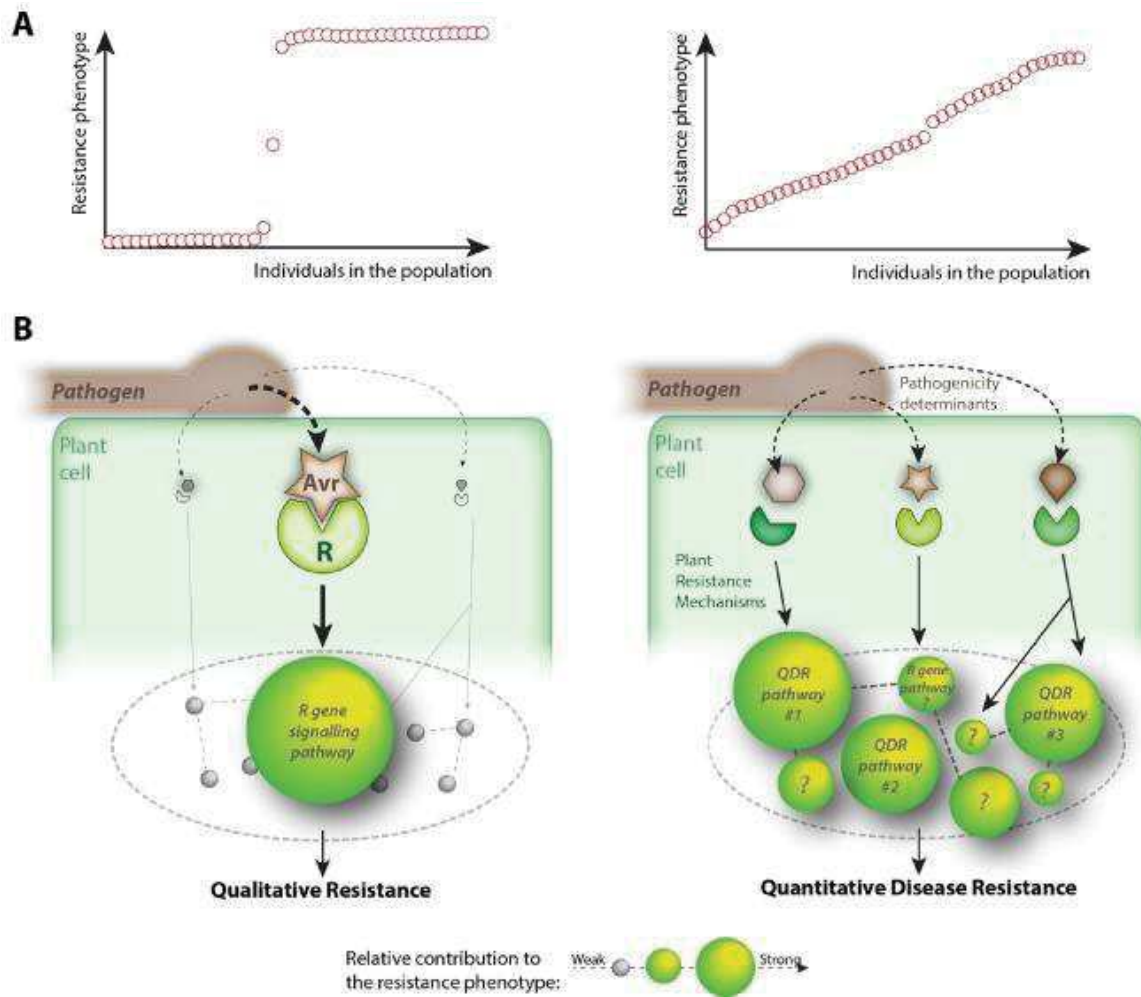


Figure 1.3 : Dualité des résistances qualitative et quantitative

La résistance qualitative est illustrée à gauche et la résistance quantitative est illustrée à droite. (A) Point de vue de la biologie des populations, et (B) point de vue de la biologie moléculaire. (D'après Roux *et al.* 2014)

1.2.2.10. Perturbation de la signalisation hormonale de l'hôte

Afin de coloniser les plantes, certains agents pathogènes ont développé diverses stratégies pour interférer avec les voies des phytohormones à l'aide d'effecteurs sécrétés. Ces effecteurs peuvent agir directement sur les niveaux d'hormones, interférer avec leur biosynthèse, ou modifier les voies de signalisation des phytohormones (Chanclud and Morel 2016; Fonseca *et al.* 2017; Han and Kahmann 2019). *B. cinerea* exploite l'antagonisme des voies du SA et du JA, par l'intermédiaire de NRP1, pour favoriser le développement de la maladie (El Oirdi *et al.* 2011). En effet, *B. cinerea* produit un β -glucane, un exopolysaccharide induisant l'accumulation de SA qui supprime la voie de signalisation du JA en aval de la synthèse de JA. L'implication d'autres hormones dans la manipulation par *B. cinerea* est fortement suspectée car les hormones participent à un réseau complexe en constantes interaction. *B. cinerea* est également capable de sécréter de l'ABA et de l'ET dont les rôles dans la pathogénicité n'ont pas encore été clairement établis (Cristescu *et al.* 2002; Siewers *et al.* 2006).

1.3. Dualité de la résistance

La résistance se définit comme la résultante phénotypique des défenses des plantes face aux attaques d'agents pathogènes. La résistance se sépare en deux catégories : la résistance quantitative et la résistance qualitative (Figure I.3) (Poland *et al.* 2009; Roux *et al.* 2014; Corwin and Kliebenstein 2017). La résistance qualitative se traduit par des phénotypes de résistance aux maladies qui suivent une distribution binaire : sensible ou résistant. Elle peut être observée lorsque l'agent pathogène est incapable de contourner les défenses constitutives, mais aussi après une réaction de HR qui ne laisse que très peu de symptômes visibles. Ce type de résistance est notamment issu d'une réaction dite incompatible entre la plante et l'agent pathogène et implique souvent des gènes de résistance. Ce type de résistance montre une forte héritabilité. Toutefois la pression de sélection appliquée par les gènes de résistance sur les agents pathogènes et la forte capacité évolutive de ces derniers provoque l'apparition fréquente de variants d'effecteurs non reconnus par la plante, permettant aux agents pathogènes de contourner la résistance mise en place, et conduisant à la sensibilité. A l'inverse, la résistance quantitative se caractérise par un phénotype suivant une distribution continue allant de sensible à résistant. Les infections par *B. cinerea* produisent typiquement

une résistance quantitative. Ce type de résistance résulte de l'intégration de plusieurs voies de perception activées simultanément, chacune ayant une contribution relativement mineure au phénotype de résistance global. Elle est associée à de multiples gènes ayant un effet partiel dans la défense mais qui exercent une plus faible pression de sélection sur les agents pathogènes. La résistance quantitative implique des gènes et des processus épigénétiques en aval du processus de défense, notamment les gènes du métabolisme.

2. Importance des ressources carbonées et azotées dans le métabolisme

Le métabolisme des plantes est au centre des interactions entre plantes et agents pathogènes (Bolton 2009; Rojas *et al.* 2014). Les principales molécules issues des métabolismes primaire et secondaire sont formées essentiellement de carbone, d'azote, d'hydrogène et d'oxygène et l'assimilation de ces différents éléments impacte fortement le statut métabolique des plantes.

2.1. Assimilation du carbone

Le carbone est un élément indispensable à la vie terrestre. Il est nécessaire à la production aussi bien de composés primaires (acides aminés, acides organiques, glucides...) que secondaires (composés phénoliques, glycoalcaloïdes...). Contrairement aux animaux, les plantes sont capables d'assimiler le carbone atmosphérique présent sous forme de dioxyde de carbone (CO₂).

Grace à la photosynthèse les plantes sont capables de synthétiser des molécules organiques en utilisant le CO₂ atmosphérique et l'énergie lumineuse (Lambers *et al.* 2008). Ce mécanisme se déroule dans le mésophylle de tissus sources définis comme les tissus verts producteurs de photoassimilats (hexoses). Les feuilles sont les principaux tissus sources de la plante. Certains organes, comme les tiges ou les fruits, sont capables de photosynthèse mais elle reste très limitée (Hetherington *et al.* 1998). La phase photochimique de la photosynthèse consiste en la captation des photons par la chlorophylle présente dans les chloroplastes. L'énergie acquise permet l'excitation du photosystème II (PSII) qui cède un électron, transmis au photosystème I (PSI) par une succession de réactions d'oxydo-réduction. En parallèle, un

électron est arraché à une molécule d' H_2O au profit du PSII entraînant la libération de O_2 et H^+ dans la lumière des thylakoïdes. Le gradient de protons ainsi établi de part et d'autre de la membrane des thylakoïdes apporte l'énergie nécessaire pour la synthèse d'ATP via l'ATP synthétase et la réduction du NADP^+ en NADPH. Ainsi, l'énergie des photons est convertie en énergie électrique puis chimique stockée sous forme de molécules organiques très énergétique (ATP) et de pouvoir réducteur (NADPH). La deuxième phase de la photosynthèse, le cycle de Calvin, utilise l'ATP et le NADPH formé lors de la phase photochimique afin de fixer le CO_2 atmosphérique sur un récepteur carboné, le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). Cette carboxylation est assurée par la RUBISCO (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygénase). Cette réaction aboutit à la formation d'un composé à six carbones peu stable, métabolisé immédiatement en deux molécules à trois carbones, le 3-phosphoglycerate (3PG). Grâce au NADPH et l'ATP issus de la phase photochimique, les molécules à trois carbones de 3PG sont phosphorylées en 1,3-bisphosphoglycerate (1,3BPG) puis réduites en glycéraldehyde-3-phosphate (GA3P). Pour que le cycle de Calvin puisse se poursuivre, le RuBP doit être régénéré. Ainsi, cinq molécules de GA3P produisent trois molécules de RuBP par l'intermédiaire de plusieurs réactions du cycle des pentoses-phosphates en utilisant trois molécules d'ATP. Par conséquent, sur six molécules de GA3P produits, cinq sont utilisées pour fabriquer trois molécules de RuBP et seulement une molécule de G3P est disponible pour la conversion ultérieure en hexose. Cela nécessite neuf molécules d'ATP et six molécules de NADPH pour trois molécules de CO_2 . Le produit final de la photosynthèse est le saccharose qui peut être transporté au reste de la plante et utilisé par la glycolyse et la respiration.

2.2. Assimilation de l'azote

L'azote est un élément essentiel pour la formation de protéines, des enzymes et coenzymes, des acides nucléiques, de la chlorophylle, des vitamines et des hormones, ainsi qu'un certain nombre de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes. Cependant, contrairement au carbone qui est absorbé par les plantes dans l'atmosphère et disponible dans la nature en quantité importante, la concentration en azote dans les sols est généralement faible. Chez la plupart des plantes, la forme d'azote majoritairement prélevée dans le sol est le nitrate (NO_3^-), l'ammonium (NH_4^+) étant toxique en trop grande quantité (Bloom 2010; Wang *et al.* 2014).

Le nitrate est prélevé par les racines de la plante grâce à un transport actif secondaire faisant intervenir des ATPases et des transporteurs (Orsel and Miller 2010). La demande en azote est déterminée par la vitesse de croissance de la plante. La vitesse d'absorption est régulée par la concentration externe en NO_3^- . Lorsque celle-ci est élevée le *low-affinity transport system* (LATS) est activé sous l'influence de gènes de la famille NRT1. A l'inverse, lorsque la concentration en nitrate dans le sol est faible, le *high-affinity transport system* (HATS) est activé sous l'influence de gènes de la famille NRT2. L'absorption est également régulée par les produits de l'assimilation du nitrate (ion ammonium, acides aminés synthétisés). Une fois absorbé, le nitrate peut être stocké dans la vacuole des cellules racinaires, exporté dans le xylème jusqu'aux parties aériennes ou réduit dans les racines.

La réduction du nitrate en ammonium (NH_4^+), requis pour l'assimilation de l'azote, nécessite l'intervention de deux enzymes séparées spatialement entre le cytoplasme et le plaste (Ali 2020). La nitrate réductase (NR) localisée dans le cytoplasme catalyse la réduction du nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-) nécessitant deux électrons fournis par du NADH ou NADPH. Cette enzyme est régulée par plusieurs mécanismes pour prévenir l'accumulation toxique de NO_2^- (dégradation, synthèse, inactivation réversible, effecteur, concentration en NO_3^-). La nitrite réductase (NiR) est localisée dans les proplastides des racines et les chloroplastes des feuilles et catalyse la réduction du nitrite (NO_2^-) en ammonium (NH_4^+). La réaction nécessite six électrons fournis par la ferrédoxine réduite générée par le PSI dans les feuilles ou produit à partir du NADPH dans la voie des pentoses-phosphates dans les racines.

Prélevé directement ou issue de la réduction du nitrate, l'ammonium est incorporé dans les acides aminés via le système GS/GOGAT. La glutamine synthetase (GS) catalyse la synthèse de glutamine (Gln) en présence d'ATP à partir de NH_4^+ et de glutamate (Glu). Il existe deux formes de GS, la GS1 et la GS2. La GS1, cytosolique et codée par le gène GLN1, permet le recyclage de NH_4^+ pendant la sénescence des feuilles et synthétise la glutamine pour le transport dans le phloème. La GS2, localisée dans les plastides et codée par le gène GLN2, permet l'assimilation du NH_4^+ issu de la réduction du NO_3^- et la réassimilation du NH_4^+ produit par photorespiration. La glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) catalyse la formation de deux molécules de glutamate (Glu) à partir d'une molécule de glutamine (Gln) et d'une molécule de 2-oxoglutarate (α -cetoglutarate, aKG). L'isoforme Fd-GOGAT localisée dans les chloroplastes des cellules compagnes des feuilles, nécessite des électrons provenant

de la ferrédoxine réduite (PSI), alors que l'isoforme NADH-GOGAT localisée dans les plastes des tissus non photosynthétiques nécessite des électrons provenant du NADH (respiration). Il existe également une voie alternative d'assimilation de l'ammonium par l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH) qui catalyse une réaction réversible de formation (ou dégradation) du glutamate à partir d'ammonium et de 2-oxglutarate. Le glutamate et la glutamine ainsi formés peuvent alors donner naissance à d'autres acides aminés, comme la proline ou l'arginine à la suite de réactions de transamination.

2.3. Devenir du carbone et de l'azote

Le saccharose issu de l'assimilation du carbone et la glutamine issue de l'assimilation de l'azote, distribués à travers toute la plante, servent alors à la formation des constituants de la biomasse (paroi, acides nucléiques, protéine, lipides, etc.) mais aussi à la formation de composés secondaires pour l'adaptation à l'environnement.

Le saccharose est transporté dans le phloème grâce au transport symplastique ou au transport apoplastique faisant intervenir de nombreux transporteurs tel que les SWEETs (*sugars will eventually be exported transporter*), *sucrose/H⁺ symporter* (SUT), *sucrose facilitator* (SUF) et *sugar transporter protein* (STP) (Lemoine *et al.* 2013; Yurkov *et al.* 2019). Au niveau des cellules des tissus puits, le saccharose peut être stocké dans la vacuole ou métabolisé après clivage en fructose et UDP-glucose par les saccharose synthases (*sucrose synthases*, SuSy) ou en fructose et glucose par les invertases (Inv). Le glucose peut être transformé en ADP-glucose qui est transféré dans les amyloplastés pour former de l'amidon via principalement la *starch synthase* (SS). Le glucose peut également être transformé en hexoses-phosphates qui sont dégradés par glycolyse pour former les précurseurs des acides gras et du cycle de Krebs, fournisseur d'énergie et de précurseurs métaboliques, notamment pour la synthèse des acides aminés. Les hexoses-phosphates peuvent également rejoindre la voie des pentoses-phosphates pour former les précurseurs des nucléotides et de métabolites spécifiques (par exemple, la voie du shikimate).

L'azote est transporté des racines vers les parties aériennes sous forme minérale ou organique par le xylème, tandis que le partage de l'azote des organes sources aux organes puits a lieu dans le phloème sous forme d'acides aminés (The *et al.* 2021). Ainsi la plante s'assure que les tissus végétaux, qui sont incapables de réduire le nitrate ou qui ne reçoivent

pas d'azote par le flux de transpiration, sont alimentés en azote réduit. Dans le xylème et le phloème bien que la concentration des acides aminés individuels puisse varier, selon l'espèce végétale et l'environnement, l'aspartate, le glutamate, l'asparagine et la glutamine sont souvent les plus abondants (Ohyama *et al.* 2017). Des quantités relativement importantes de N peuvent être stockées à court ou long terme avant et après leur transport. Le type et la quantité de composés azotés déposés dans les différents organes, tissus ou compartiments subcellulaires (par exemple, la vacuole et les plastes/chloroplastes) auront des effets considérables sur le transport et la répartition de l'azote vers les puits. En outre, la formation de pools de stockage de l'azote semble être une stratégie efficace pour contrôler les concentrations cytosoliques et apoplastiques d'azote, et ainsi influencer l'acquisition, le transport et l'assimilation de l'azote par des processus de régulation par anticipation ou par rétroaction.

2.4. Rétrocontrôle

L'azote joue un rôle significatif dans la fixation du carbone, comme élément nécessaire pour la synthèse des protéines et de la chlorophylle. Ainsi, quand la disponibilité en azote est faible, la croissance de la plante est ralentie et les feuilles montrent des chloroses consécutives à la diminution des pigments chlorophylliens. En outre, l'assimilation de l'azote, principalement sous forme de nitrate, nécessite du pouvoir réducteur (NAD(P)H), de l'ATP et des squelettes carbonés fournis par la photosynthèse dans les tissus sources et par la respiration dans les tissus puits (Baslam *et al.* 2021). Lorsque la lumière est saturante, l'assimilation du nitrate dans les feuilles à un coût énergétique plus faible que dans les racines car le pouvoir réducteur et l'ATP sont obtenus sans diminution de la vitesse de fixation du CO₂. En revanche, lorsque la lumière est limitante, l'assimilation du nitrate et la fixation du CO₂ sont en compétition directe pour l'ATP et le pouvoir réducteur généré lors de la photosynthèse, conduisant à une diminution de la fixation de CO₂. De plus, la vitesse d'assimilation du nitrate est plus élevée à la lumière qu'à l'obscurité. En effet, à l'obscurité la NR est phosphorylée par une protéine kinase dépendante du calcium et inactivée par fixation d'une protéine de la famille 14-3-3 alors qu'à la lumière la NR est déphosphorylée et la protéine inhibitrice 14-3-3 est libérée (MacKintosh and Meek 2001). Ceci évite l'accumulation de nitrite à l'obscurité lié au déficit de ferrédoxine réduite nécessaire au fonctionnement de

la nitrite réductase. Le cycle de Krebs (*tricarboxylic acide cycle*, TCA cycle), en plus de sa fonction dans la respiration du carbone, est essentiel à l'assimilation de l'azote. Il permet l'approvisionnement en pouvoir réducteur, en ATP ainsi qu'en squelettes carbonés tel que l'aKG, et dans une moindre mesure l'oxaloacetate (OAA) et le pyruvate, pour la formation d'acides aminés. Cependant, les voies anaplérotiques permettent de réapprovisionner les intermédiaires du cycle de Krebs prélevés pour la biosynthèse des acides aminés et autres molécules. La réaction catalysée par la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) permet de générer de l'OAA directement à partir du PEP. À l'inverse, la pyruvate-orthophosphate dikinase qui catalyse la conversion réversible de pyruvate en PEP est impliquée dans la remobilisation de l'azote pendant la sénescence.

Ainsi, l'assimilation d'azote doit être coordonnée avec l'allocation du carbone pour la synthèse des différents métabolites. D'un côté, il est important d'assurer suffisamment de carbone pour l'assimilation de l'azote et la synthèse des acides aminés. D'un autre côté, l'utilisation des acides aminés pour la croissance ne doit pas être limitée par un manque de sucres, ce qui impliquerait une diminution de la croissance et pourrait conduire à la respiration des acides aminés. Ainsi, le contrôle de l'interaction entre les composés carbonés et azotés constitue un réseau extrêmement complexe, impliquant des signaux émanant du nitrate, de l'ammonium et de métabolites contenant de l'azote tels que le glutamate, la glutamine et l'aspartate, ainsi que des signaux provenant du métabolisme du carbone tel que le glucose, le saccharose ou l'aKG (Nunes-Nesi *et al.* 2010; Baslam *et al.* 2021). La coordination du métabolisme carboné et azoté est obtenue par la détection de la balance carbone / azote cellulaire et la régulation des gènes impliqués dans les processus tel que la photosynthèse, la respiration ou le transport et l'assimilation de l'azote. Le 2-phosphoglycolate (2PG), qui dérive de l'activité oxygénase de la RUBISCO, et l'aKG agissent comme signaux de privation du carbone et de l'azote respectivement. Les niveaux de 2PG et aKG sont corrélés négativement et leur ratio reflète la balance C sur N. En condition de limitation d'azote ou d'excès de carbone, le niveau d'aKG augmente alors que celui de 2PG diminue. Le facteur de transcription aKG/global dimère (NtcA) active les gènes impliqués dans l'absorption et l'assimilation de l'azote alors que le complexe aKG/NdhR, réprime l'opéron de la RUBISCO donc diminue l'absorption de carbone. En outre, le fonctionnement du cycle de Krebs est contrôlé de façon directe par le nitrate qui induit la transcription des gènes de la PEPC, de la citrate synthase et

de l'isocitrate déshydrogénase. A l'inverse, le malate réprime l'expression de la NR affectant également son activité. De plus, les sucres induisent l'expression des gènes codant pour les NRT, NR et GS. Les niveaux de sucres produits par la photosynthèse sont contrôlés par des mécanismes impliquant l'hexokinase dont la fonction de signalisation est indépendante de l'activité enzymatique de phosphorylation du glucose. L'hexokinase contrôle le niveau de glucose-6-phosphate qui est ensuite partagé entre la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates (PPP) et le métabolisme du tréhalose (Chaput *et al.* 2020). La voie oxydative des pentoses-phosphates (OPPP) permet de produire du pouvoir réducteur qui peut être impliqué dans la régulation du métabolisme azoté. Notamment, le gène codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalysant la première réaction de l'OPPP est régulé par NIT-2, un facteur de régulation du métabolisme azoté et par le ratio NADPH / NADP qui dépend du niveau de ROS, augmenté en condition de stress azoté.

La coordination des métabolismes carboné et azoté implique des mécanismes de régulation complexes très conservés tel que les voies de signalisation TOR (*target of rapamycin*), les récepteurs au glutamate, les voies SnRK1 (*sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1*) régulé par le pool d'adénylate, et la protéine PII qui forme un complexe homotrimérique contenant des sites de fixation pour l'aKG, l'ATP et des protéines cibles pour en modifier l'activité (Nunes-Nesi *et al.* 2010). Par exemple, lorsque les niveaux d'azote sont élevés, ce qui se traduit par un niveau faible d'aKG, la protéine PII interagit avec l'enzyme N-acetyl glutamate kinase (NAGK) impliquée dans la biosynthèse de l'arginine, augmentant son activité pour favoriser le stockage d'azote. De plus, la régulation du métabolisme azoté peut se faire par l'intermédiaire de différentes voies hormonales qui régulent la croissance et le développement (Wen *et al.* 2020). Ainsi, l'auxine et l'éthylène régulent les transporteurs de nitrate NRT1 et NRT2, de façon positive et négative respectivement. La NR est régulée positivement par l'auxine et les cytokinines qui régulent aussi positivement la NiR et la GS. A l'inverse l'ABA régule négativement la NR et NiR.

3. Rôle du métabolisme dans la défense des plantes

3.1. Implication du métabolisme primaire et secondaire dans la défense

L'activation des réponses de défense entraîne une forte remobilisation du métabolisme énergétique et carboné pour la synthèse de composés de défense. Ainsi, l'activation des mécanismes de défense induit la transcription des gènes associés aux processus impliqués dans la production d'énergie, tels que la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le cycle de Krebs, le transport mitochondrial des électrons, la biosynthèse de l'ATP, et la biosynthèse de certains acides aminés tels que la lysine et la méthionine dont le catabolisme conduit à la production d'énergie, et le glutamate, l'arginine, la sérine et la glycine associés à la photorespiration (Bolton 2009; Rojas *et al.* 2014). A l'inverse, les gènes associés aux processus d'assimilation tels que la photosynthèse, le métabolisme de l'amidon, le métabolisme des lipides, le métabolisme des C1 et la biosynthèse de certains acides aminés (leucine, isoleucine et valine) sont réprimés. Le nombre de gènes induits après inoculation augmente avec le temps, ce qui démontre les efforts de l'hôte pour empêcher la poursuite de l'infection par l'agent pathogène (Mulema and Denby 2012). En revanche, le nombre de gènes induits diminue avec la distance par rapport à la lésion, ce qui indique que davantage d'événements potentiellement liés à la défense se déroulent dans les tissus proches de la lésion. Néanmoins, la modification de la transcription des gènes après infection peut également être à l'initiative du pathogène qui veut perturber son environnement (Weiberg *et al.* 2013b).

Il a été suggéré que l'activité photosynthétique est modifiée pour répondre aux demandes induites par la défense (Berger *et al.* 2007; Kanwar and Jha 2019). L'activité photosynthétique est réduite localement au niveau du site d'infection afin de libérer des ressources qui peuvent être utilisées pour la réponse de défense. La réduction localisée de la photosynthèse et l'augmentation des demandes cellulaires pendant la réponse de résistance initie la transition du statut de source au statut de puits dans les tissus infectés. Les gènes spécifiques des tissus sources sont réprimés et ceux spécifiques des tissus puits sont induits, comme par exemple l'augmentation de l'activité invertase qui clive le saccharose apoplastique en glucose et fructose, conduisant à une augmentation du ratio hexose / saccharose dans les tissus infectés (Berger *et al.* 2004). Ces hexoses sont ensuite transportés dans la cellule où ils peuvent combler les besoins en énergie et en carbone pour la réponse de défense. Ce

transport réduit également la concentration d'hexose dans l'apoplaste, réduisant ainsi les nutriments potentiels pour les pathogènes colonisant l'apoplaste. De plus, l'augmentation des sucres serait un signal métabolique qui induit l'expression de gènes liés à la défense et la répression de la photosynthèse chez la tige de tomate, un tissu puits. La concentration relative en fructose par rapport au contenu total en sucres solubles est un bon marqueur de la sensibilité des plantes à *B. cinerea* et de la croissance des lésions quelques jours après l'inoculation (Lecompte *et al.* 2017). De plus, l'évolution différenciée des teneurs en glucose et en fructose dans les tiges de tomates après infection suggère un rôle spécifique du fructose au cours du processus de défense.

Le métabolisme de l'azote est également impliqué dans les réponses de défense (Seifi *et al.* 2013). En effet, les demandes liées aux mécanismes de défense peuvent conduire au recyclage d'acides aminés en intermédiaires carbonés (aKG, acétoacétate, acétyl-CoA, fumarate, OAA, pyruvate et succinyl-CoA) pour assurer la production d'énergie. Le shunt du GABA (4-aminobutyrate), qui produit du succinate à partir de glutamate ou d'aKG, pourrait être impliqué dans le soutien de la réponse de défense aux agents pathogènes. De plus, avec certains agents pathogènes biotrophes, les plantes sur-expriment la GS1 et l'asparagine synthétase, entraînant la remobilisation de l'azote sous forme de glutamine et d'asparagine et qui sont ensuite transportés loin des sites d'infection afin de protéger le contenu en azote de la plante hôte et de priver l'agent pathogène de nutriments azotés. Ce mécanisme, induisant la senescence des tissus infectés est généralement inefficace contre les agents pathogènes nécrotrophes chez qui, à l'inverse, une translocation de l'azote vers le site d'infection est observée, afin d'alimenter le métabolisme et maintenir les cellules hôtes en vie. Ce mécanisme peut être aussi à l'initiative du pathogène afin d'assurer la disponibilité des ressources.

En plus de ces voies métaboliques centrales, d'autres voies génératrices d'énergie sont activées pendant la réponse de défense, comme par exemple, le métabolisme du malate permettant de générer du NADPH par l'enzyme malique, le cycle du glyoxylate, ou la β -oxydation (qui assure la dégradation des acides gras en générant une quantité significative d'énergie et de pouvoir réducteur).

L'équilibre redox cellulaire est impliqué dans les mécanismes de défense par son rôle dans la durée de vie des cellules et la mise en place de la HR. En général, un équilibre plus

réducteur permet le maintien des cellules en vie, tandis que le stress oxydatif entraîne la sénescence et la mort cellulaire (de Pinto *et al.* 2012). D'une part, le stress oxydatif est assuré en majorité par les enzymes NADPH-oxydase, où le NADPH nécessaire à la formation de ROS est fourni en partie par la voie oxydative des pentoses-phosphates. Des mécanismes tels que la photorespiration via la glycolate oxydase (GOX, enzyme de génératrice de ROS), la production d'espèces réactives de l'azote et l'oxydation des polyamines jouent également un rôle dans le stress oxydatif. D'autre part, le maintien du statut redox est assuré en grande partie par le glutathion mais également le maintien du cycle GS/GOGAT, préservant ainsi la viabilité des cellules hôtes.

3.2. Effet de l'environnement sur l'interaction plante-pathogène

Les stress, abiotique et biotique, se produisent souvent simultanément. Leurs effets combinés sur les plantes sont beaucoup plus complexes qu'un simple effet additif. Les stress abiotiques peuvent avoir un effet négatif ou positif sur la sensibilité des plantes à un agent pathogène donné.

Les stress liés à la température et à la disponibilité en eau sont de plus en plus fréquents et ont des impacts différents sur les interactions entre les plantes et les agents pathogènes (Zarattini *et al.* 2021). Les températures élevées affectent l'expression des gènes dépendants du SA par l'action antagoniste de JA/ET, augmentant ainsi la sensibilité aux agents pathogènes biotrophes. A l'inverse, les plantes exposées à de basses températures présentent une augmentation de la défense liée au SA, tandis que la signalisation dépendante du JA est inhibée. Ainsi, le stress au froid confère une résistance accrue aux maladies causées par les agents pathogènes biotrophes. La sécheresse affecte fortement la défense des plantes mais induit également divers changements métaboliques et physiologiques dans les tissus végétaux. L'issue de la maladie dépend fortement du système pathogène considéré, et donc de la manière dont les voies de signalisation déclenchées par le stress hydrique et biotique interagissent pour affecter l'expression des gènes de défense. En revanche, une synthèse réduite de métabolites spécialisés tels que les terpénoïdes, les flavonoïdes et les acides phénoliques est observée alors que les niveaux d'ABA, hormones impliquées dans le stress hydrique, sont augmentés.

Au-delà de l'aspect nutritif qu'apportent les éléments du sol, la disponibilité des ressources impacte les interactions entre plantes et agents pathogènes. En effet, la quantité de ressource disponible modifie le métabolisme de la plante hôte ainsi que l'architecture de plante et influence également la quantité et la qualité des ressources disponibles pour le pathogène. Dans l'ensemble, la disponibilité des nutriments pour les plantes affecte la transcription des gènes liés à la pathogenèse pendant l'infection mais cela dépend de l'agent pathogène et de la plante considérée. Par exemple, la limitation en phosphate peut moduler la signalisation de défense en activant la voie du JA et en inhibant l'expression des gènes dépendants du SA. Une limitation en potassium entraîne des réponses opposées entre différentes espèces de plantes.

La fertilisation azotée est généralement utilisée pour augmenter le rendement des plantes cultivées car elle induit une meilleure croissance liée à un développement foliaire plus important. Cette croissance accrue provoque une modification du couvert végétal et du microclimat de la plante, favorisant ainsi le maintien de l'humidité et d'une semi obscurité, favorable au développement et à la dissémination de certains agents pathogènes. De plus, de par son rôle central dans le métabolisme, une modification du statut azoté des plantes provoque des changements notamment sur le statut redox des cellules et sur la disponibilité des précurseurs de synthèse de composés de défense, impactant la réponse de défense des plantes. Ainsi, la connexion entre le statut azoté et la défense va au-delà d'une relation métabolique directe.

La limitation en azote affecte de façon variée les interactions entre les plantes et les agents pathogènes (Lecompte *et al.* 2010, 2013; Fagard *et al.* 2014; Sun *et al.* 2020). Les effets ne sont pas aussi contrastés que ceux initialement suggérés. Ainsi, la limitation en azote n'entraîne pas forcément une augmentation de la sensibilité des plantes aux biotrophes et une diminution de la sensibilité aux nécrotrophes, suggérant que la modification de la sensibilité des plantes par la fertilisation azotée résulte de plusieurs mécanismes différents. Ainsi, pour l'interaction avec *B. cinerea*, la fertilisation azotée influence le processus d'infection différemment selon l'espèce végétale. Par exemple, un taux élevé de nitrate entraîne une augmentation de la maladie chez la vigne, le fraisier et *A. thaliana*, mais une sensibilité réduite chez la tomate.

Chez *B. cinerea*, des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires, de ROS, et d'enzymes impliquées dans les processus de détoxification, sont principalement exprimés en présence de nitrates élevés, ce qui suggère l'existence d'une meilleure détoxification par *B. cinerea* des molécules de défense produites par la plante hôte (Soulie *et al.* 2020). En revanche, la limitation en azote n'affecte que faiblement la réponse qualitative de la plante. La grande majorité des gènes d'*A. thaliana* sont exprimés de façon similaire en réponse à *B. cinerea* dans toutes les conditions de nitrate, avec parfois de légères différences dans l'intensité de la réponse. Parmi les quelques gènes différentiellement exprimés se trouvent des gènes liés au métabolisme de l'azote et à la défense (Soulie *et al.* 2020). L'expression des gènes dépendants du JA est fortement modulée par la disponibilité en nitrate, avec des niveaux d'expression plus élevés en condition de limitation, ce qui indique qu'au moins une partie de la tolérance accrue en faible quantité de nitrate pourrait résulter d'un niveau de défense plus élevé, dépendant du JA. Chez la tomate, des gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires associés à la défense, tels que les flavonoïdes et les phénylpropanoïdes sont induits en condition d'azote suffisant (Vega *et al.* 2015). De plus, le gène codant le facteur de transcription ERF1, régulateur positif de la signalisation JA/ET, est induit en réponse à *B. cinerea* dans des conditions d'azote suffisant, alors qu'il était réprimé dans des conditions de limitation en azote. Un autre gène codant pour le facteur de transcription WRKY70 qui active les voies du SA et réprime celles du JA, est réprimé en réponse à *B. cinerea*, mais seulement en condition de limitation en azote.

4. Modélisation des flux métaboliques

Le comportement métabolique d'un organisme résulte de la somme des propriétés individuelles des molécules (réactivité) et des propriétés collectives (une enzyme n'a pas la même activité *in vivo* qu'*in vitro*). Ainsi on ne peut comprendre un système dans son ensemble si l'on ne regarde qu'une partie isolée. Dans cette idée, la variation de pools métaboliques peut s'interpréter différemment si l'on considère les flux métaboliques qui y sont associés permettant une analyse dynamique du système afin de comprendre le fonctionnement des voies métaboliques et de caractériser la capacité d'adaptation de l'organisme considéré.

Le métabolisme peut être décrit sous forme d'un réseau complexe où chaque réaction permet la conversion d'un ou plusieurs métabolites (appelés substrats) en un ou plusieurs

autres (appelés produits) et ce par l'action d'enzymes possédant une activité catalytique ou plus rarement de façon spontanée. Ces réactions peuvent dans certains cas être réversible par l'action de la même enzyme ou grâce à une enzyme différente catalysant la réaction inverse. L'activité des enzymes (sens de réaction, vitesse de réaction, localisation ...) est contrôlée par des régulations positives ou négatives. De plus, plusieurs enzymes peuvent catalyser la même réaction (on parle d'isoforme d'enzyme) et à l'inverse une même enzyme peut avoir différents substrats et donc catalyser plusieurs réactions différentes, entraînant redondance et complexité au sein du métabolisme. Ainsi, le métabolisme n'est pas un simple processus linéaire mais un ensemble de réactions interconnectées (Kruger and Ratcliffe 2008), où certains métabolites sont très connectés (tel que l' H_2O , ou les cofacteurs, l'ATP ou encore l'acétyl-CoA), intervenant dans de très nombreuses réactions créant ainsi des « hub » métaboliques. Le métabolisme inclut également le transport des métabolites entre les différents compartiments cellulaires et entre différentes cellules ou organes. Celui-ci peut être réalisé de façon passive par diffusion ou à l'aide de transporteurs en fonction de la taille du métabolite, de ses propriétés chimiques et de son gradient de concentration. L'ensemble de ces propriétés, complexifiant l'analyse exhaustive du métabolisme, confère aux organismes leur robustesse et leur faculté d'adaptation.

Pour chaque réaction, le flux métabolique associé correspond à la vitesse de synthèse de son ou ses produits de réaction. Le flux dépend de la concentration en enzyme, de ses propriétés cinétiques intrinsèques, des concentrations en substrats ainsi que de toutes les molécules ou ions pouvant jouer un rôle régulateur. Il existe différents niveaux de contrôle des vitesses de réaction des enzymes et donc des flux métaboliques : les régulations transcriptionnelles et traductionnelles, qui jouent sur la quantité d'enzyme, et les régulations post-traductionnelles et allostériques, qui modulent directement l'activité de l'enzyme une fois celle-ci synthétisée.

Il n'existe pas de méthode de mesure directe des flux métaboliques (Dersch *et al.* 2016). Ce type d'analyse est très complexe notamment à cause de la grande taille des réseaux (plusieurs milliers de réactions pour un organisme unicellulaire), à la présence de compartimentation physique et fonctionnelle et aux mécanismes de régulations. La modélisation mathématique permet l'estimation de ces valeurs difficilement mesurables. L'intérêt de la modélisation réside dans son caractère intégratif, permettant la prise en

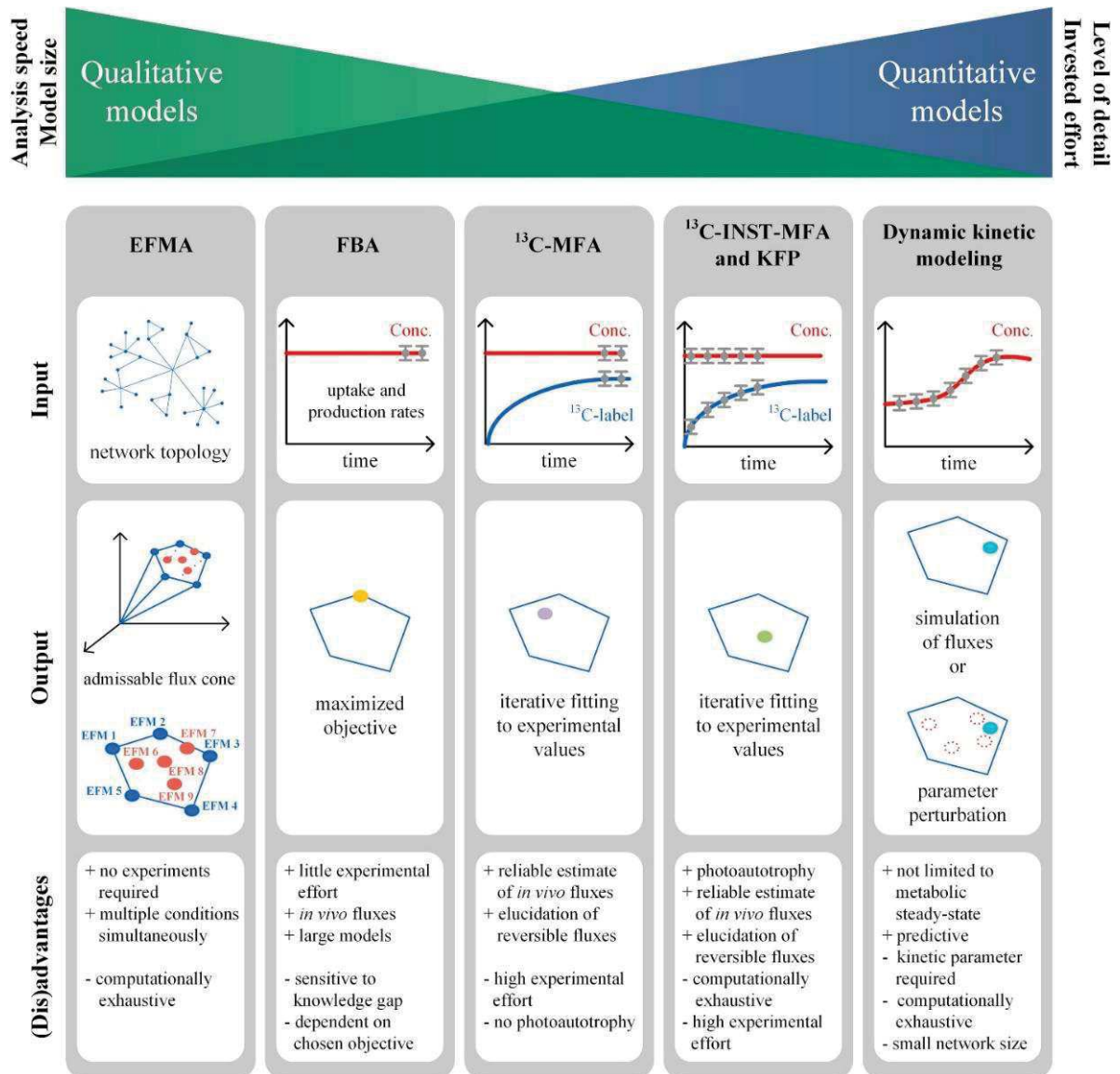


Figure I.4 : Approches technologiques pour l'analyse des flux métaboliques des plantes

(D'après Dersch *et al.* 2016)

compte de l'ensemble du métabolisme cellulaire. De plus, elle peut permettre la détermination des distributions quantitatives des flux, incluant l'ensemble des niveaux de régulation (expression génique, traduction, modifications post-traductionnelles, régulations par les métabolites).

Il existe plusieurs types de modèles permettant de décrire le métabolisme cellulaire (Figure I.4), qui peuvent être classés en deux catégories principales : les modèles cinétiques et les modèles stœchiométriques (Dersch *et al.* 2016; Clark *et al.* 2020).

Les modèles cinétiques décrivent de façon détaillée les propriétés cinétiques de chaque enzyme constituant le réseau métabolique, afin d'en prédire les flux (Rohwer 2012). Ils nécessitent donc un grand nombre de données biologiques (paramètres cinétiques des enzymes et concentrations des métabolites du réseau étudié), et une connaissance approfondie de la structure du réseau métabolique étudié. De fait, en pratique, la modélisation cinétique est souvent limitée à l'étude de réseaux métaboliques de taille restreinte, généralement inférieurs à 50 réactions et elle concerne des parties extrêmement bien connues du métabolisme cellulaire.

A l'inverse, les modèles stœchiométriques ne nécessitent pas la connaissance préalable des paramètres cinétiques de toutes les enzymes constituant le réseau métabolique étudié. Seule est requise l'identification des réactions biochimiques mises en jeu et la stœchiométrie associée à chaque réaction (Figure I.5). Ces modèles sont basés sur la loi fondamentale de conservation de la masse : tous les composés qui entrent dans le réseau métabolique doivent être soit récupérés en sortie, soit transformés, soit inchangés. Pour estimer les flux, ces modèles peuvent être résolus par deux approches : l'analyse par marquage isotopique ou une analyse sous contraintes.

L'analyse par marquage isotopique repose sur l'apport d'un précurseur ou d'un intermédiaire métabolique marqué par un isotope lourd stable (^{13}C , ^{15}N), puis l'étude de sa redistribution dans l'ensemble du réseau, jusqu'à l'obtention d'un état stationnaire, afin de calculer les valeurs de flux (Roscher *et al.* 2000; Allen and Young 2020; Arroo *et al.* 2021). Cette méthode a l'avantage de pouvoir travailler à l'état stationnaire ou en dynamique, de discriminer différentes voies de biosynthèse possibles pour un même produit, de prendre en compte la réversibilité de certaines réactions du réseau considéré, de quantifier les flux dans des cycles et de prendre en compte la compartimentation de certaines réactions. En revanche

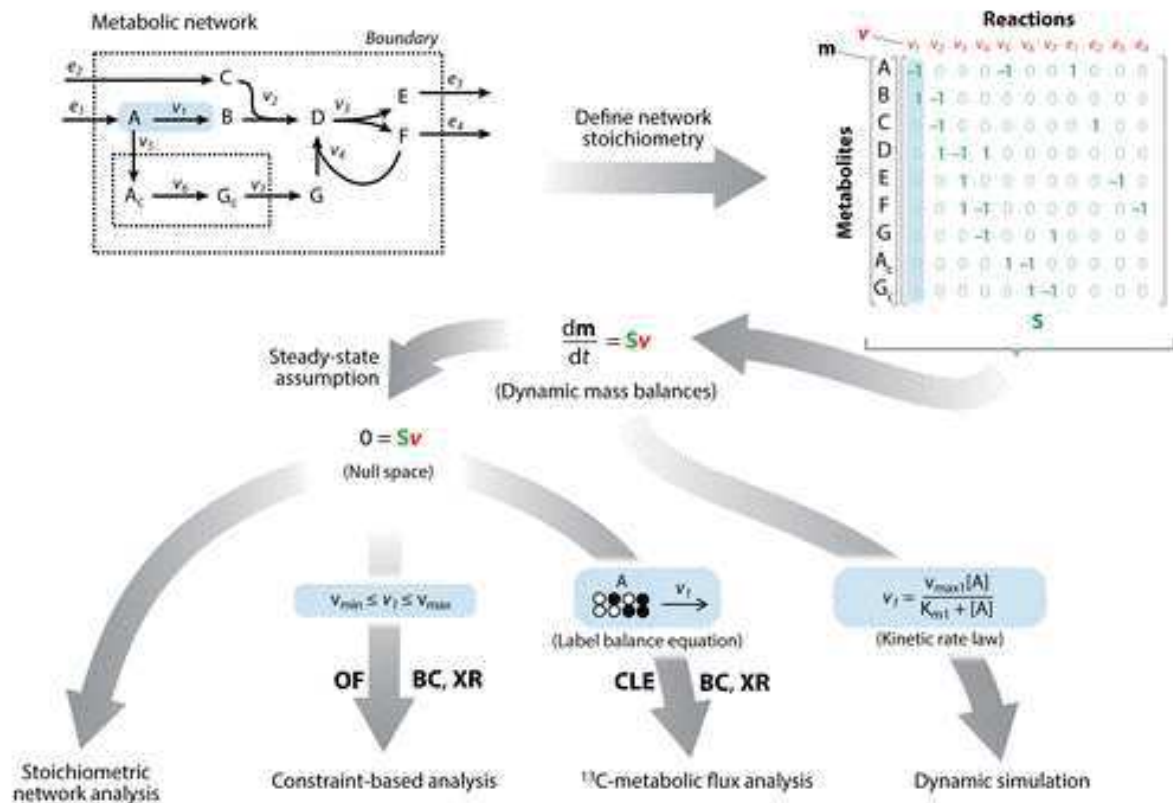


Figure I.5 : Principes et approches de la modélisation métabolique chez les plantes

Le réseau métabolique est codé en une matrice stœchiométrique (S) et en vecteurs de concentrations de métabolites (m) et de vitesses de réaction (v). Sur la base du réseau stœchiométrique, les bilans de masse de tous les métabolites peuvent être complétés par des lois de vitesse cinétique pour l'analyse et la simulation de la dynamique du système. Dans un contexte physiologique constant, on peut supposer que les niveaux de métabolites et les vitesses de réaction sont constants (hypothèse de l'état d'équilibre). L'analyse du réseau stœchiométrique peut être utilisée pour révéler toutes les voies distinctes au sein du réseau métabolique. La modélisation basée sur les contraintes et l'analyse des flux métaboliques au ¹³C explorent les états de flux, souvent en intégrant des informations supplémentaires sur la composition de la biomasse cellulaire (BC), les taux d'échange mesurés avec l'environnement (XR), la fonction objectif (OF) et les expériences de marquage du carbone (CLE). (D'après Clark *et al.* 2020)

elle a également des limites. Cette méthode n'est applicable qu'à des tissus ou des cellules en croissance et est limitée à des réseaux de quelques dizaines de réactions, environ. Elle est aussi plus coûteuse et plus lourde en terme expérimental.

L'analyse sous contrainte quant à elle permet de prendre en compte de plus grands réseaux métaboliques, comme ceux reconstruits à partir des données du génome (*genome-scale metabolic model*). Elle nécessite de définir le système d'étude c'est-à-dire que le modèle doit décrire chaque métabolite et chaque réaction qui composent le réseau (Kauffman *et al.* 2003; Sahu *et al.* 2021). Ainsi le modélisateur est libre de définir les limites du système étudié. La définition du réseau conduit à l'écriture de l'ensemble des réactions sous forme d'équations stœchiométriques. Afin de restreindre l'espace des solutions de flux à un sous-ensemble de solution possibles, il est nécessaire d'appliquer des contraintes sur les flux. Celles-ci sont imposées par les données d'accumulation et ou de synthèse de métabolites mesurées expérimentalement, l'hypothèse de l'état stationnaire impliquant une absence de variation des concentrations en métabolites internes. Enfin, une fonction objectif, définie à partir d'une hypothèse d'optimalité du fonctionnement biologique (Orth *et al.* 2010), permet de calculer une distribution optimale des flux.

L'utilisation de la modélisation sous-contraintes est de plus en plus fréquente chez les plantes. Par exemple, dans le cas de la tomate, un modèle *genome-scale* a été reconstruit et décrit avec succès le comportement métabolique connu de la feuille (Yuan *et al.* 2016). Plus récemment, un modèle multi-organes qui simule la répartition des flux métaboliques à l'échelle de la plante entière a été décrit (Gerlin *et al.* 2021). Des réseaux métaboliques plus restreints, reconstruits manuellement à partir des données de la littérature, ont également été utilisés pour décrire les modifications de flux métaboliques liées à la maturation et à la respiration climactérique des fruits de tomate (Colombié *et al.* 2015, 2017). L'utilisation de la modélisation pour l'étude des interactions plantes-pathogènes est encore peu répandue. Le comportement métabolique de feuilles de pomme de terre affectées par le pathogène *Phytophthora infestans* a été décrit grâce à un modèle *genome-scale* (Botero *et al.* 2018). Aussi, des modèles métaboliques intégrés, reconstruits à partir de modèles de deux espèces, ont été utilisés pour décrire les interactions entre la tomate et *Phytophthora infestans* (Rodenburg *et al.* 2019) et *Ralstonia solanacearum* (Gerlin 2018).

5. Problématique de recherche

Cette introduction montre que même si certains aspects moléculaires de l'interaction entre plantes et pathogènes sont bien connus, certains mécanismes de défense, notamment face aux nécrotrophes comme *Botrytis cinerea*, ne sont pas totalement élucidés. Le métabolisme se trouve au centre de l'interaction avec d'un côté, *B. cinerea* qui est capable de modifier le métabolisme de la plante à son avantage, et d'un autre côté, la plante qui doit distribuer les ressources nécessaires à l'immunité tout en maintenant l'homéostasie cellulaire. A cela s'ajoute des zones d'ombre sur les effets des stress abiotiques et en particulier des ressources azotées sur les capacités de défense. Ceci souligne la complexité d'avoir une image globale des interactions métaboliques du fait de l'imbrication entre plantes, pathogènes et environnement. Ainsi, l'intégration des flux métaboliques grâce à la modélisation mathématique permettrait d'avoir une vision plus intégrée du métabolisme dans ce contexte de combinaison d'interactions biotique et abiotique. Il a été montré que la défense résulte de multiples processus. S'il est facile d'identifier des marqueurs de la défense (gènes, transcrits, protéines, métabolites, hormones, etc.), la question des marqueurs de la résistance reste ouverte : combien faut-il de marqueurs pour décrire quantitativement la résistance ? Ces marqueurs sont-ils robustes, c'est-à-dire stable dans différents environnements ?

L'objet de la thèse est de caractériser les conditions métaboliques de l'activation d'une défense efficace contre *B. cinerea*, se traduisant par une réduction des symptômes observés. L'azote étant capable de moduler les symptômes, la démarche consiste à étudier la composition du métabolisme primaire et de voies connues du métabolisme secondaire impliquées dans la défense, afin d'identifier des différences métaboliques chez des individus sensibles et résistants. En outre, l'identification de marqueurs métaboliques de pré-infection favorables à une défense efficace devrait contribuer au développement de méthodes de pilotage agronomique du statut métabolique des plantes, pour lutter de manière durable contre les bioagresseurs. Ces marqueurs métaboliques pourraient être modulés par le génotype, ou par l'environnement.

Pour répondre à cet objectif, cette thèse repose sur trois axes :

- L'analyse de l'expression des gènes du métabolisme des sucres (Chapitre III) : Le métabolisme des sucres est fortement modifié lors de la mise en place de la défense, avec

l'induction de gènes codant des transporteurs, des invertases ou des hexokinases. De plus, les précédents travaux du laboratoire ont mis en évidence le rôle particulier du fructose dans l'interaction tomate / *B. cinerea*. Ainsi, nous avons analysé l'expression des gènes de saccharose synthase, invertase, hexokinase, fructokinase et phosphofructokinase, impliqués dans la partition entre glucose et fructose. Il s'agit d'étudier comment le métabolisme des sucres, qui ne constitue qu'une facette de la défense, contribue à la résistance.

- Les analyses métabolomiques ciblées et non ciblées (Chapitre IV) : Des analyses quantitatives multi-ciblées et semi-quantitatives non ciblées ont été réalisées afin, d'une part, de générer des données utilisables en modélisation des flux, et d'autre part, de mettre en évidence les modifications différentielles des pools métaboliques lors de divers niveaux de sensibilité à *B. cinerea*.
- La modélisation des flux métaboliques (Chapitre V) : La modélisation sous contraintes des flux métaboliques permet de mettre en évidence de façon intégrée les modifications métaboliques qui sont favorables à la résistance.

Les chapitres III, IV et V présentent ces différentes approches. Préalablement, le chapitre II présente les matériels et méthodes mis en œuvre au cours de cette thèse. Enfin, le chapitre VI propose une analyse de résultats préliminaires des profils hormonaux, complémentaires à ces travaux de thèse.

Références

- Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, et al. 2007.** ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1665–1681.
- Aerts N, Pereira Mendes M, Van Wees SCM. 2021.** Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *Plant Journal* **105**: 489–504.
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM. 2012.** Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* **17**: 73–90.
- Aldon D, Mbengue M, Mazars C, Galaud JP. 2018.** Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1–19.
- Ali A. 2020.** Nitrate assimilation pathway in higher plants: Critical role in nitrogen signalling and utilization. *Plant Science Today* **7**: 157–163.
- Allen DK, Young JD. 2020.** Tracing metabolic flux through time and space with isotope labeling experiments. *Current Opinion in Biotechnology* **64**: 92–100.
- Anderson JP, Badruzsafari E, Schenk PM, et al. 2004.** Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3460–3479.
- Arroo RRJ, Bhambra AS, Hano C, Renda G, Ruparelia KC, Wang MF. 2021.** Analysis of plant secondary metabolism using stable isotope-labelled precursors. *Phytochemical Analysis* **32**: 62–68.
- Baccelli I. 2015.** Cerato-platanin family proteins: One function for multiple biological roles? *Frontiers in Plant Science* **5**: 2013–2016.
- Bajguz A, Chmur M, Gruszka D. 2020.** Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–9.
- Balint-Kurti PJ. 2019.** The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* **20**: 1163–1178.
- Bari R, Jones JDG. 2009.** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473–488.
- Baslam M, Mitsui T, Sueyoshi K, Ohyama T. 2021.** Recent advances in carbon and nitrogen metabolism in C3 plants. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1–39.
- Bellin D, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H. 2013.** Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 271–277.
- Bergelson J, Purrington CB. 1996.** Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *American Naturalist* **148**: 536–558.
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T. 2004.** Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* **122**: 419–428.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. 2007.** Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4019–4026.
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H. 2015.** Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**: 521–539.
- Bizuneh GK. 2021.** The chemical diversity and biological activities of phytoalexins. *Advances in Traditional Medicine* **21**: 31–43.
- Bjornson M, Zipfel C. 2021.** Plant immunity: Crosstalk between plant immune receptors. *Current Biology* **31**: R796–R798.
- Bloom AJ. 2010.** Energetics of Nitrogen Acquisition. *Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-genomic Era* **42**: 63–81.
- Blume B, Nurnberger T, Nass N, Scheel D. 2000.** Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425–1440.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003.** Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 519–546.
- Boller T, Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379–407.
- Bolton MD. 2009.** Primary Metabolism and Plant Defense—Fuel for the Fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 487–497.
- Botero K, Restrepo S, Pinzón A. 2018.** A genome-scale metabolic model of potato late blight suggests a photosynthesis suppression mechanism. *BMC genomics* **19**.
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C. 1994.** Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703–1712.
- Carisse O. 2015.** Epidemiology and aerobiology of Botrytis spp. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen*

and its Management in Agricultural Systems: 127–148.

Čarná M, Repka V, Skůpa P, Šturdík E. 2014. Auxins in defense strategies. *Biologia (Poland)* **69**: 1255–1263.

Chanclud E, Morel JB. 2016. Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular plant pathology* **17**: 1289–1297.

Chaput V, Martin A, Lejay L, Doerner P. 2020. Redox metabolism: The hidden player in carbon and nitrogen signaling? *Journal of Experimental Botany* **71**: 3816–3826.

Chethana KWT, Jayawardena RS, Chen YJ, et al. 2021. *Appressorial interactions with host and their evolution*. Springer Netherlands.

Cheval C, Aldon D, Galaud JP, Ranty B. 2013. Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1833**: 1766–1771.

Chini A, Fonseca S, Fernández G, et al. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671.

Choi J, Choi D, Lee S, Ryu CM, Hwang I. 2011. Cytokinins and plant immunity: Old foes or new friends? *Trends in Plant Science* **16**: 388–394.

Choquer M, Fournier E, Kunz C, et al. 2007. Botrytis cinerea virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* **277**: 1–10.

Choquer M, Rasclé C, Gonçalves IR, et al. 2021. The infection cushion of Botrytis cinerea: a fungal 'weapon' of plant-biomass destruction. *Environmental Microbiology* **23**: 2293–2314.

Chowdhury J, Coad BR, Little A. 2019. Cell wall responses to biotrophic fungal pathogen invasion. *Annual Plant Reviews Online* **2**: 1001–1030.

Clark TJ, Guo L, Morgan J, Schwender J. 2020. Modeling Plant Metabolism: From Network Reconstruction to Mechanistic Models. *Annual Review of Plant Biology* **71**: 303–326.

Colombié S, Beauvoit B, Nazaret C, et al. 2017. Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling. *New Phytologist* **213**: 1726–1739.

Colombié S, Nazaret C, Bénard C, et al. 2015. Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing Solanum lycopersicum (tomato) fruit. *Plant Journal* **81**: 24–39.

Corwin JA, Kliebenstein DJ. 2017. Quantitative resistance: More than just perception of a pathogen. *Plant Cell* **29**: 655–665.

Cristescu SM, De Martinis D, Te Lintel Hekkert S, Parker DH, Harren FJM. 2002. Ethylene production

by Botrytis cinerea in vitro and in tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5342–5350.

Cui H, Tsuda K, Parker JE. 2015. Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 487–511.

D'Ambrosio JM, Gonorazky G, Sueldo DJ, et al. 2018. The sesquiterpene botrydial from Botrytis cinerea induces phosphatidic acid production in tomato cell suspensions. *Planta* **247**: 1001–1009.

Dalmaís B, Schumacher J, Moraga J, et al. 2011. The Botrytis cinerea phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology* **12**: 564–579.

Dersch LM, Beckers V, Wittmann C. 2016. Green pathways: Metabolic network analysis of plant systems. *Metabolic Engineering* **34**: 1–24.

Devendrakumar KT, Li X, Zhang Y. 2018. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**: 2981–2989.

Dickman MB, Fluhr R. 2013. Centrality of Host Cell Death in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 543–570.

Dixon RA. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843–847.

Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548.

Durner J, Klessig DF. 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 369–374.

Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185–209.

Elad Y. 2015. Cultural and integrated control of Botrytis spp. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*: 149–164.

Elad Y, Vivier M, Fillinger S. 2016. <Emphasis Type="Italic">Botrytis</Emphasis>, the Good, the Bad and the Ugly. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*: 1–15.

Erb M, Kliebenstein DJ. 2020. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. *Plant Physiology* **184**: 39–52.

Espino JJ, Gutiérrez-Sánchez G, Brito N, Shah P, Orlando R, González C. 2010. The Botrytis cinerea early secretome. *Proteomics* **10**: 3020–3034.

Fagard M, Launay A, Clément G, et al. 2014. Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany* **65**: 5643–5656.

- Fahey JW, Zalcman AT, Talalay P. 2001.** The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **56**: 5–51.
- Fillinger S, Walker A-S. 2016.** Chemical Control and Resistance Management of Botrytis Diseases In: *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Cham: Springer International Publishing, 189–216.
- Flor HH. 1971.** Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275–296.
- Flors V, Ton J, Jakab G, Mauch-Mani B. 2005.** Abscisic acid and callose: Team players in defence against pathogens? *Journal of Phytopathology* **153**: 377–383.
- Fonseca S, Radhakrishnan D, Prasad K, Chini A. 2017.** Fungal Production and Manipulation of Plant Hormones. *Current Medicinal Chemistry* **25**: 253–267.
- Frías M, González C, Brito N. 2011.** BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to Botrytis cinerea virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist* **192**: 483–495.
- Friedman M. 2002.** Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 5751–5780.
- Fu ZQ, Dong X. 2013.** Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 839–863.
- Gerlin L. 2018.** Study of metabolic interactions between plant and xylem-colonizing bacteria using constraint-based modeling.
- Gerlin L, Cottret L, Escourrou A, Genin S, Baroukh C. 2021.** A multi-organ metabolic model of tomato predicts plant responses to nutritional and genetic perturbations. *Plant Physiology*: 1–15.
- Glazebrook J. 2005a.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- Glazebrook J. 2005b.** Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- Gleadow RM, Møller BL. 2014.** Cyanogenic glycosides: Synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 155–185.
- González-Fernández R, Valero-Galván J, Gómez-Gálvez FJ, Jorrín-Novo J V. 2015.** Unraveling the in vitro secretome of the phytopathogen Botrytis cinerea to understand the interaction with its hosts. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–7.
- Greeff C, Roux M, Mundy J, Petersen M. 2012a.** Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–7.
- Greeff C, Roux M, Mundy J, Petersen M. 2012b.** Erratum to: Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity (Frontiers in Plant Science (2012), 3, 209, doi: 10.3389/fpls.2012.00209). *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–3.
- Gutschick VP. 1999.** Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist* **143**: 3–18.
- Halkier BA, Gershenzon J. 2006.** BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF GLUCOSINOLATES. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 303–333.
- Hammond-Kosack KE, Parker JE. 2003.** Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177–193.
- Han X, Kahmann R. 2019.** Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Have A ten, Espino JJ, Dekkers E, et al. 2010.** The Botrytis cinerea aspartic proteinase family. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 53–65.
- Heil M, Baldwin IT. 2002.** Fitness costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**: 61–67.
- Heller J, Tudzynski P. 2011.** Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: Signaling, development, and disease. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 369–390.
- Hetherington SE, Smillie RM, Davies WJ. 1998.** Photosynthetic activities of vegetative and fruiting tissues of tomato. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1173–1181.
- Huang X, Kiefer E, Von Rad U, Ernst D, Foissner I, Durner J. 2002.** Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 625–631.
- Iriti M, Faoro F. 2009.** Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 3371–3399.
- Jayamohan N, Kumudini B. 2011.** Host Pathogen Interaction at the Plant Cell Wall. *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1**: 242–249.
- Jiao W, Liu X, Li Y, et al. 2022.** Organic acid, a virulence factor for pathogenic fungi, causing postharvest decay in fruits. *Molecular Plant Pathology* **23**: 304–312.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.

- Jones DA, Takemoto D. 2004.** Plant innate immunity - Direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16**: 48–62.
- Kadota Y, Liebrand TWH, Goto Y, et al. 2019.** Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector- and PAMP-triggered immunity in plants. *New Phytologist* **221**: 2160–2175.
- van Kan JAL. 2006.** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**: 247–253.
- van Kan JAL, Shaw MW, Grant-Downton RT. 2014.** Botrytis species: Relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Molecular Plant Pathology* **15**: 957–961.
- Kanwar P, Jha G. 2019.** Alterations in plant sugar metabolism: signatory of pathogen attack. *Planta* **249**: 305–318.
- Kauffman KJ, Prakash P, Edwards JS. 2003.** Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 491–496.
- Kazan K, Manners JM. 2009.** Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **14**: 373–382.
- Keukens EAJ, de Vrije T, van den Boom C, et al. 1995.** Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *BBA - Biomembranes* **1240**: 216–228.
- Kim DS, Na H, Kwack Y, Chun C. 2014.** Secondary metabolite profiling in various parts of tomato plants. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* **32**: 252–260.
- Kruger NJ, Ratcliffe GR. 2008.** Metabolic Organization in Plants: A Challenge for the Metabolic Engineer. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology* **1**: 1–27.
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL. 2008.** *Plant physiological ecology: Second edition.*
- Lecompte F, Abro MA, Nicot PC. 2010.** Contrasted responses of Botrytis cinerea isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology* **59**: 891–899.
- Lecompte F, Abro MA, Nicot PC. 2013.** Can plant sugars mediate the effect of nitrogen fertilization on lettuce susceptibility to two necrotrophic pathogens: Botrytis cinerea and Sclerotinia sclerotiorum? *Plant and Soil* **369**: 387–401.
- Lecompte F, Nicot PC, Ripoll J, et al. 2017.** Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus Botrytis cinerea is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Annals of Botany* **119**: 931–943.
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, et al. 2013.** Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–21.
- Li P, Lu YJ, Chen H, Day B. 2020.** The Lifecycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences* **39**: 72–100.
- Liu X, Xie J, Fu Y, Jiang D, Chen T, Cheng J. 2020.** The subtilisin-like protease Bcser2 affects the sclerotial formation, conidiation and virulence of Botrytis cinerea. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Luna E, Ton J. 2012.** The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant Signaling and Behavior* **7**: 615–618.
- MacKintosh C, Meek SEM. 2001.** Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 205–214.
- Manteau S, Abouna S, Lambert B, Legendre L. 2003.** Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. *FEMS Microbiology Ecology* **43**: 359–366.
- Marcec MJ, Gilroy S, Poovaiah BW, Tanaka K. 2019.** Mutual interplay of Ca²⁺ and ROS signaling in plant immune response. *Plant Science* **283**: 343–354.
- Miller RNG, Alves GSC, Van Sluys MA. 2017.** Plant immunity: Unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany* **119**: 681–687.
- Mnich E, Bjarnholt N, Eudes A, et al. 2020.** Phenolic cross-links: Building and de-constructing the plant cell wall. *Natural Product Reports* **37**: 919–961.
- Moeder W, Phan V, Yoshioka K. 2019.** Ca²⁺ to the rescue – Ca²⁺ channels and signaling in plant immunity. *Plant Science* **279**: 19–26.
- Molly FMD, Grant-Downton R. 2015.** Botrytis-biology, detection and quantification. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*: 17–34.
- Monaghan J, Zipfel C. 2012.** Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 349–357.
- Muhammad T, Zhang F, Zhang Y, Liang Y. 2019.** RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors. *Cells* **8**: 38.
- Mulema JMK, Denby KJ. 2012.** Spatial and temporal transcriptomic analysis of the Arabidopsis thaliana-Botrytis cinerea interaction. *Molecular Biology Reports* **39**: 4039–4049.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats**

- E. 2008.** The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**: 501–520.
- Navarro L, Bari R, Achard P, et al. 2008.** DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology* **18**: 650–655.
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L. 2013.** Apoplastic Diffusion Barriers in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* **11**: e0167.
- Nicot PC, Stewart A, Bardin M, Elad Y. 2015.** Biological control and biopesticide suppression of Botrytis-incited diseases. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*: 165–187.
- Nunes-Nesi A, Fernie AR, Stitt M. 2010.** Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant* **3**: 973–996.
- Ohyama T, Ohtake N, Sueyoshi K, et al. 2017.** Amino Acid Metabolism and Transport in Soybean Plants. *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal*.
- Oide S, Bejai S, Staal J, Guan N, Kaliff M, Dixelius C. 2013.** A novel role of PR2 in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **200**: 1187–1199.
- El Oirdi M, El Rahman TA, Rigano L, et al. 2011.** Botrytis cinerea Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato. *The Plant Cell* **23**: 2405–2421.
- Orsel M, Miller AJ. 2010.** Transport Systems for NO₃- and NH₄+. *Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-genomic Era* **42**: 83–102.
- Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. 2010.** What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology* **28**: 245–248.
- 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**: 1–11.
- Osborn AE. 1996.** Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821–1831.
- Park CJ, Caddell DF, Ronald PC. 2012.** Protein phosphorylation in plant immunity: Insights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–9.
- Pedras MSC, Hossain S, Snitynsky RB. 2011.** Detoxification of cruciferous phytoalexins in Botrytis cinerea: Spontaneous dimerization of a camalexin metabolite. *Phytochemistry* **72**: 199–206.
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012.** Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521.
- de Pinto MC, Locato V, de Gara L. 2012.** Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell and Environment* **35**: 234–244.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. 2009.** Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**: 21–29.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, et al. 2015.** Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 513–545.
- Qi J, Wang J, Gong Z, Zhou JM. 2017.** Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 92–100.
- Quidde T, Osbourn AE, Tudzynski P. 1998.** Detoxification of α -tomatine by Botrytis cinerea. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 151–165.
- Rasclé C, Dieryckx C, Dupuy JW, et al. 2018.** The pH regulator PacC: a host-dependent virulence factor in Botrytis cinerea. *Environmental Microbiology Reports* **10**: 555–568.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. 2011.** Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 317–343.
- Rodenburg SYA, Seidl MF, Judelson HS, Vu AL, Govers F, de Ridder D. 2019.** Metabolic Model of the Phytophthora infestans -Tomato Interaction Reveals Metabolic Switches during Host Colonization (J McDowell and B Gillian Turgeon, Eds.). *mBio* **10**: 1–15.
- Rohwer JM. 2012.** Kinetic modelling of plant metabolic pathways. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2275–2292.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore KS. 2014.** Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–12.
- Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc EJ, Raymond P, Rolin D. 2002.** The metabolic architecture of plant cells: Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 43948–43960.
- Roscher A, Kruger NJ, Ratcliffe RG. 2000.** Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labelling. *Journal of Biotechnology* **77**: 81–102.
- Rossi FR, Gárriz A, Marina M, et al. 2011.** The sesquiterpene botrydial produced by Botrytis cinerea induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and

jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 888–896.

Roux F, Voisin D, Badet T, et al. 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: Placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* **15**: 427–432.

Sahu A, Blätke MA, Szymański JJ, Töpfer N. 2021. Advances in flux balance analysis by integrating machine learning and mechanism-based models. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **19**: 4626–4640.

Sakakibara H. 2005. Cytokinin Biosynthesis and Regulation. *Vitamins and Hormones* **72**: 271–287.

Sang Y, Macho AP. 2017. Analysis of PAMP-triggered ROS burst in plant immunity. *Methods in Molecular Biology* **1578**: 143–153.

Santos RB, Figueiredo A. 2021. Two sides of the same story in grapevine–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **72**: 3367–3380.

Schouten A, Maksimova O, Cuesta-Arenas Y, Van Den Berg G, Raaijmakers JM. 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* **10**: 1145–1157.

Seifi HS, Van Bockhaven J, Angenon G, Höfte M. 2013. Glutamate Metabolism in Plant Disease and Defense: Friend or Foe? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 475–485.

Siewers V, Kokkelink L, Smedsgaard J, Tudzynski P. 2006. Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4619–4626.

Soulie MC, Koka SM, Floch K, et al. 2020. Plant nitrogen supply affects the *Botrytis cinerea* infection process and modulates known and novel virulence factors. *Molecular Plant Pathology* **21**: 1436–1450.

Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shetty HS. 2012. Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response In: *Plant Defence: Biological Control*. Dordrecht: Springer Netherlands, 379–403.

Sun Y, Wang M, Mur LAJ, Shen Q, Guo S. 2020. Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1–20.

Tan KK, Epton HAS. 1973. Effect of light on the growth and sporulation of *Botrytis cinerea*. *Transactions of the British Mycological Society* **61**: 145–157.

Tena G, Boudsocq M, Sheen J. 2011. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 519–529.

The SV, Snyder R, Tegeder M. 2021. Targeting Nitrogen Metabolism and Transport Processes to Improve Plant Nitrogen Use Efficiency. *Frontiers in Plant Science* **11**.

Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, et al. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 15107–15111.

Thor K. 2019. Calcium—nutrient and messenger. *Frontiers in Plant Science* **10**.

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.

Toruño TY, Stergiopoulos I, Coaker G. 2016. Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 419–441.

VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE. 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *The Plant Cell* **6**: 1191.

Vega A, Canessa P, Hoppe G, et al. 2015. Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–17.

Verma V, Ravindran P, Kumar PP. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology* **16**: 1–10.

Vlot CA, Dempsey DA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177–206.

Wager A, Browse J. 2012. Social network: JAZ protein interactions expand our knowledge of jasmonate signaling. *Frontiers in Plant Science* **3**: 1–11.

Wang R, He F, Ning Y, Wang GL. 2020. Fine-Tuning of RBOH-Mediated ROS Signaling in Plant Immunity. *Trends in Plant Science* **25**: 1060–1062.

Wang Y, Li X, Fan B, Zhu C, Chen Z. 2021. Regulation and function of defense-related callose deposition in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1–15.

Wang M, Shen Q, Xu G, Guo S. 2014. *New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells*. Elsevier Inc.

Wang M, Weiberg A, Dellota E, Yamane D, Jin H. 2017. *Botrytis* small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology* **14**: 421–428.

- Weiberg A, Wang M, Lin FM, et al. 2013a.** Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**: 118–123.
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, et al. 2013b.** Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**: 118–123.
- Wen B, Xiao W, Mu Q, et al. 2020.** How does nitrate regulate plant senescence? *Plant Physiology and Biochemistry* **157**: 60–69.
- Westrick NM, Smith DL, Kabbage M. 2021.** Disarming the Host: Detoxification of Plant Defense Compounds During Fungal Necrotrophy. *Frontiers in Plant Science* **12**: 1–18.
- Williams ME. 2012.** Introduction to Phytohormones. *The Plant Cell* **22**.
- Williams B, Kabbage M, Kim HJ, Britt R, Dickman MB. 2011.** Tipping the balance: Sclerotinia sclerotiorum secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens* **7**.
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GFE. 2011.** Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* **181**: 593–603.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG. 1998.** COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091–1094.
- Yan Q, Si J, Cui X, et al. 2019.** The soybean cinnamate 4-hydroxylase gene GmC4H1 contributes positively to plant defense via increasing lignin content. *Plant Growth Regulation* **88**: 139–149.
- Yang C, Liang Y, Qiu D, Zeng H, Yuan J, Yang X. 2018.** Lignin metabolism involves Botrytis cinerea BcGs1- induced defense response in tomato. *BMC Plant Biology* **18**: 1–15.
- Yeats TH, Rose JKC. 2013.** The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* **163**: 5–20.
- Yoshioka H, Adachi H, Nakano T, et al. 2015.** Hierarchical regulation of NADPH oxidase by protein kinases in plant immunity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **95**: 20–26.
- 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 - Biology and Chemistry* **25**: 216–221.
- Yuan H, Cheung CYM, Poolman MG, Hilbers PAJ, Van Riel NAW. 2016.** A genome-scale metabolic network reconstruction of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its application to photorespiratory metabolism. *Plant Journal* **85**: 289–304.
- Yurkov AP, Kryukov AA, Gorbunova AO, et al. 2019.** Molecular genetic mechanisms of sugar transport in plants in the absence and during arbuscular mycorrhiza development. *Ecological Genetics* **17**: 81–99.
- Zagrobelny M, Bak S, Rasmussen AV, Jørgensen B, Naumann CM, Møller BL. 2004.** Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry* **65**: 293–306.
- Zarattini M, Farjad M, Launay A, et al. 2021.** Every cloud has a silver lining: How abiotic stresses affect gene expression in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **72**: 1020–1033.
- Zeier J. 2021.** Metabolic regulation of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102050.
- Zhang Z, Chen Y, Li B, Chen T, Tian S. 2020.** Reactive oxygen species: A generalist in regulating development and pathogenicity of phytopathogenic fungi. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **18**: 3344–3349.
- Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M. 2013.** The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* **40**: 23–35.
- Zhang M, Su J, Zhang Y, Xu J, Zhang S. 2018.** Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **45**: 1–10.
- Zhao C, Tang Y, Wang J, et al. 2021.** A mis-regulated cyclic nucleotide-gated channel mediates cytosolic calcium elevation and activates immunity in Arabidopsis. *New Phytologist* **230**: 1078–1094.
- Zipfel C. 2009.** Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 414–420.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Nathalie Lacrampe

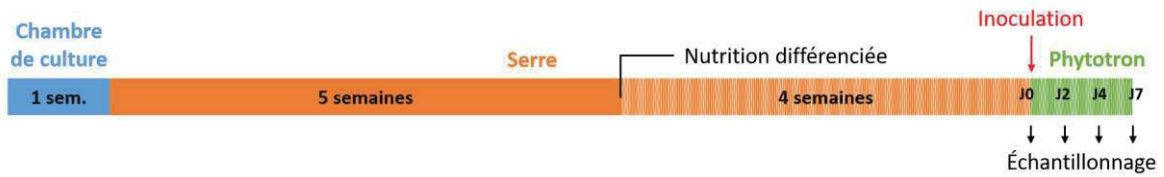


Figure II.1 : Schéma du planning de culture

Récapitulatif des étapes et du temps nécessaires à l'obtention des échantillons biologiques, depuis les semis jusqu'à la récolte, en passant par la mise en place de la nutrition différenciée et l'inoculation. J0, jour de l'inoculation ; J2, 2 jours après inoculation (dpi, *days post-inoculation*) ; J4, 4 dpi ; J7, 7 dpi.

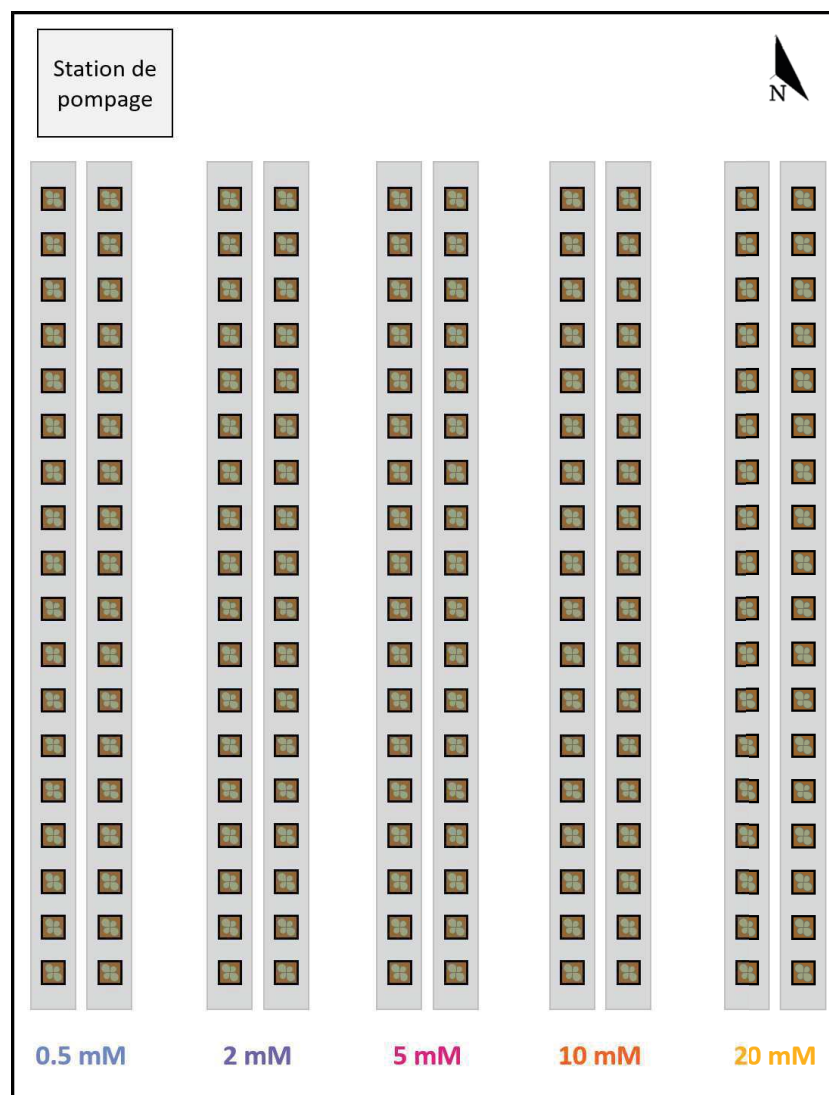


Figure II.2 : Schéma de la disposition des plantes dans la serre

Les 175 plantes ont été réparties en cinq groupes de deux rangées, correspondant à une condition de nutrition azotée (0.5, 2, 5, 10 et 20 mM). Une station de pompage a permis l'arrosage automatique des plantes.

Ce chapitre vise essentiellement à fournir les protocoles et méthodes mis en œuvre afin de générer les échantillons biologiques et réaliser le dosage des métabolites. Les deux autres parties de la thèse, portant sur l'analyse de l'expression de gènes et la modélisation des flux métaboliques, sont détaillées dans les chapitres dédiés.

1. Production du matériel biologique

L'étude se base sur la comparaison de plantes inoculées par des conidies de *Botrytis cinerea* avec des plantes témoins (*mocks*), inoculées avec de l'eau. L'intensité de la maladie a été modulée par des différences en nutrition azotée qui ont un effet répétable et robuste sur la sensibilité des tiges à *B. cinerea* sur plusieurs génotypes de tomates (Lecompte *et al.* 2010). Cinq solutions nutritives ont été utilisées contenant des concentrations en nitrate de 0.5, 2, 5, 10 et 20 mM. Les solutions à 0.5 et 2 mM de NO_3^- correspondent respectivement à un stress azoté sévère et modéré. La solution à 5 mM de NO_3^- correspond à une quantité suffisante d'azote pour la croissance alors que les solutions à 10 et 20 mM de NO_3^- correspondent respectivement à un excès d'azote modéré et sévère. D'autre part, un suivi cinétique a été réalisé pendant une semaine après l'inoculation. Pour cela, des prélèvements ont été réalisés au moment de l'inoculation et 2, 4 et 7 jours après l'inoculation (*dpi*, *days post-inoculation*). Enfin, pour chaque condition, cinq répétitions biologiques ont été réalisées.

Le système étudié correspond à une portion de tige asymptotique située à proximité du site d'inoculation. La récolte d'un échantillon implique le sacrifice d'une plante. Il a donc fallu produire autant de plantes que d'échantillons à analyser. Ainsi, 175 plantes de tomate ont été cultivées pour générer tous les échantillons, soit 5 répétitions biologiques x 5 niveaux de nutrition azotée x 4 jours de récolte x 2 niveaux d'inoculation (excepté avant inoculation).

1.1. Croissance des plantes en serre

Les échantillons ont été produits en 11 semaines entre janvier et mars 2018 (Figure II.1). Des graines de tomate (variété Clodano, Syngenta) ont été semées mi-janvier sur des bouchons de laines de roches. Les semis ont été placés en armoire de culture pendant une semaine avec une température de 23°C et une hygrométrie de 80 % afin de permettre la germination. Les plantules ont ensuite été placées en serre pour une acclimatation pendant trois jours avant d'être repiquées sur des cubes de laines de roche. La température de



Figure II.3 : Photographies des plantes dans la serre

(A) Disposition des plantes dans la serre. Photographie prise face au sud avec les plantes de la condition 20 mM de NO_3^- à gauche et les plantes de la condition 0.5 mM de NO_3^- à droite. Une ligne de goutte à goutte est placée au milieu des 2 rangées de la même condition. (B) Disposition des plantes en pot. Les plantes sont enracinées dans un cube de laine de roche et déposées sur un mélange de pouzzolane et vermiculite (50/50 v/v). Le goutteur est planté dans le cube de laine de roche au plus loin de la plante.

consigne de la serre a été fixée à 18°C la nuit et 20°C le jour, avec une aération programmée au-delà de 25°C et l'enclenchement d'un système de refroidissement au-delà de 27°C. L'arrosage des plantules a été effectué régulièrement selon les conditions climatiques avec une solution nutritive commerciale (Liquoplant Rose, Plantin) à 0.2 % dans de l'eau de forage. Cette solution contient tous les éléments et oligo-éléments nécessaires à la croissance des plantes : N 3.5 %, P₂O₅ 1.8 %, K₂O 5.7 %, MgO 1 %, B 0.0043 %, Cu 0.0011 %, Fe 0.022 %, Mn 0.023 %, Mo 0.0004 % et Zn 0.006 %. Après 3 semaines les plantules enracinées dans les cubes de laines de roches ont été posées sur des pots de 2 L contenant un substrat neutre, un mélange de pouzzolane et vermiculite en quantité égale. Les pots ont ensuite été répartis dans la serre en cinq groupes, un groupe par condition de nutrition azotée, avec deux rangées de 18 pots espacés d'environ 20 cm (Figure II.2 et II.3A). La disposition des plantes dans la serre n'a pas été randomisée à cause des contraintes d'irrigation liées aux différences de nutrition azotée. Une légère différence de croissance a été observée sur les plantes situées contre les parois de la serre. Cette disparité entre les plantes du même groupe a été gommée après quelques semaines de culture. L'arrosage a été effectué deux fois par jour (en milieu de matinée et en milieu d'après-midi) avec la solution nutritive commerciale à 0.2 % grâce à un système de goutte à goutte (Figure II.3). La teneur en eau optimale de $68.5 \pm 3\%$ a été mesurée au niveau du cube de laine de roche, sur cinq plantes prises au hasard de chaque condition, après arrosage jusqu'au drainage. La teneur en eau a ensuite été mesurée régulièrement avant arrosage afin de suivre le statut hydrique des plantes. La durée de l'arrosage a été adaptée au fur et à mesure afin de maintenir la teneur en eau proche de l'optimum, autour de 60 %.

Après cinq semaines de croissance en serre, la nutrition différenciée en azote a été mise en place à partir de cinq solutions mères (Table II.1). Dans les solutions à faible concentration en nitrate, l'équilibre des charges électriques a été maintenu en remplaçant les nitrates par des sulfates. Cette substitution n'a probablement eu aucun impact car des apports très élevés en sulfates n'affectent pas la croissance des plantes de tomate (Lopez *et al.* 1996). La concentration des autres nutriments et micronutriments a été maintenue constante. La concentration en nitrates dans les solutions nutritives a été vérifiée par un dosage spectrophotométrique (Figure II.4). La concentration réelle s'écarte légèrement de la concentration théorique d'un excès de 7.6 à 14.4 % suivant les conditions. Après un premier

A	0.5 mM	2 mM	5 mM	10 mM	20 mM
NO_3^-	0,5	2,0	5,0	10,0	20,0
SO_4^{2-}	7,8	7,1	5,6	3,1	3,1
K^+	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0
Mg^{2+}	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6
Cl^-	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
H_2PO_4^-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ca^{2+}	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

B	0.5 mM	2 mM	5 mM	10 mM	20 mM
B	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cu^{2+}	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Fe^{2+}	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2
Mn^{2+}	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MoO_4^{2-}	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Zn^{2+}	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Table II.1 : Concentration en ions présents dans les différentes solutions nutritives

(A) Concentration en nutriments exprimée en mM apportée à la plante. (B) Concentration en micronutriments en μM apportée à la plante.

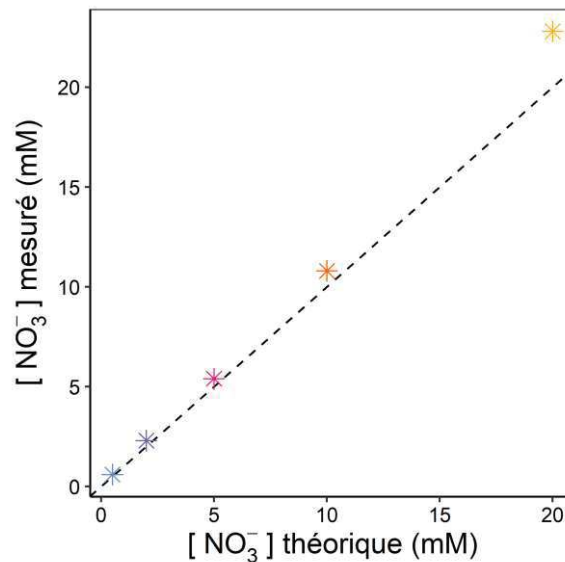


Figure II.4 : Concentration en nitrates dans les solutions nutritives

L'axe des abscisses représente la concentration en nitrate théoriquement apportée et l'axe des ordonnées représente la concentration mesurée par spectrophotométrie. La ligne en pointillé désigne la bissectrice.

arrosage de 15 min afin d'éliminer la solution nutritive commerciale présente dans les pots, des arrosages de 2 minutes ont été programmés dans la journée à intervalle régulier avec une fréquence variable selon les conditions climatiques. Le teneur en eau a été monitorée, comme précédemment, en début de journée, avant arrosage. La nutrition différenciée ainsi mise en place a été maintenue jusqu'à la fin de l'expérimentation.

1.2. Transfert des plantes en chambre de culture et inoculation

Quatre semaines après le début de la nutrition différenciée, les plantes ont été transférées en chambre de culture et inoculées. Afin d'assurer le bon développement du pathogène, l'incubation a été réalisée avec un rayonnement relativement bas (30 % de la capacité lumineuse des chambres de cultures soit $200 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et une humidité relative de 95 %. Un lot de 25 plantes, cinq plantes par condition de nutrition azotée, correspondant à la modalité 0 dpi (avant inoculation) a été échantillonné immédiatement et les 150 plantes restantes ont été réparties entre deux chambres de culture (Figure II.5 et II.6). Chacune des deux chambres de culture a été organisée en cinq rangées de 15 plantes avec une rangée par condition de nutrition azotée. Les conditions avec les plantes les plus grandes (10 et 20 mM de NO_3^-) ont été placées sur les bords des chambres de culture alors que les plantes les plus petites (0.5 et 2 mM de NO_3^-) ont été placées côte à côte. Sur une même rangée, les plantes ont été disposées selon le jour de récolte ; les plantes destinées à être récoltées en premier ont été placées à l'entrée des chambres de culture alors que celles destinées à être récoltées en dernier ont été placées au fond.

Les plantes ont été irriguées manuellement deux fois par jour avec les différentes solutions de nutriments azotés. Le teneur en eau a été mesurée quotidiennement avant arrosage. Pendant la semaine en chambre de culture, la teneur en eau était globalement plus stable et plus élevée qu'en serre à cause de la plus faible demande climatique liée à une faible luminosité (5 fois moins importante qu'en serre) et une forte humidité. Les paramètres de température, hygrométrie, éclairage et le taux de CO_2 ont été monitorés dans chacune des chambres de culture (Figure II.7). Le logiciel de contrôle des chambres de culture a permis d'ajuster correctement les paramètres selon les valeurs de consigne désirées et de façon homogène entre les deux chambres de culture. Les variations de température et d'hygrométrie observées pendant la journée sont très certainement liées à l'ouverture des

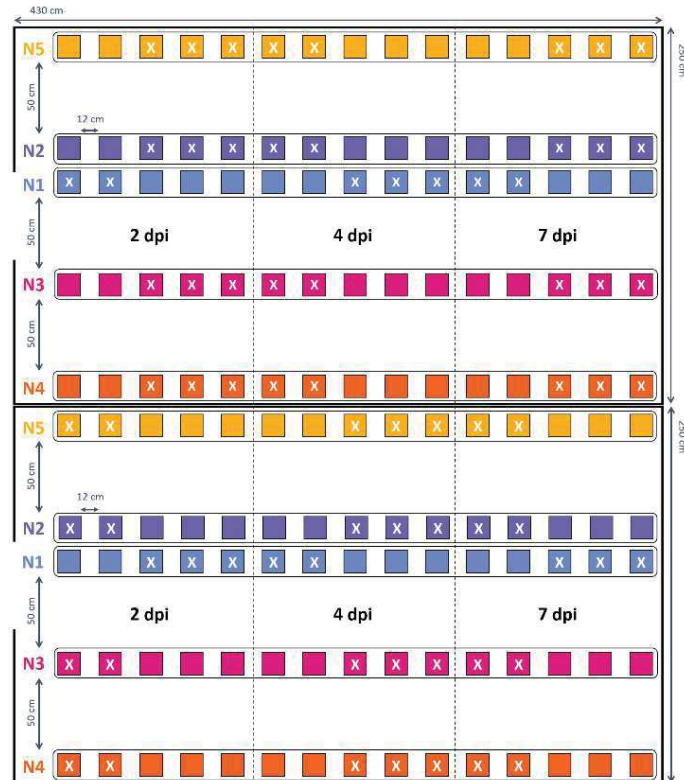


Figure II.5 : Disposition des plantes dans les chambres de cultures

Les deux chambres de culture ont été organisées en 2 x 5 rangées de 15 plantes, une rangée par condition de nutrition azotée par chambre de culture (notée N1, N2, N3, N4 et N5 correspondant aux conditions 0.5, 2, 5, 10 et 20 mM de NO_3^- , respectivement). Sur une même rangée, les plantes ont été disposées selon le jour de récolte ; les plantes destinées à être récoltées en premier ont été placées à l'entrée des chambres de culture alors que celles destinées à être récoltées en dernier ont été placées au fond. Le « X » indique les plantes inoculées avec *B. cinerea*, les autres correspondent aux plantes *mocks*.



Figure II.6 : Photographie des plantes dans une chambre de culture

Photographie prise depuis l'entrée de la chambre de culture.

chambres de culture pour l'arrosage des plantes. Bien que la valeur de consigne d'éclairage soit respectée dans les chambres de culture, celle-ci était difficile à mesurer en pratique à cause de la position du capteur gênant lors de l'arrosage et souvent caché par des feuilles. Le renouvellement d'air n'étant pas géré de façon automatique en fonction de la consigne sur le taux de CO₂, la mise en fonction des ventilateurs a donc été programmée de façon cyclique avec un renouvellement d'air pendant 15 minutes toutes les 20 minutes en journée et pendant 10 minutes toutes les heures la nuit.

1.3. Inoculation des plantes

1.3.1. Préparation de l'inoculum de *Botrytis cinerea*

La préparation de l'inoculum a été réalisée par Magali Duffaud à l'unité de Pathologie Végétale de l'INRAE Avignon domaine Saint Maurice.

L'inoculation a été réalisée avec des conidies de *Botrytis cinerea* de la souche Bc1 connue pour sa forte agressivité sur tomate (Ajouz *et al.* 2010). L'isolat provient d'une collection maintenue au laboratoire et conservée à -20°C dans du glycérol 20 %. Le champignon a été repiqué sur boîtes de Pétri contenant du milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) et placé 15 jours en chambre climatique à 22°C avec une photopériode de 14 h par jour afin de permettre la sporulation. La solution d'inoculum a été préparée le jour de l'inoculation des plantes. Pour cela, 4 mL d'eau ultra-pure stérile ont été déposés sur les filaments fongiques. La solution a ensuite été récupérée et vortexée avec des billes de verre afin de casser les conidiophores et libérer les conidies, puis filtrée (30 µM) afin d'éliminer les débris de mycélium et de récupérer une solution de conidies en suspension. Les conidies ont ensuite été comptées au microscope optique sur une cellule de Malassez et la concentration a été diluée à 10⁷ conidies.mL⁻¹. Afin de vérifier la viabilité des conidies, une dilution au 100^e est a été réalisée et 10 µL ont été déposés sur une boîte de Pétri contenant du milieu PDA. Après 24h d'incubation en chambre climatique, le nombre de conidies qui ont germées a été compté au microscope. Un taux de germination de 98% a été obtenu.

1.3.2. Inoculation des plantes

Une fois toutes les plantes disposées dans les chambres de culture, le pétiole en feuille 6 de chaque plante a été découpé à environ 0.5 cm de la tige. Par la suite, l'inoculation a été

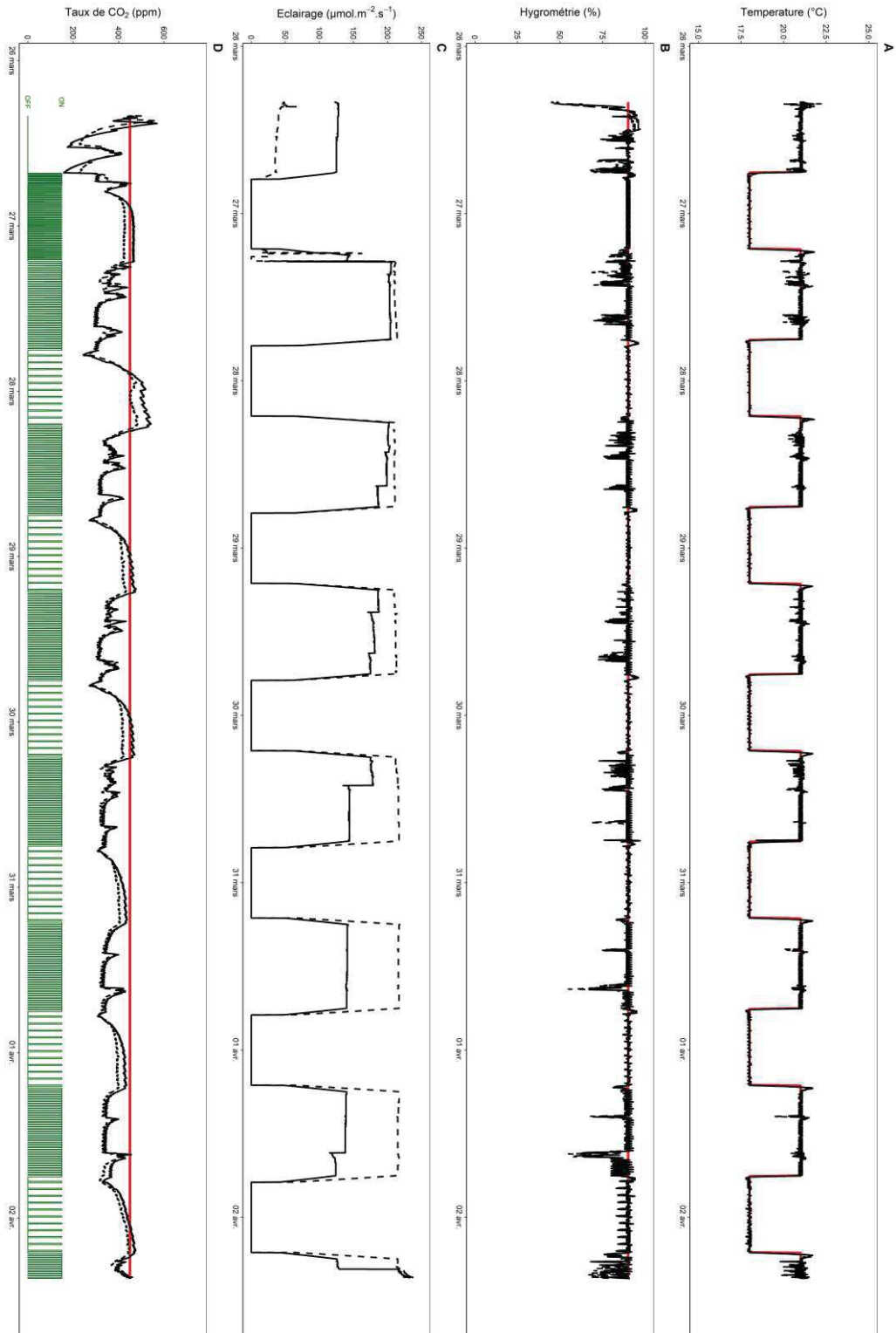


Figure II.7 : Suivi des paramètres de cultures

La température (A), l'hygrométrie (B), l'éclairage (C) et le taux de CO_2 (D) ont été monitorés dans les chambres de culture. Les lignes rouges correspondent aux valeurs de consigne, les lignes noires pleines et en pointillées correspondent aux valeurs mesurés dans les chambres de culture 1 et 2 respectivement. La ligne verte correspond au cycle de fonctionnement des ventilateurs de renouvellement air.

effectuée sur le chicot de tige soit avec 10 μL de la solution de conidies de *B. cinerea* pour les plantes inoculées, soit avec 10 μL d'eau ultra-pure stérile pour les plantes *mocks* (témoin). La taille des chancre a été mesurée tous les jours dès l'apparition des premiers symptômes sur la tige (4 dpi). La sévérité de l'infection sur l'ensemble de l'expérimentation a été mesurée par l'AUDPC (aire sous la courbe de la progression de la maladie) tel que :

$$AUDPC = \left[\frac{Y_1}{2} + \sum_2^{n-1} Y_j + \frac{Y_n}{2} \right] [I]$$

avec Y_j la taille de la lésion (mm) au $j^{\text{ième}}$ temps d'observation, n le nombre total d'observation et I l'intervalle entre chaque observation (jour).

1.4. Échantillonnage

Les échantillons de tige ont été récoltés en quatre fois : 25 plantes ont été récoltées avant inoculation (5 niveaux de nutrition azotée x 5 répétitions biologiques), et 50 plantes ont été récoltées à 2, 4 et 7 dpi (2 niveaux d'inoculation x 5 niveaux de nutrition azotée x 5 répétitions biologiques). Deux sections de tige asymptomatique situées dans la région proximale des lésions causées par *B. cinerea* ont été récoltées au niveau de l'entre-nœud inférieur et supérieur à la lésion (Figure II.8) et immédiatement congelées ensemble dans l'azote liquide. Une fois tous les échantillons récoltés, ils ont été broyés en fine poudre dans l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à billes vibro-oscillant. Un morceau de tige d'environ 1 cm situé en distal par rapport à la lésion a été immédiatement congelé dans l'azote liquide et conservé à part en sauvegarde. Les deux lots d'échantillons ont été conservés séparément à -80°C durant toute la durée de la thèse.

Afin de calculer la teneur en eau dans la tige au moment la récolte, un morceau de tige situé dans l'entre-nœud supérieur à la partie récoltée a été prélevé. Ces échantillons ont été immédiatement pesés en frais puis pesés de nouveau, une fois sec, après 5-6 jours à l'étuve à 70°C .

2. Prérequis au dosage des métabolites

L'objectif premier de l'analyse métabolomique consiste à quantifier les principaux puits de carbones afin de paramétrer le modèle de flux métaboliques. Pour cela une analyse

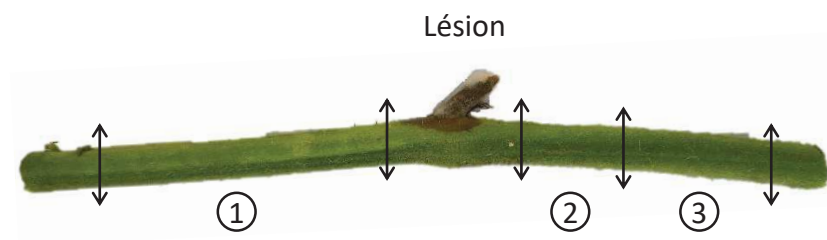


Figure II.8 : Échantillonnage des tiges de tomate

Les doubles flèches représentent les endroits coupés. Les morceaux 1 et 2 ont été mélangés et broyés afin de réaliser les analyses, le morceau 3 a été conservé entier en sauvegarde.

quantitative multi-ciblée a été réalisée. Le second objectif consiste à identifier les pools de métabolites qui varient suite à l'inoculation par *B. cinerea*. Pour cela une analyse non ciblée semi-quantitative a été réalisée.

Afin de répondre au mieux à ces deux objectifs, plusieurs développements méthodologiques ont été nécessaires. Ceux-ci ont été effectués à partir d'un pool de poudre de tous les échantillons.

2.1. Appareils utilisés

Les analyses ont été réalisées à la plateforme « Metaboscope » de l'Université d'Avignon (Figure II.9), avec deux appareils :

- UPLC-DAD-ESI-TQ (Waters) : Chromatographie en phase liquide ultra haute-performance couplée à un détecteur UV à barrette de diodes et un spectromètre de masse triple-quadrupole en tandem. Cette appareil basse résolution permet le profilage ciblé ou multi-ciblé haute sensibilité en mode MRM (*multiple reactions monitoring*) avec des modes d'ionisations positif et négatif alternés. Cet appareil permet également l'analyse structurale à basse résolution avec les modes MS et MS/MS (*daughter scan, parent scan* et *neutral loss*).
- Prep-GC-EI-TOF (LECO) : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à temps-de-vol. Cet appareil à basse résolution et haute vitesse d'acquisition permet un profilage non-ciblé des métabolites. Il est équipé d'un robot de préparation d'échantillons permettant la dérivation chimique en ligne des métabolites.

2.2. Portée de l'analyse

Au total 129 molécules ont été analysées dont 57 molécules de façon quantitative et 72 molécules de façon semi-quantitative (Figure II.10). Les molécules analysées se regroupent en huit catégories : les métabolites polaires, les métabolites apolaires, les acides gras, les acides aminés, les composés phénoliques, les glycoalcaloïdes, les phytohormones et les autres molécules. La liste complète des molécules analysées est présentée en Annexe II.1.



Figure II.9 : Plateforme d'analyse métabolomique « Metaboscope »

(A) Photographie de la plateforme. Pendant la thèse, deux appareils ont été utilisés : une UPLC-DAD-ESI-TQ (B) et un Prep-GC-EI-TOF (C).

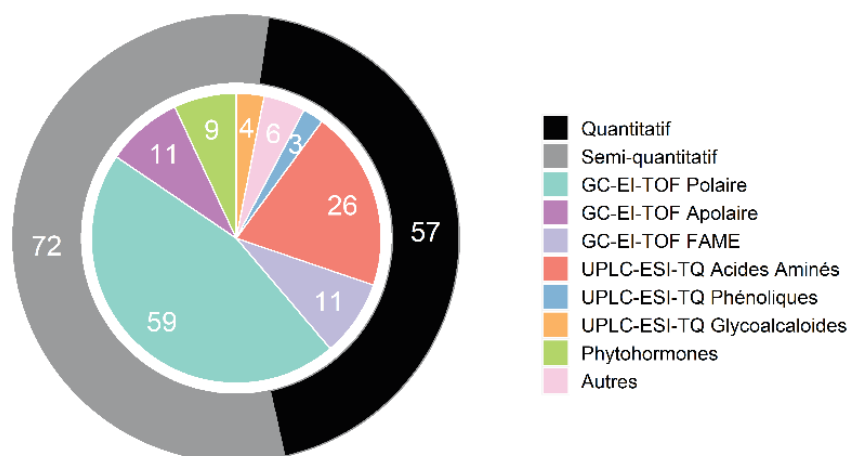


Figure II.10 : Bilan analytique

Le nombre de molécules analysées est inscrit pour chaque catégorie.

2.2.1. Métabolites polaires

Les métabolites polaires ont été analysés par Prep-GC-EI-TOF après dérivation chimique à la méthoxyamine (MeOX) suivi d'une triméthylsilylation (TMS). La première étape permet de protéger les groupements aldéhyde et cétone afin d'empêcher les sucres réducteurs de se cycliser, puis la dérivation TMS augmente la volatilité des molécules en échangeant leurs protons labiles par des groupements tri-méthyl-sylyl.

Les données d'acquisition ont subi une déconvolution automatique puis une exploration manuelle a été effectuée en comparant les spectres de masse obtenus après déconvolution avec ceux présents dans les bases de données. Ainsi plusieurs dizaines de molécules ont été identifiées ; 10 molécules ont été choisies *a priori* pour quantification absolue en fonction de leur intérêt pour le modèle, leur abondance et la non-redondance avec les autres méthodes utilisées, et 49 molécules ont été retenus pour quantification relative. Parmi les molécules identifiées non retenues il y a des contaminants et des molécules dont le signal est trop proche du bruit. Les molécules inconnues, c'est-à-dire sans aucune correspondance même partielle avec les bases de données, ont été systématiquement écartées car leur identification demande du temps et ce travail m'éloignerait des objectifs de la thèse.

2.2.2. Métabolites apolaires

Les métabolites apolaires ont été analysés par Prep-GC-EI-TOF après dérivation TMS. Comme pour les métabolites polaires, après déconvolution automatique et exploration manuelle des données d'acquisition, quelques dizaines de molécules ont été identifiées. Ainsi 11 molécules ont été retenus pour quantification relative.

2.2.3. Acides gras

Les acides gras ont été analysés par Prep-GC-EI-TOF. Ceux-ci ont fait l'objet d'une extraction et dérivation particulière détaillée plus loin dans ce chapitre (paragraphe 2.3.2). Après déconvolution automatique, les spectres de masse obtenus ont été comparés avec les spectres de 37 molécules standards disponibles, et 11 molécules ont été retenues pour quantification absolue.

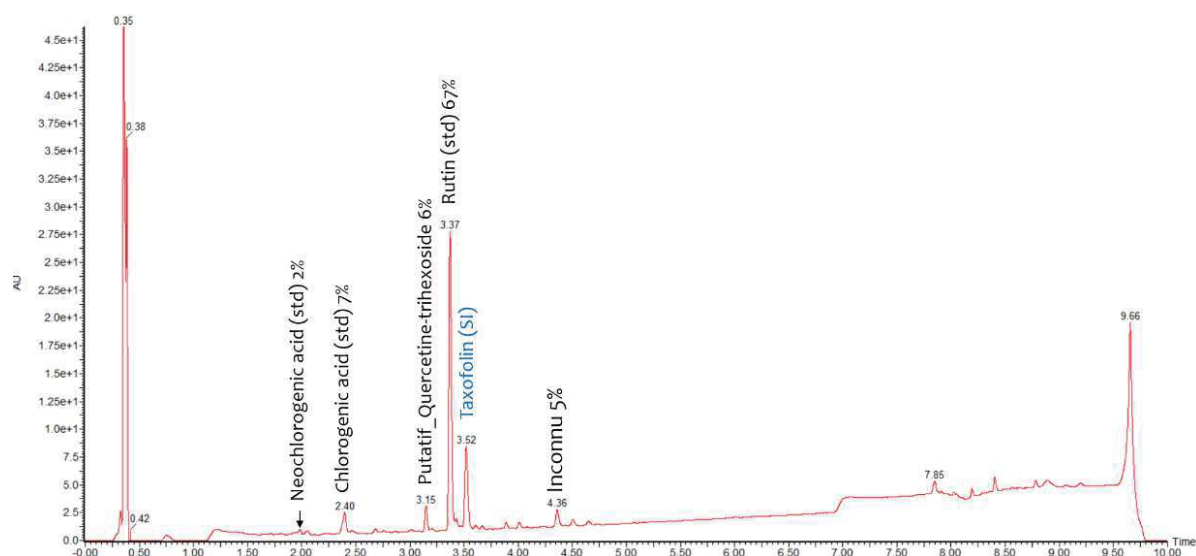


Figure II.11 : Chromatogramme des composés phénoliques

Le chromatogramme a été obtenu par détection UV ($\lambda = 200\text{-}600\text{ nm}$) après une séparation par UPLC. Les principaux composés phénoliques et leur proportion relative dans les extraits de tiges de tomate ont été indiqués.

2.2.4. Acides aminés

Les acides aminés ont été dérivés avec du 6-aminoquilyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) et analysés par UPLC-DAD-ESI-TQ en phase inverse. 38 molécules, parmi lesquelles 19 acides aminés protéinogéniques (la cystéine n'est pas assez stable pour être analysée dans ces conditions), 10 acides aminés non-protéinogéniques et 7 polyamines principales, ont été choisis *a priori* puis recherchés et quantifiés dans les échantillons.

2.2.5. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été analysés par UPLC-DAD-ESI-TQ en phase inverse. Les composés phénoliques potentiels ont été repérés dans le chromatogramme à une plage de longueur d'onde caractéristique comprise entre 200 et 600 nm. Une vingtaine de composés phénoliques potentiels ont été mis en évidence. Leurs temps de rétention et spectres de masse ont été comparés avec ceux de 42 molécules standards disponibles. Cela a permis l'identification de 3 composés phénoliques dont la somme des aires représente 76 % de la somme des aires de la totalité des pics mis en évidence (Figure II.11). En accord avec la littérature (Larbat *et al.* 2014), ces 3 molécules représentent la majeure partie du puits de carbone des composés phénoliques, l'identification des 18 autres molécules mises en évidence n'a donc pas été approfondie.

2.2.6. Glycoalcaloïdes

L' α -tomatine, principale glycoalcaloïdes de la tomate, et trois de ses dérivés ont été analysés par UPLC-DAD-ESI-TQ en phase inverse selon le protocole établi par Dzakovich *et al.* (2020). Seule l' α -tomatine a été dosée de façon quantitative. Ces molécules ont été analysés *a posteriori* sur des extraits décongelés. La qualité de l'extraction vis-à-vis de ces molécules n'a donc pas été vérifiée.

2.2.7. Phytohormones

Afin de compléter l'analyse du métabolisme, les phytohormones ont été analysés par Sylvie Citerne de l'Institut Jean-Pierre Bourgin à l'INRAE de Versailles-Grignon.

2.2.8. Autres composés

Dans le but d'alimenter le modèle métabolique avec les principaux puits de carbones, les macromolécules (protéines totales, ARN, amidon et paroi) et deux composés redox (glutathion et ascorbate) ont également été quantifiés. Chacune de ces méthodes a fait l'objet d'une extraction et d'un dosage spécifiques utilisés en routine au laboratoire.

2.3. Choix de la méthode d'extraction

Avant d'être analysées, les molécules doivent être extraites de la poudre végétale. Le choix de la méthode d'extraction résulte d'un compromis entre la facilité de mise en œuvre et la spécificité (c'est-à-dire le nombre et l'abondance des molécules extraites). Ici, cinq familles de molécules aux propriétés physico-chimiques variables doivent être analysées. Le nombre d'extraction par échantillon a été minimisé par souci de coût, de gain de temps et de faible quantité de matériel biologique disponible. Une extraction biphasique adaptée de la méthode de Bligh and Dyer (1959) a été utilisée. Cette extraction convient pour des molécules polaires et des molécules apolaires comme les stérols mais ne convient pas pour des molécules plus apolaires comme les acides gras qui ont fait l'objet d'une extraction particulière.

2.3.1. Extraction de Bligh and Dyer

La qualité de l'extraction peut être améliorée en jouant sur le type de solvant utilisé, le temps et la température d'extraction et le ratio solvant / échantillon. L'extraction a été réalisée grâce à un mélange de méthanol, chloroforme et d'eau comme décrit par Bligh and Dyer en 1959. Les volumes ont été réduits afin de contenir dans un micro-tube de 2 mL. Augmenter le temps ou la température d'extraction permet généralement d'améliorer le rendement d'extraction mais cela augmente aussi le risque d'artefact. Afin d'optimiser ces paramètres, deux extractions ont été réalisées, la première à chaud pendant une courte durée (70°C pendant 15 minutes) pour ne pas multiplier les risques d'artefact, et la seconde à froid sur une durée plus longue (4°C pendant 24h) afin d'en améliorer le rendement. La température joue également un rôle dans l'intégrité des pools métaboliques. En effet, afin d'éviter toute dégradation des métabolites, il est essentiel de stopper toute activité enzymatique. La congélation des échantillons dans l'azote liquide au moment de la récolte a

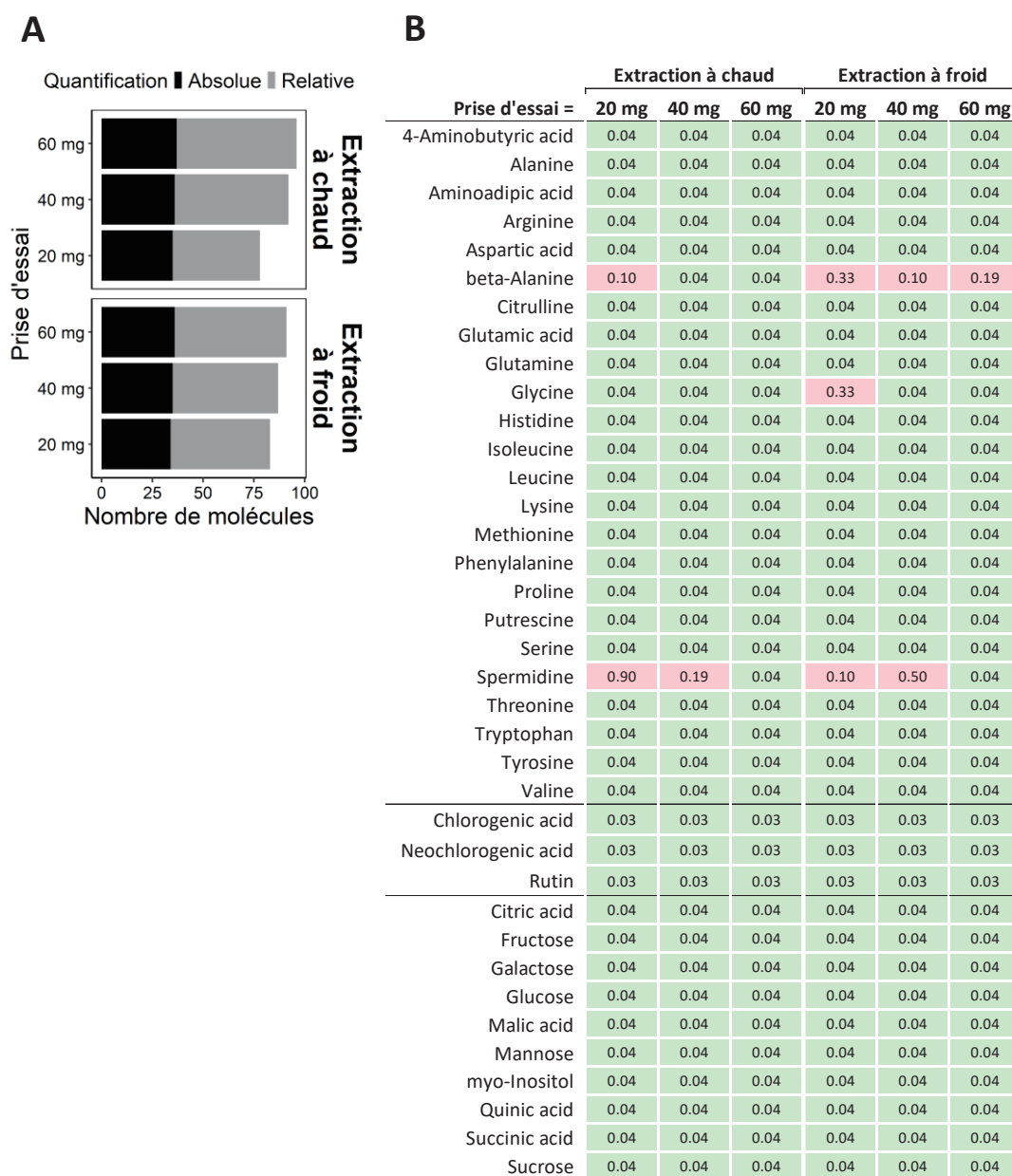


Figure II.12 : Molécules détectées par condition d'extraction

(A) Nombres de molécules supérieure à la limite de détection. (B) Molécules, parmi celles analysées en quantification absolue, dont l'aire de la première fraction de chaque condition est statistiquement supérieure au blanc selon un test de Mann-Whitney. Les cases vertes correspondent à une p-valeur < 0,05 et les cases rouges correspondent à une p-valeur > 0,05. La p-valeur est inscrite dans chaque case. Les valeurs des molécules analysées en quantification relative sont présentées en Annexe II.2.

permis *a priori* de figer les enzymes du métabolisme. Cet état doit être maintenu au moment de l'extraction, c'est pourquoi il est important de maintenir les échantillons congelés avant ajout du solvant d'extraction froid (-20°C). De plus, l'extraction est préférentiellement réalisée à une température haute ou basse, pour éviter toute activité enzymatique résiduelle. Une température élevée (70°C) dénature les enzymes, de même, une température négative permet de figer le métabolisme. Cependant, pour des raisons pratiques, l'extraction ne peut être réalisée qu'à une température faiblement positive (4°C) où certaines enzymes peuvent être active. Le ratio solvant / échantillon est le troisième paramètre clé de la qualité de l'extraction. Ce ratio a été modifié en faisant varier la masse de la prise d'essai ; 20, 40 ou 60 mg de poudre fraîche ont été utilisés. De plus, pour s'assurer de l'épuisement de la matrice, trois extractions successives ont été réalisées à partir de la même prise d'essai et analysées séparément. Afin de s'assurer de la répétabilité technique, chaque extraction a été réalisée trois fois.

Les fractions méthanoliques ont été analysés avec trois méthodes, une par Prep-GC-EI-TOF pour les métabolites polaires, et deux par UPLC-DAD-ESI-TQ pour les acides aminés et les composés phénoliques. Les fractions chloroformiques ont été analysés par Prep-GC-EI-TOF pour identifier les métabolites apolaires. Après intégration, l'aire des pics a été normalisée par la prise d'essai afin de comparer les différentes méthodes.

2.3.1.1. Nombre de molécules détectées

Le nombre de molécules dont l'aire est statistiquement supérieure au blanc a été déterminé dans la première fraction de chaque condition (selon un test de Mann-Whitney avec une p-valeur < 0.05, Figure II.12 et Annexe II.2). Pour chaque condition, un blanc d'extraction a été réalisé en trois répétition. Pour les blancs d'extraction, un pic correspondant à du bruit, a été intégré au niveau du temps de rétention de chaque molécule. La moyenne des aires correspondant au bruit de chaque molécule a été soustrait de chaque échantillon. Cela a permis de mettre en évidence les aires de molécules supérieures à la limite de détection. Le nombre de molécules détectées augmente avec la prise d'essai quelle que soit la température d'extraction. A prise d'essai égale, le nombre de molécules détectées est supérieur avec l'extraction à chaud pour 40 et 60 mg.

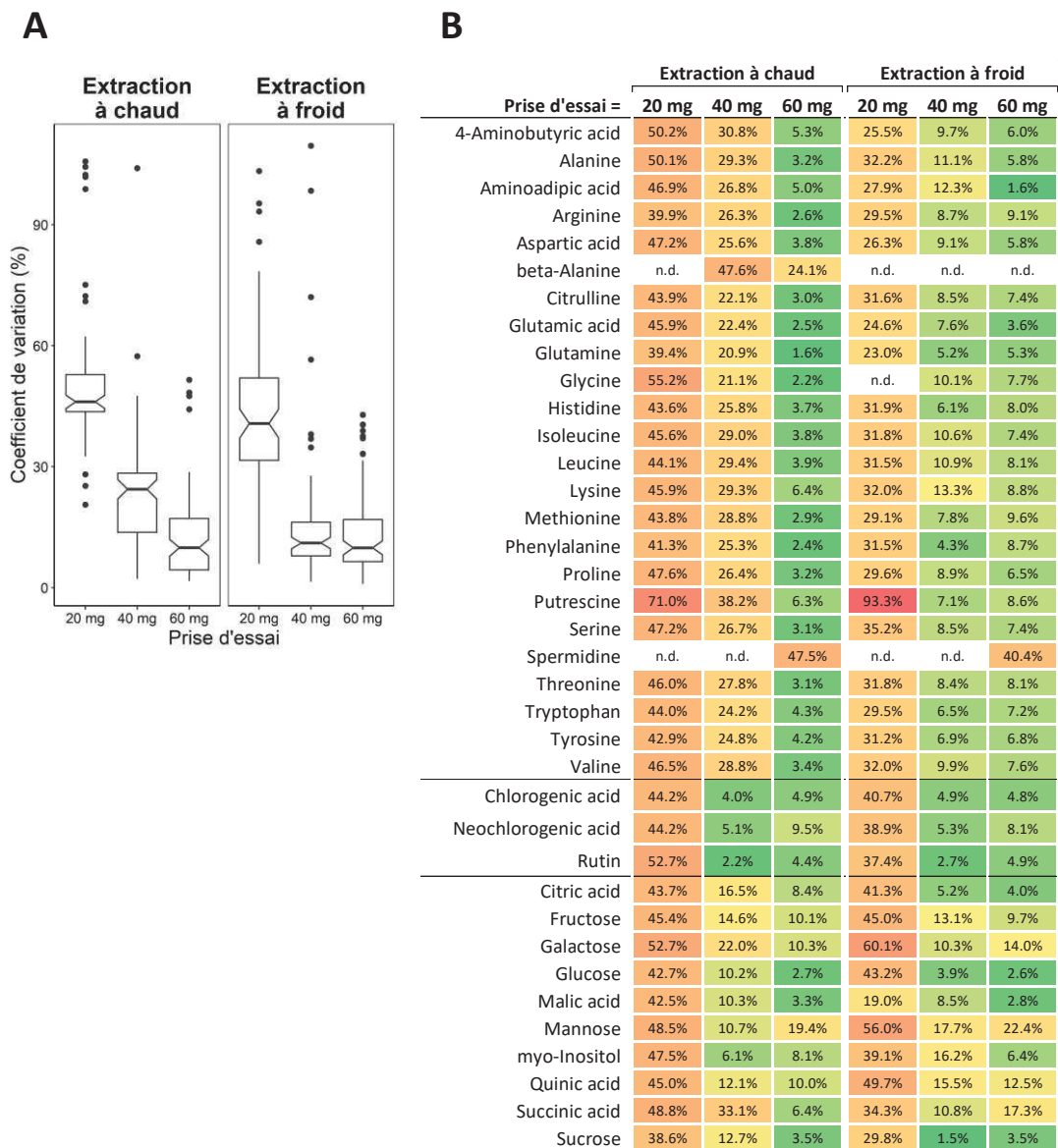


Figure II.13 : Répétabilité des extractions

(A) Distribution des valeurs de coefficient de variation selon les différentes conditions d'extraction. (B) Heatmap des coefficients de variation entre les trois répétitions techniques de la première fraction de chaque condition d'extraction. La valeur du coefficient de variation est inscrite dans chaque case. Seules les valeurs des molécules analysées en quantification absolue sont présentées. Les valeurs des molécules analysées en quantification relative sont présentées en Annexe II.3.

2.3.1.2. Répétabilité

Après soustraction du blanc et normalisation par la prise d'essai, permettant de gommer les variations liées à la pesée, le coefficient de variation entre les trois répétitions techniques de chaque molécule a été calculé dans la première fraction de chaque condition (Figure II.13 et Annexe II.3). Avec une prise d'essai de 20 mg, quelle que soit la température d'extraction, les coefficients de variation sont globalement élevés signe d'une répétabilité faible. Avec une extraction à chaud, la répétabilité augmente avec la prise d'essai et en revanche avec une extraction à froid la répétabilité est identique pour les prises d'essai de 40 et 60 mg. De plus, à prise d'essai égale, il n'y a pas de différence entre les deux températures d'extraction excepté à 40 mg où l'extraction à froid est plus répétable.

2.3.1.3. Quantités extraites

Quelle que soit la prise d'essai, la matrice est considérée comme totalement épuisée après trois extractions successives. La quantité totale extraite pour chaque molécule a été évaluée en sommant les aires de chaque fraction soustrait du blanc avant normalisation par la prise d'essai. Afin de représenter les différences entre les températures d'extraction, le ratio entre ces deux résultats a été calculé puis transformé en logarithme de base 10. Ainsi une valeur négative représente une meilleure extraction à froid, alors qu'une valeur positive représente une meilleure extraction à chaud (Figure II.14 et Annexe II.4). Il n'y a que très peu de différences entre les deux températures d'extraction et plus la prise d'essai augmente, plus les différences sont faibles. Globalement, les molécules sont mieux extraites à froid avec une prise d'essai de 20 mg, alors qu'une extraction à chaud extrait mieux les molécules avec une prise d'essai de 40 mg ou 60 mg. La différence majeure concerne le trans-sinapyl alcool qui est bien mieux extrait à chaud quelle que soit la prise d'essai (Annexe II.4). De plus, parmi les molécules quantifiées en absolue, la spermidine est légèrement mieux extraite à froid avec une prise d'essai de 60 mg.

2.3.1.4. Pourcentage de recouvrement

Selon les différents critères cités ci-dessus, l'extraction à chaud avec une prise d'essai de 60 mg a été préférée. En effet, en plus d'être plus facile à mettre en œuvre, cela permet d'extraire le maximum de molécules avec une bonne répétabilité.

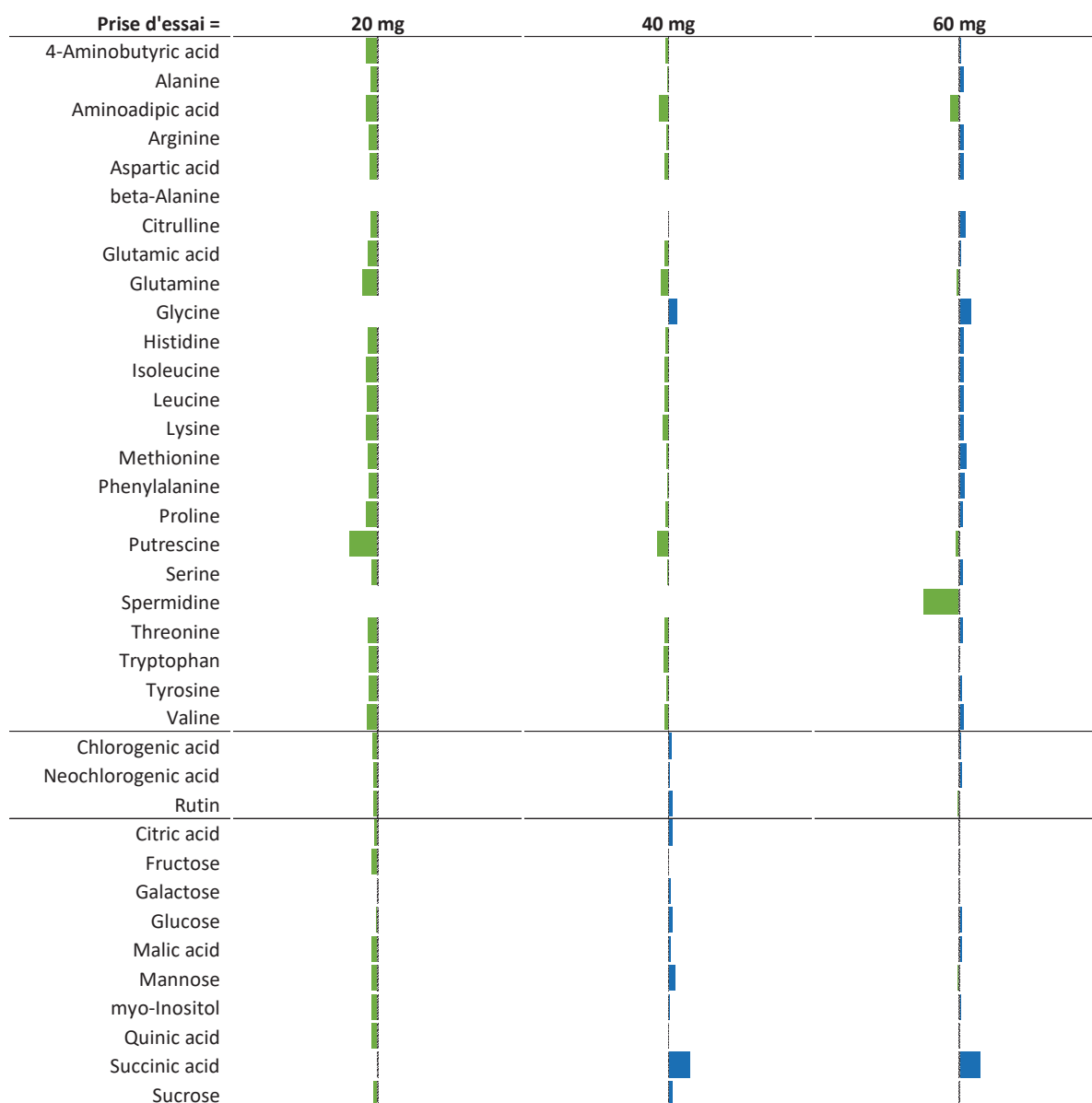


Figure II.14 : Variation de quantité totale extraite

Pour chaque molécule analysée en quantification absolue, les aires des trois fractions ont été sommées. Afin de représenter les différences entre les températures d'extraction, le ratio entre les résultats a été calculé puis transformé en logarithme de base 10. Ainsi les barres vertes, avec une valeur négative, représentent une meilleure extraction à froid, alors que les barres bleues, avec une valeur positive, représentent une meilleure extraction à chaud. Les valeurs des molécules analysées en quantification relative sont présentées en Annexe II.4.

Afin de déterminer le nombre d'extraction successive à réaliser pour épuiser la matrice dans les conditions d'extraction choisies, le pourcentage de recouvrement de chaque fraction a été calculé (Annexe II.5). La première extraction contient entre 64.5 % et 100 % de chacune des molécules, la deuxième extraction permet d'extraire au maximum 25.5 % alors que la troisième extraction permet de récupérer au maximum 13.6 %. Ces chiffres sont différents pour les molécules quantifiées de façon absolue. La première extraction contient entre 86.5 % et 100 % de chacune des molécules, la deuxième extraction permet de récupérer au maximum 12.7 % et la troisième extraction permet de récupérer au maximum 1.9 %. Ainsi, deux extractions successives permettent de récupérer plus de 98 % de chaque molécule avec une perte maximale de 1.9 % pour les molécules analysées en quantification absolue.

2.3.2. Extraction des acides gras

L'objectif n'est pas d'analyser les lipides de façon exhaustive mais de quantifier les acides gras qui représentent un puits de carbone important. En effet, les acides gras sont les lipides majeurs dans les plantes, principalement présent sous forme d'acylglycérol (liaison d'un glycérol avec un ou plusieurs acides gras par une fonction ester). Pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse, les acides gras doivent être séparés du glycérol auquel ils sont liés et transformés en dérivés à plus faible point d'ébullition. Il existe plusieurs méthodes d'extraction et de dérivation plus ou moins longues et plus ou moins coûteuses.

2.3.2.1. Méthode d'extraction

Afin de vérifier la capacité d'extraction des acides gras de la méthode de Bligh and Dyer utilisée pour les autres molécules, une quantité connue d'acide heptadécanoïque a été ajoutée à l'échantillon au moment de l'extraction. Ce composé a été retrouvé à la fois dans la phase méthanolique et dans la phase chloroformique, ce qui a confirmé le besoin de réaliser une extraction particulière pour les acides gras.

La trans-estérification directe des lipides consiste à réaliser l'hydrolyse et la dérivation des acides gras en une seule étape, pour obtenir des esters de méthyl d'acides gras (FAME, *fatty acid methyl ester*). Cette méthode est moins chronophage et peu coûteuse (Carrapiso and García 2000; Lewis *et al.* 2000). Du méthanol acidifié est utilisé comme réactif de méthylation. En effet un milieu acide permet la trans-estérification des lipides et des acides

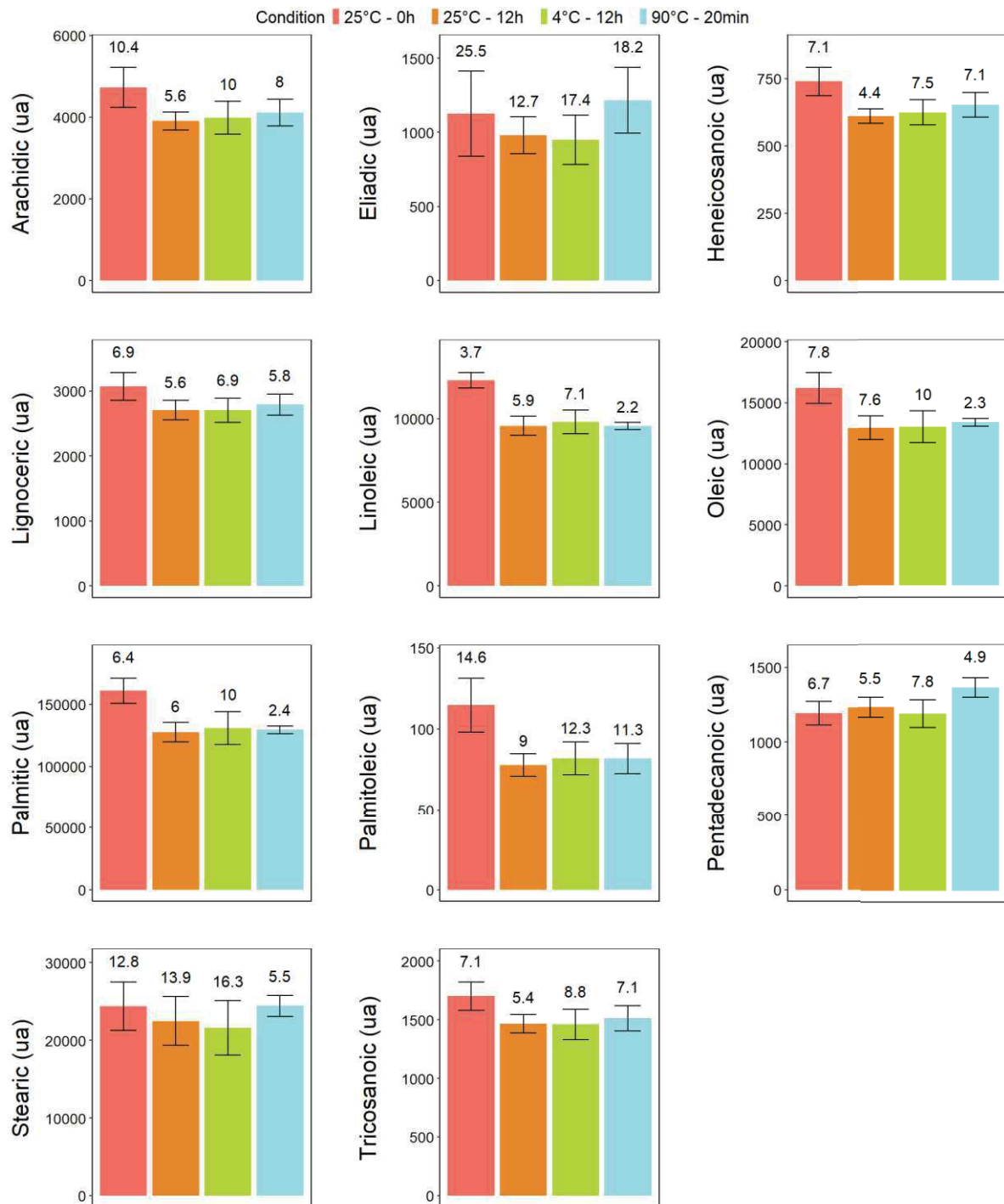


Figure II.15 : Détermination des conditions d'extraction pour la récupération des FAMES

La quantité de molécules détectés a été déterminée pour chaque condition d'extraction à la suite de trois extractions successives. Chaque barre représente l'aire normalisée moyenne des trois répétitions techniques \pm l'écart-type (unité arbitraire). La valeur au-dessus de chaque barre correspond au coefficient de variation entre les répétitions techniques exprimés en pourcentage.

gras libres alors qu'un milieu basique ne permet pas l'estérification des acides gras libres (Eder 1995). La vitesse de trans-estérification augmente avec la température et la concentration en acide (Nelson 2010). Les conditions choisies, 90 minutes à 90°C avec une concentration en acide de 2.5 %, permettent d'aboutir à une réaction totale. Après trans-estérification, les FAMES sont récupérés dans de l'hexane et directement analysés en GC-EI-TOF.

2.3.2.2. Choix du matériel

La mise au œuvre de ce protocole au laboratoire a imposé des contraintes de miniaturisation. En effet, les échantillons biologiques étant en quantité limitée, seulement quelques dizaines de milligrammes devaient être utilisés pour cette analyse. De plus, afin de faciliter la mise en place de ce protocole, uniquement le matériel utilisé en routine sur la plateforme a été utilisé. Ainsi le volume maximum d'extraction était limité à 2 mL. Bien que le verre soit systématiquement utilisé dans la littérature, l'extraction a d'abord été testée en micro-tubes plastiques. Bien que décrit comme résistant au solvant utilisé dans les conditions d'utilisation, le micro-tube relargue des molécules contaminantes (Annexe II.5). L'extraction a donc été réalisée dans des vials en verre de 2 mL avec bouchon à vis. La marque du vial et du bouchon s'est révélée très importante pour l'étanchéité du système lorsque le méthanol acidifié est porté à ébullition. A cause de la faible capacité des vials, une prise d'essai unique de 20 mg a été utilisée.

2.3.2.3. Extraction liquide-liquide – Récupération des FAMES

Après la réaction de trans-estérification, une extraction liquide-liquide a été réalisée afin de récupérer les FAMES en solution. Pour cela, l'hexane a été utilisé comme solvant apolaire avec l'ajout d'une solution saline à 2.5% afin d'augmenter la partition de phase. La littérature ne précise pas de condition particulière pour cette étape, elle s'effectue généralement à température ambiante de façon instantané. Cependant dans les vials utilisés, la surface d'échange entre les deux phases est très faible. Afin d'assurer une bonne récupération des FAMES, les conditions de cette extraction ont été optimisées pour pallier aux contraintes de contenant. Comme vu précédemment pour l'extraction de Bligh et Dyer, augmenter le temps ou la température d'extraction permet d'améliorer le rendement. Quatre conditions différentes ont été comparées (Figure II.15 et Annexe II.7). L'étape de récupération des FAMES a tout d'abord été réalisée à température ambiante avec une récupération du solvant

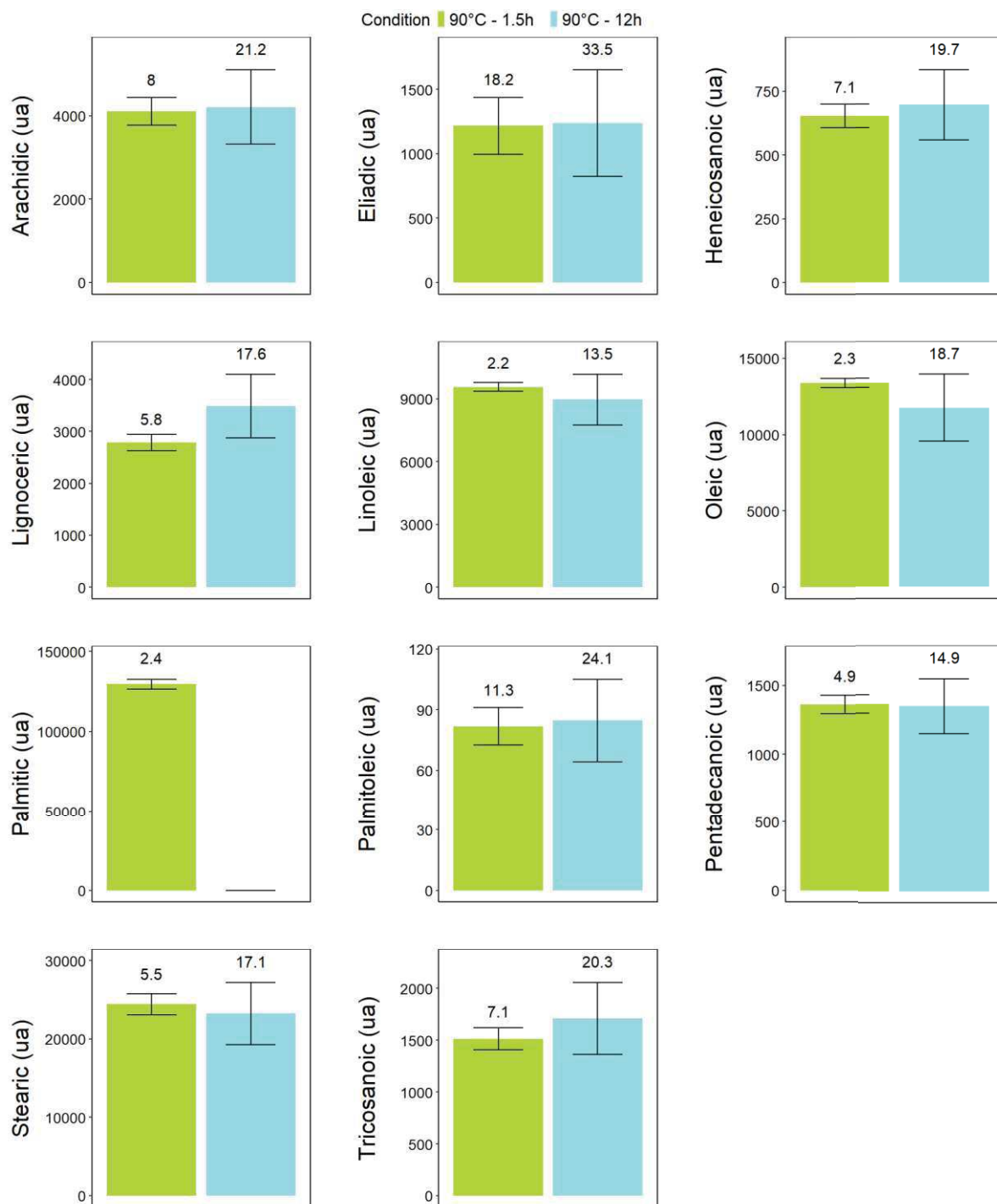


Figure II.16 : Détermination des conditions de trans-estérification

La quantité de molécules détectées a été déterminée pour chaque condition de trans-estérification des lipides. Chaque barre représente l'aire normalisée moyenne des répétitions techniques \pm l'écart-type (unité arbitraire). La valeur au-dessus de chaque barre correspond au coefficient de variation entre les répétitions techniques, exprimé en pourcentage

d'extraction directement après une brève agitation (25°C – 0 h) ou après 12 h d'agitation constante (25°C – 12 h). L'effet de la température a également été considéré avec, une extraction longue à froid (4°C – 12 h) ou une extraction plus courte à chaud (90°C – 20 min), toutes deux sous agitation constante.

Pour chaque condition, après la réaction de trans-estérification, la récupération des FAMES a été réalisée en trois extractions successives. La quantité totale extraite pour chaque molécule a été évaluée en sommant les aires de chaque fraction soustrait du blanc avant normalisation par la prise d'essai. Bien que le rendement d'extraction varie très peu en modifiant le temps et la température d'extraction, la récupération des FAMES est meilleure lorsqu'elle est effectuée à température ambiante, immédiatement après l'ajout du solvant d'extraction. Cependant, ce rendement est obtenu après 3 extractions successives avec jusqu'à 27 % récupéré dans la deuxième fraction et 12 % récupéré dans la troisième fraction. De plus, dans ces conditions la répétabilité est relativement faible. A l'inverse l'extraction réalisée à 90°C pendant 20 minutes, permet en une seule extraction, un rendement d'extraction légèrement plus faible avec une meilleure répétabilité particulièrement pour les molécules les plus abondantes (acide linoléique, acide oléique, acide palmitique et acide stéarique). Du fait des faibles différences de rendement, de la meilleure répétabilité et de la facilité de mise en œuvre, l'extraction à chaud a été préférée.

2.3.2.4. Trans-estérification des N-acyl lipides

Dans les lipides N-acylés, tel que les sphingolipides, les acides gras sont liés au groupement polaire par une fonction amide au lieu d'une fonction ester comme pour les acylglycérols. Ainsi, les acides gras des lipides N-acylés sont plus difficiles à trans-estérifier. Cela est possible dans les mêmes conditions que décrites précédemment mais avec un temps de réaction plus long, induisant fréquemment la présence d'artéfact. Afin d'évaluer le gain apporté par cette méthode, la réaction de trans-estérification a été réalisée dans la même condition que précédemment, à 90°C sous agitation avec du méthanol acidifié à 2.5%, et pendant une nuit ou pendant 90 minutes (Figure II.16). L'augmentation de la durée de réaction n'augmente pas la quantité d'acides gras récupérée. Au contraire, l'acide palmitique qui est un des acides gras majoritaire est complètement dégradé dans ces extraits. De plus, cela réduit la répétabilité avec un coefficient de variation qui augmente d'un facteur 2 à 8.

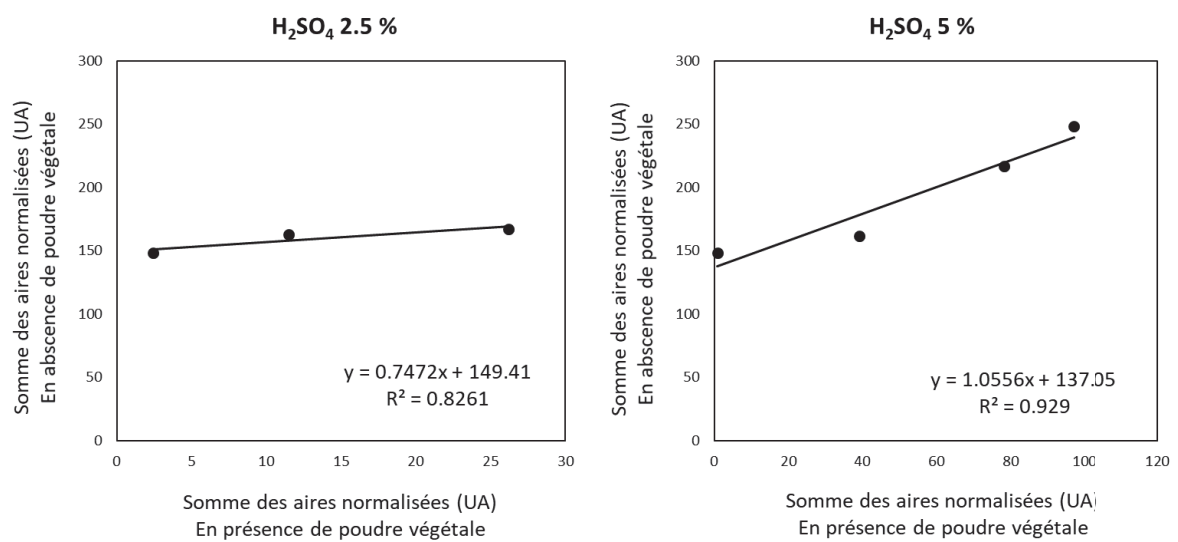


Figure II.17 : Vérification de l'excès de réactif pour la trans-estérification

Régressions linéaires entre les extractions de concentration croissance d'un mélange d'acylglycérols, réalisées en présence ou en absence de poudre végétale, avec 2.5 % ou 5 % de H₂SO₄. Les points représentent les moyennes des répétitions techniques de la somme des aires de chaque FAMES normalisées par la prise d'essai, exprimées en unité arbitraire.

Ainsi, la méthode de trans-estérification sur 90 minutes a été conservée en sachant que les acides gras issus de lipides N-acylés ne sont pas dosés. Une étude exhaustive de la littérature qui est très riche sur le sujet ainsi que d'autres mises au point seraient nécessaires à l'étude de ces lipides. Cependant, au vu des objectifs de détermination des principaux puits de carbone à des fins de modélisation, cette question n'a pas été approfondie.

2.3.2.5. Excès de réactif

Afin de vérifier que la quantité d'acide dans le milieu réactionnel est suffisante pour pallier aux éventuelles variations en lipides présents dans les échantillons, des ajouts dosés ont été réalisés. Un mélange d'acylglycérol en concentration connue a été ajouté en concentration croissante à la poudre végétale avant extraction des lipides. En parallèle, les mêmes concentrations du mélange d'acylglycérol ont été ajoutées à de l'eau, remplaçant la quantité d'eau apportée théoriquement par 20 mg de poudre végétale fraîche (soit 17.5 μ L compte-tenu de la teneur en eau moyenne des échantillons de 87.5 %). Les moyennes des répétitions techniques de la somme des aires de chaque FAMES normalisées par la prise d'essai ont été comparées entre les deux conditions (Figure II.17). Après une régression linéaire, une pente de 0.74 est obtenue avec une concentration en acide sulfurique de 2.5 %, alors que l'augmentation de la concentration en acide à 5 % permet d'obtenir une pente très proche de 1. Ainsi 5 % d'acide sulfurique sont nécessaires pour réagir avec de plus grandes quantités de lipides.

2.3.2.6. Pourcentage de recouvrement

Suite aux modifications des conditions d'extraction il est important de vérifier le nombre d'extraction successive à réaliser pour épuiser la matrice. Ainsi, le pourcentage de recouvrement de chaque fraction a été calculé (Annexe II.8). La première extraction contient entre 81.4 % et 100 % de chacune des molécules, la deuxième extraction permet d'extraire au maximum 17 % alors que la troisième extraction permet de récupérer au maximum 1.7 % avec une grande variabilité dans les deux dernières fractions. Pour les molécules les plus abondantes (acide linoléique, acide oléique, acide palmitique et acide stéarique) le pourcentage de recouvrement de la première fraction est supérieur à 95 %. Au vu de la difficulté à réaliser plusieurs extractions successives, une perte de 5 % sur les acides gras majoritaires a été considérée comme acceptable.

2.4. Quantification absolue

2.4.1. Standard interne

Un standard interne est une molécule ajoutée en quantité constante aux échantillons afin de corriger la perte de molécules pendant la préparation de l'échantillon. Celui-ci doit être similaire aux composés analysés et absent de l'échantillon originel. Les mises au points préliminaires ont permis de vérifier l'absence des molécules choisis comme standard interne. Ainsi, le ribitol (ou adonitol), un pentose alcool, a été choisi comme standard interne des molécules polaires, la norleucine, isomère de la leucine, a été choisi pour les acides aminés, la taxifoline (ou déhydroquercetine), un flavonoïde, a été choisi pour les composés phénoliques, et enfin l'acide margarique (ou heptadécanoïque), un acide gras saturé à 17 atomes de carbone, a été choisi pour les acides gras. Ces molécules ont été ajoutées en concentration connue au solvant d'extraction et lors du traitement des données, les aires de chaque molécule de chaque échantillon ont été corrigées par la médiane des aires du standard interne correspondant.

2.4.2. Calibration externe

La quantification absolue des molécules a été réalisée grâce à une courbe de calibration externe centrée sur les échantillons (Annexe II.9). Pour les analyses en GC-EI-TOF une gamme étalon par séquence d'analyse, a été injectée entre les échantillons biologiques, alors que pour les analyses en UPLC-DAD-ESI-TQ, moins stable, la gamme étalon a été injecté trois fois, au début, au milieu et en fin de séquence. Une séquence d'analyse contient tous les échantillons d'une même répétition biologique. Une régression a été réalisée entre les aires de pics et les concentrations afin de déterminer l'équation nécessaire à la détermination de la concentration d'un échantillon inconnu.

Références

- Ajouz S, Nicot PC, Bardin M. 2010.** Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathology* **59**: 556–566.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959.** A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911–917.
- Carrapiso AI, García C. 2000.** Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids* **35**: 1167–1177.
- Dzakovich MP, Hartman JL, Cooperstone JL. 2020.** A High-Throughput Extraction and Analysis Method for Steroidal Glycoalkaloids in Tomato. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–12.
- Eder K. 1995.** Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **671**: 113–131.
- Larbat R, Paris C, Le Bot J, Adamowicz S. 2014.** Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Science* **224**: 62–73.
- Lecompte F, Abro MA, Nicot PC. 2010.** Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology* **59**: 891–899.
- Lewis T, Nichols PD, McMeekin TA. 2000.** Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods* **43**: 107–116.
- Lopez J, Tremblay N, Voogt W, Dubé S, Gosselin A. 1996.** Effects of varying sulphate concentrations on growth, physiology and yield of the greenhouse tomato. *Scientia Horticulturae* **67**: 207–217.
- Nelson DR. 2010.** Transesterification and Recovery of Intracellular Lipids Using a Single Step Reactive Extraction.
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, et al. 2007.** Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* **3**: 211–221.

Annexe II.1 : Liste des molécules analysées

Pour chaque composé, le niveau d'identification (Sumner *et al.* 2007), l'unité de mesure et le temps de rétention (RT) en minutes sont indiqués. Pour les composés analysés en GC-MS, l'ion modèle (EIC, *extracted ion current*), la *reverse match*, l'indice de rétention (RI), l'indice de rétention théorique et la différence entre ces derniers (Δ RI) sont également indiqués. Pour les composés analysés en LC-MS, le mode (positif ou négatif) associé à la source *electrospray*, la transition MRM (*multiple reactions monitoring*), la tension de cône (CV) en volt et la tension capillaire (CE) en électron-volt sont également indiqués.

Métabolites polaires - Prep-GC-El-TOF (MeOX+TMS)

	ID Level	Unit	RT (min)	EIC	Reverse Match	RI	Theoretical RI	Δ RI
2-Methylmalic acid	[2]	Arbitrary	12.12	247.1	802	1469.2	1464	0.40%
2-Oxoglutaric acid	[2]	Arbitrary	13.56	198.1	796	1578.2	1568	0.70%
3-Cyanoalanine	[2]	Arbitrary	10.71	141.1	901	1372	1368	0.30%
Adipic acid	[2]	Arbitrary	12.65	275.1	769	1506.5	1497	0.60%
Arabinose	[1]	Arbitrary	14.53	307.2	-	1654.9	1654	0.10%
Azelaic acid	[2]	Arbitrary	16.35	317.2	688	1798.4	1806	0.40%
cis-5-Caffeoylquinic acid	[2]	Arbitrary	24.81	345.2	750	3003.5	2988	0.50%
cis-Aconitic acid	[2]	Arbitrary	15.74	229.1	790	1750.5	1740	0.60%
Citric acid	[1]	μ mol/gDW	16.55	273.1	-	1816	1805	0.60%
Fructose	[1]	μ mol/gDW	17.21	307.2	-	1857.5	1865.4	-0.42%
Fructose-6-phosphate	[1]	Arbitrary	21.01	387.1	-	2320.5	2293	1.20%
Fumaric acid	[1]	Arbitrary	10.42	245.1	-	1352.1	1346	0.50%
Galactinol	[2]	Arbitrary	24.71	204.1	919	2983.2	2973	0.30%
Galactose	[1]	μ mol/gDW	17.43	319.2	-	1876.4	1899.4	-1.21%
Glucaric acid-1,4-lactone	[2]	Arbitrary	18.03	217.1	907	1955.5	1938	0.90%
Glucose	[1]	μ mol/gDW	17.5	319.2	-	1882.5	1902.7	-1.06%
Glucose-6-phosphate	[1]	Arbitrary	21.22	387.1	-	2319.4	2293	1.20%
Glucuronic acid	[2]	Arbitrary	17.84	333.2	637	1935.2	1940	0.20%
Glycerate-3-phosphate	[1]	Arbitrary	16.39	299.1	-	1800	1790	0.60%
Glyceric acid	[1]	Arbitrary	10.07	292.2	-	1328.1	1321	0.50%
Glycerol	[1]	Arbitrary	9.24	205.1	-	1270.9	1265	0.50%
Glycerol-3-phosphate	[2]	Arbitrary	15.86	299.1	867	1759.7	1754	0.30%
Glycolic acid	[1]	Arbitrary	6.32	205.1	-	1064.7	1063	0.20%
Homocystine	[2]	Arbitrary	22.31	128.1	641	2539.4	2532	0.30%
Malic acid	[1]	μ mol/gDW	12.39	233.1	-	1487.8	1481	0.50%
Maltose	[2]	Arbitrary	23.65	361.2	889	2763	2753	0.40%
Maltotriose	[2]	Arbitrary	26.65	361.2	915	3356.5	3343	0.40%
Mannobiose	[3]	Arbitrary	23.59	361.2	907	2752.9	2746	0.30%
Mannose	[1]	μ mol/gDW	17.37	319.2	-	1871.8	1887.5	-0.83%
Mannose-6-phosphate	[2]	Arbitrary	21.13	387.2	958	2334.1	2329	0.20%
Myoinositol	[1]	μ mol/gDW	19.44	305.2	-	2093	2083.9	0.44%
Myoinositol-1-phosphate	[2]	Arbitrary	21.72	318.2	810	2440.4	2428	0.50%
Myristic acid amide	[2]	Arbitrary	19	284.3	820	2060.7	2037	1.20%
Oxalic acid	[1]	Arbitrary	7.13	147.1	-	1122.4	1117	0.50%
Phloroglucinic acid	[3]	Arbitrary	18.32	443.2	794	1987.5	1964	1.20%
Pyruvic acid	[1]	Arbitrary	6.49	217.1	-	1038	1038	0.00%
Quinic acid	[1]	μ mol/gDW	16.99	345.2	-	1853.9	1843	0.60%
Ribono-1,4-lactone	[2]	Arbitrary	14.9	307.2	684	1684.1	1677	0.40%
Ribose	[1]	Arbitrary	14.81	307.2	-	1676.7	1667	0.60%
Saccharic acid	[3]	Arbitrary	18.63	333.2	911	2020.5	2002	0.90%
Succinic acid	[1]	μ mol/gDW	9.89	247.1	-	1315.5	1311	0.40%
Sucrose	[1]	μ mol/gDW	23.04	361.2	-	2638.1	2629.5	0.32%
Threonic acid	[2]	Arbitrary	13.29	292.2	885	1557.3	1546	0.70%
Threonic acid-1,4-lactone	[2]	Arbitrary	10.76	247.1	881	1375.4	1371	0.30%
trans-4-Caffeoylquinic acid	[2]	Arbitrary	25.55	307.2	802	3168	3155	0.40%
trans-5-Caffeoylquinic acid	[2]	Arbitrary	25.68	345.2	843	3192.9	3177	0.50%
Trehalose	[2]	Arbitrary	23.55	361.2	851	2746.7	2740	0.20%
Tyramine	[2]	Arbitrary	14.42	102.08	891	1649.3	1640	0.40%
U_Caffeoylquinic acid	[3]	Arbitrary	25.45	307.2	647	3143	-	-
U_Erythritol	[3]	Arbitrary	22.09	446.2	848	2503.2	2501	0.10%
U_Galactinol 1	[3]	Arbitrary	24.75	204.12	953	2993	-	-
U_Galactinol 2	[3]	Arbitrary	24.84	204.12	953	3015	-	-
U_Galactose	[3]	Arbitrary	19.7	319.2	898	2136.7	2137	0.00%
U_Glucuronic acid-e-lactone	[3]	Arbitrary	15.17	204.1	749	1705.4	1888	9.70%
U_Inositol	[3]	Arbitrary	18.69	305.2	823	2027.7	2011	0.90%
U_Melibiose	[3]	Arbitrary	24.26	204.1	674	2884.7	2853	1.10%
U_Sorbofuranose	[3]	Arbitrary	15.94	217.1	777	1765.9	1762	0.20%
U_Sucrose	[3]	Arbitrary	22.32	361.2	917	2541	2533	0.30%
U_Threonic acid	[3]	Arbitrary	13.07	292.2	641	1539.4	1523	1.10%

Métabolites apolaires - Prep-GC-El-TOF (TMS)

	ID Level	Unit	RT (min)	EIC	Reverse Match	RI	Theoretical RI	Δ RI
alpha-Tocopherol	[2]	Arbitrary	25.54	502.4	897	3142.7	3145	0.10%
beta-Sitosterol	[2]	Arbitrary	26.67	357.3	890	3341.4	3344	0.10%
beta-Tocopherol	[2]	Arbitrary	24.82	488.4	816	2987.7	2973	0.50%
Campesterol	[2]	Arbitrary	26.21	343.3	906	3264.8	3279	0.40%
Cycloartenol	[2]	Arbitrary	27.14	393.3	719	3417.7	3447	0.90%
Fucosterol	[2]	Arbitrary	26.76	386.3	851	3354.8	3344	0.30%
gamma-Tocopherol	[2]	Arbitrary	24.87	488.4	789	2987.7	2985	0.10%
Lupeol	[2]	Arbitrary	27.2	189.2	882	3427.1	3435	0.20%
Stigmastan-3,5-diene	[3]	Arbitrary	25.5	396.4	725	3133.5	-	-
Stigmasterol	[2]	Arbitrary	26.33	255.2	913	3284.9	3303	0.50%
Trans-sinapyl alcohol	[2]	Arbitrary	19.4	354.2	881	2091.9	2082	0.50%

Acides gras - Prep-GC-EI-TOF (FAME)

	ID Level	Unit	RT (min)	EIC
Arachidic acid	[1]	μmol/gDW	21.28	87.05
Elaidic acid	[1]	μmol/gDW	19.57	87.05
Heneicosanoic acid	[1]	μmol/gDW	21.92	87.05
Lignoceric acid	[1]	μmol/gDW	23.6	87.05
Linoleic acid	[1]	μmol/gDW	19.52	87.05
Oleic acid	[1]	μmol/gDW	19.63	87.05
Palmitic acid	[1]	μmol/gDW	17.89	87.05
Palmitoleic acid	[1]	μmol/gDW	17.66	87.05
Pentadecanoic acid	[1]	μmol/gDW	16.75	87.05
Stearic acid	[1]	μmol/gDW	19.79	87.05
Tricosanoic acid	[1]	μmol.gDW ²	23.07	87.05

Acides aminés - UPLC-DAD-ESI-TQ (AQC)

	ID Level	Unit	ESI	RT (min)	MRM	CV (V)	CE (eV)
4-Aminobutyric acid	[1]	μmol/gDW	positive	4.43	274.0>171.0	21	24
Alanine	[1]	μmol/gDW	positive	4.11	260.0>171.0	29	24
Amino adipic acid	[1]	μmol/gDW	positive	5.07	332.1>171.0	21	24
Arginine	[1]	μmol/gDW	positive	1.84	173.0>171.0	13	12
Asparagine	[1]	μmol/gDW	positive	1.3	303.1>171.0	30	24
Aspartic acid	[1]	μmol/gDW	positive	2.35	304.051>171.0	21	24
beta-Alanine	[1]	μmol/gDW	positive	2.87	260.0>171.0	29	24
Citrulline	[1]	μmol/gDW	positive	3.14	346.1>171.0	29	24
Glutamic acid	[1]	μmol/gDW	positive	2.9	318.052>171.0	29	24
Glutamine	[1]	μmol/gDW	positive	1.91	317.088>171.0	21	24
Glycine	[1]	μmol/gDW	positive	2.09	246.0>171.0	21	24
Histidine	[1]	μmol/gDW	positive	1.13	163.5>171	21	12
Isoleucine	[1]	μmol/gDW	positive	7.8	302.12>171.0	29	24
Leucine	[1]	μmol/gDW	positive	7.87	302.12>171.0	29	24
Lysine	[1]	μmol/gDW	positive	6.89	244.1>171.0	21	19
Methionine	[1]	μmol/gDW	positive	6.98	320.1>171.0	21	24
Phenylalanine	[1]	μmol/gDW	positive	7.95	336.14>171.0	13	24
Pipecolic acid	[1]	μmol/gDW	positive	6.91	300.1>171.0	24	32
Proline	[1]	μmol/gDW	positive	4.97	286.069>171.0	21	24
Putrescine	[1]	μmol/gDW	positive	6.9	215.1>171.0	25	24
Serine	[1]	μmol/gDW	positive	1.91	276.0>171.0	29	24
Spermidine	[1]	μmol/gDW	positive	7.39	219.5>171.0	25	12
Threonine	[1]	μmol/gDW	positive	3.56	290.1>171.0	21	29
Tryptophane	[1]	μmol/gDW	positive	8.05	375.14>171.0	5	24
Tyrosine	[1]	μmol/gDW	positive	6.92	352.1>171.0	13	24
Valine	[1]	μmol/gDW	positive	7.12	288.1>171.0	29	24

Composés phénoliques - UPLC-DAD-ESI-TQ

	ID Level	Unit	ESI	RT (min)	MRM	CV (V)	CE (eV)
Chlorogenic acid	[1]	μmol/gDW	negative	2.44	353>191	10	14
Neochlorogenic acid	[1]	μmol/gDW	negative	2.01	353.1>178.7	40	21
Rutin	[1]	μmol/gDW	negative	3.43	609>300	20	28

Glycoalcaloïdes - UPLC-DAD-ESI-TQ

	ID Level	Unit	ESI	RT (min)	MRM	CV (V)	CE (eV)
Dehydrotomatine	[2]	Arbitrary	positive	3.35	1032.5>84.7	70	80
Hydroxytomatine 1	[2]	Arbitrary	positive	1.98	1050.6>1032	55	40
Hydroxytomatine 2	[2]	Arbitrary	positive	2.14	1050.6>1032	55	40
Tomatine	[1]	μmol/gDW	positive	3.65	578.4>104.8	70	85

Phytohormones - UPLC-ESI-TQ (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE Versailles-Grignon)

	ID Level	Unit	ESI	RT (min)	MRM
Abscissic acid	[1]	ng/gDW	negative	4.73	267.1>156.1
Indole-3-acetic acid	[1]	ng/gDW	positive	4.26	182.1 >136.05
Isopentenyladenosine	[1]	ng/gDW	positive	5.95	337.1>205.1
Isopentenyladenosine-5'-monophosphate	[1]	ng/gDW	positive	4.84	422.05>210.17
Salicylic acid	[1]	ng/gDW	negative	4.1	141.1 >96.9
Zéatine-ribose-5'-monophosphate	[1]	ng/gDW	positive	2.85	436.96>225.1
Zeatine-7-glucoside	[1]	ng/gDW	positive	2.57	387.1>225.1
Zeatine-O-glucoside	[1]	ng/gDW	positive	2.69	387.1>225.1
trans-Zeatine-ribose	[1]	ng/gDW	positive	3.81	357.16>225.05

Autres composés

	Unit	Reference
ARN	ng/gDW	Lacrampe <i>et al.</i> 2020
Ascorbate	mg/100gDW	Serino <i>et al.</i> 2019
Cell wall	mg/gDW	Renard <i>et al.</i> 1990
Glutathione	μmol/gDW eq. GSSG	Massot <i>et al.</i> 2013
Protein	mg/gDW	Biais <i>et al.</i> 2014
Starch	μmol.eqGlc/gDW	Biais <i>et al.</i> 2014

Annexe II.2 : Molécules détectées par condition d'extraction de Bligh and Dyer

Molécules, parmi celles analysées en quantification relative, dont l'aire de la première faction de chaque condition est statistiquement supérieure au blanc selon un test de Mann-Whitney. Les cases vertes correspondent à une p-valeur < 0,05 et les cases rouges correspondent à une p-valeur > 0,05. La p-valeur est inscrite dans chaque case.

Prise d'essai =	Extraction à chaud			Extraction à froid		
	20 mg	40 mg	60 mg	20 mg	40 mg	60 mg
2-Methylmalic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
3-Cyanoalanine	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Adipic acid	0.33	0.04	0.04	0.50	0.50	0.10
Arabinose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Azelaic acid	0.19	0.04	0.04	0.67	0.33	0.33
cis-5-Caffeoylquinic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
cis-aconitic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Fructose-6-phosphate	0.10	0.04	0.04	0.19	0.04	0.04
Fumaric acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Galactinol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Glucaric acid-1,4-lactone	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Glucose-6-phosphate	0.19	0.04	0.04	0.33	0.19	0.04
Glucuronic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Glycerate-3-phosphate	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Glyceric acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Glycerol	0.96	0.81	0.04	0.81	0.81	0.50
Glycerol-3-phosphate	0.10	0.04	0.04	0.67	0.04	0.04
Glycolic acid	0.33	0.04	0.04	0.33	0.10	0.04
Homocystine	0.67	0.04	0.04	0.96	0.04	0.04
Maltose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Maltotriose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Mannobiose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Mannose-6-phosphate	0.10	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
myo-Inositol-1-phosphate	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Myristic acid amide	0.81	0.50	0.19	0.99	0.33	0.33
Oxalic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Phloroglucinic acid	0.33	0.10	0.04	0.50	0.33	0.10
Pyruvic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Raffinose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Ribono-1,4-lactone	0.10	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Ribose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Saccharic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Threonic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Threonic acid-1,4-lactone	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
trans-4-Caffeoylquinic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
trans-5-Caffeoylquinic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Trehalose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Tyramine	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Caffeoylquinic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Erythritol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.10	0.04
U_Galactinol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Galactose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Glucuronic acid-e-lactone	0.04	0.04	0.04	0.33	0.04	0.04
U_Inositol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Melibiose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Sorbofuranose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Sucrose	0.04	0.10	0.04	0.04	0.04	0.04
U_Threonic acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
2-Oxoglutaric acid	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
alpha-Tocopherol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
beta-Sitosterol	0.10	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
beta-Tocopherol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Campesterol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Cycloartenol	0.10	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Fucosterol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
gamma-Tocopherol	0.10	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Lupeol	0.33	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Stigmastan-3,5-diene	0.19	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Stigmasterol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
trans-Sinapyl alcohol	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04

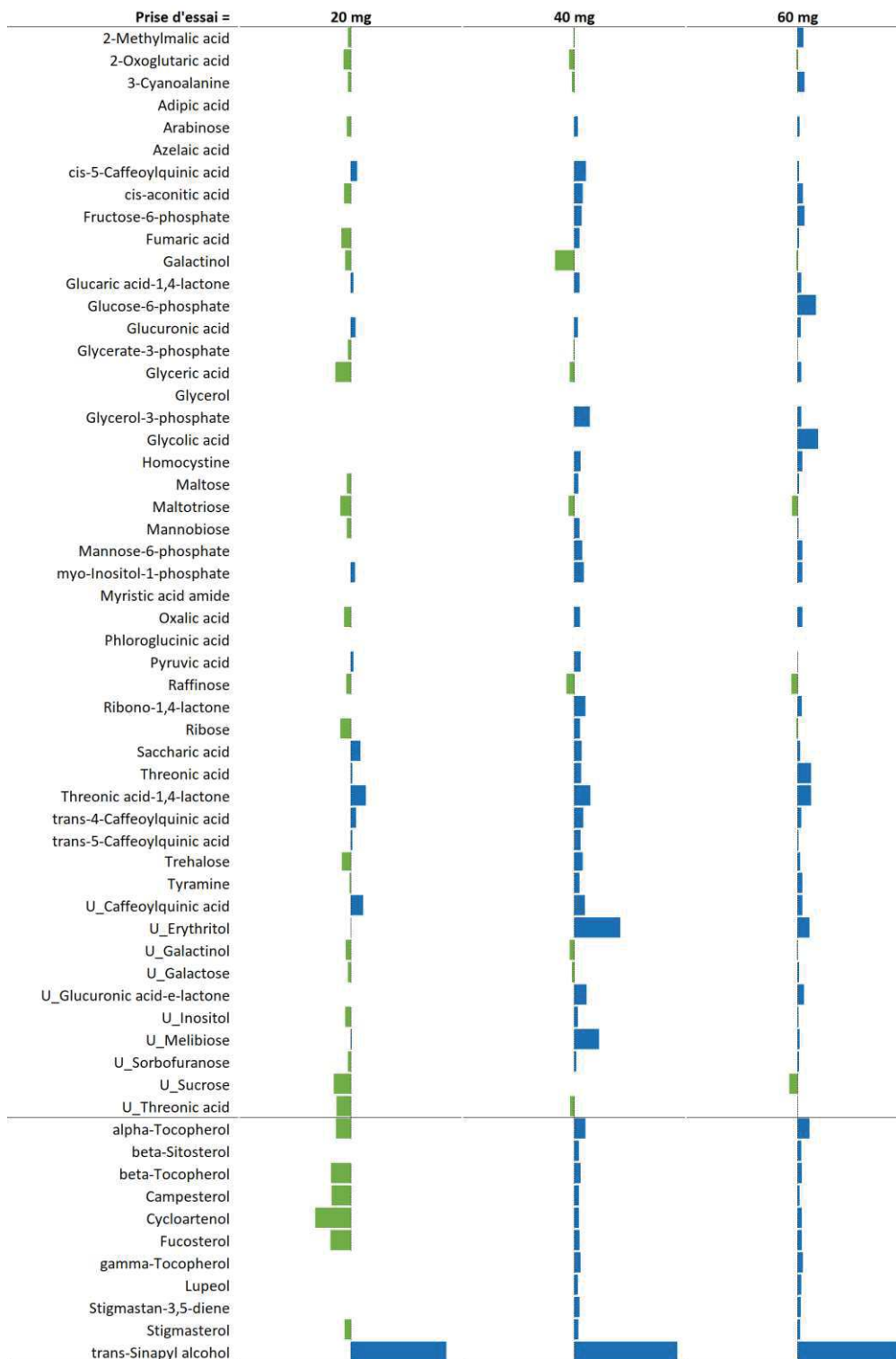
Annexe II.3 : Répétabilité des extractions de Bligh and Dyer

Heatmap des coefficients de variation entre les trois répétitions techniques de la première faction de chaque condition d'extraction, pour les molécules analysées en quantification relative. La valeur du coefficient de variation est inscrite dans chaque case.

Prise d'essai =	Extraction à chaud			Extraction à froid		
	20 mg	40 mg	60 mg	20 mg	40 mg	60 mg
2-Methylmalic acid	56.8%	3.0%	24.0%	35.0%	38.0%	11.2%
2-Oxoglutaric acid	47.9%	14.5%	22.0%	29.3%	14.5%	0.9%
3-Cyanoalanine	36.6%	9.8%	8.5%	43.9%	6.5%	4.0%
Adipic acid	n.d.	22.1%	44.2%	n.d.	n.d.	n.d.
Arabinose	49.1%	20.3%	5.4%	42.4%	9.6%	17.0%
Azelaic acid	n.d.	104.0%	48.4%	n.d.	n.d.	n.d.
cis-5-Caffeoylquinic acid	60.9%	19.8%	14.6%	76.1%	27.7%	2.9%
cis-aconitic acid	28.1%	22.2%	19.5%	34.2%	16.9%	10.5%
Fructose-6-phosphate	n.d.	30.6%	17.3%	n.d.	12.4%	14.8%
Fumaric acid	45.9%	9.7%	6.2%	31.6%	12.5%	10.1%
Galactinol	53.9%	9.2%	14.9%	50.0%	109.6%	6.5%
Glucaric acid-1,4-lactone	48.6%	30.5%	8.4%	51.2%	16.3%	11.8%
Glucose-6-phosphate	n.d.	38.0%	11.6%	n.d.	n.d.	22.5%
Glucuronic acid	53.9%	26.9%	2.5%	69.0%	17.4%	17.0%
Glycerate-3-phosphate	44.8%	13.2%	6.8%	37.9%	10.4%	1.3%
Glyceric acid	52.8%	40.4%	10.7%	43.2%	6.3%	9.1%
Glycerol	n.d.	n.d.	16.0%	n.d.	n.d.	n.d.
Glycerol-3-phosphate	n.d.	24.6%	19.4%	n.d.	11.1%	16.0%
Glycolic acid	n.d.	26.0%	23.3%	n.d.	n.d.	24.1%
Homocystine	n.d.	25.5%	12.7%	n.d.	13.1%	15.4%
Maltose	48.7%	26.8%	3.4%	56.0%	15.6%	9.0%
Maltotriose	36.1%	9.9%	15.3%	30.0%	13.0%	9.9%
Mannobiose	48.7%	26.7%	2.7%	57.8%	14.1%	13.9%
Mannose-6-phosphate	n.d.	31.9%	10.8%	103.3%	14.5%	20.9%
myo-Inositol-1-phosphate	38.8%	25.2%	6.2%	42.0%	36.9%	18.9%
Myristic acid amide	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Oxalic acid	38.2%	9.9%	5.0%	25.7%	2.4%	12.3%
Phloroglucinic acid	n.d.	n.d.	51.5%	n.d.	n.d.	n.d.
Pyruvic acid	32.5%	4.4%	7.9%	30.8%	13.1%	6.3%
Raffinose	36.2%	14.8%	17.1%	50.0%	18.2%	10.5%
Ribono-1,4-lactone	n.d.	57.4%	19.4%	34.8%	5.4%	15.3%
Ribose	53.1%	28.4%	9.5%	27.5%	11.0%	12.8%
Saccharic acid	53.0%	15.7%	19.1%	74.3%	16.5%	11.5%
Threonic acid	62.3%	12.3%	17.0%	36.2%	20.5%	13.7%
Threonic acid-1,4-lactone	75.1%	14.1%	4.8%	39.6%	12.8%	10.0%
trans-4-Caffeoylquinic acid	33.1%	7.3%	17.1%	95.3%	21.4%	7.1%
trans-5-Caffeoylquinic acid	42.5%	7.1%	16.9%	49.4%	23.9%	5.1%
Trehalose	34.5%	7.8%	7.0%	27.3%	14.2%	10.7%
Tyramine	45.6%	35.6%	7.7%	43.3%	98.4%	29.0%
U_Caffeoylquinic acid	72.3%	13.9%	14.0%	78.4%	34.8%	4.9%
U_Erythritol	25.2%	30.7%	28.7%	52.8%	n.d.	38.9%
U_Galactinol	44.9%	12.7%	13.8%	44.8%	72.1%	6.1%
U_Galactose	53.0%	3.0%	9.8%	55.6%	27.2%	11.7%
U_Glucuronic acid-e-lactone	44.5%	26.2%	16.7%	n.d.	11.8%	3.3%
U_Inositol	56.2%	17.3%	26.3%	50.1%	16.7%	16.6%
U_Melibiose	46.2%	28.4%	12.6%	41.4%	56.5%	2.4%
U_Sorbofuranose	44.2%	23.4%	15.5%	45.1%	21.2%	11.8%
U_Sucrose	20.5%	n.d.	8.4%	85.7%	10.9%	16.8%
U_Threonic acid	50.7%	14.0%	17.2%	5.9%	25.8%	21.5%
alpha-Tocopherol	104.4%	23.3%	13.3%	48.2%	4.5%	33.1%
beta-Sitosterol	n.d.	25.8%	17.8%	59.6%	10.5%	37.0%
beta-Tocopherol	101.9%	22.1%	13.3%	45.2%	4.4%	31.5%
Campesterol	105.7%	27.2%	17.8%	61.1%	7.9%	37.2%
Cycloartenol	n.d.	24.6%	19.6%	67.0%	10.6%	37.6%
Fucoesterol	102.4%	25.0%	19.0%	61.3%	12.3%	37.2%
gamma-Tocopherol	n.d.	16.5%	11.5%	34.4%	1.4%	33.2%
Lupeol	n.d.	29.6%	23.6%	61.1%	17.4%	42.8%
Stigmastan-3,5-diene	n.d.	28.2%	20.1%	70.2%	15.9%	40.5%
Stigmasterol	101.8%	29.0%	18.0%	60.7%	12.9%	40.4%
trans-Sinapyl alcohol	98.8%	31.5%	11.5%	47.4%	6.9%	24.8%

Annexe II.4 : Variation de quantité totale récupérée lors des extractions de Bligh and Dyer

Pour chaque molécule analysée en quantification relative, les aires des trois fractions ont été sommées. Afin de représenter les différences entre les températures d'extraction, le ratio entre les résultats a été calculé puis transformé en logarithme de base 10. Ainsi les barres vertes, avec une valeur négative, représentent une meilleure extraction à froid, alors que les barres bleues, avec une valeur positive, représentent une meilleure extraction à chaud.



Annexe II.5 : Pourcentage de recouvrement lors de l'extraction de Bligh and Dyer

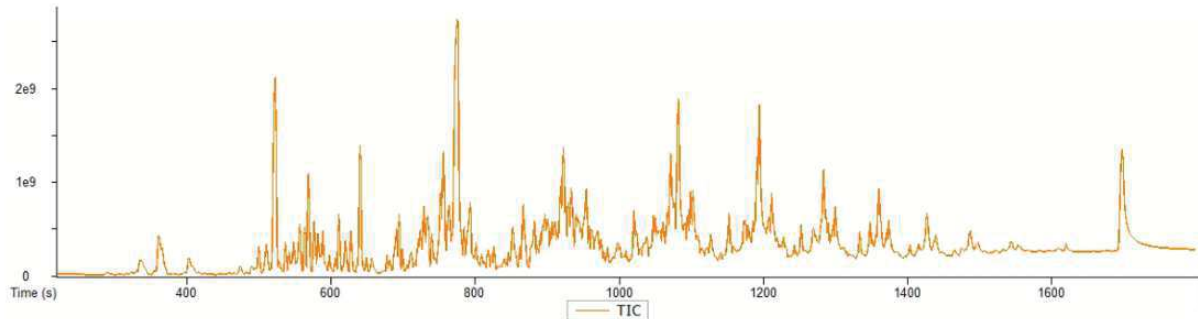
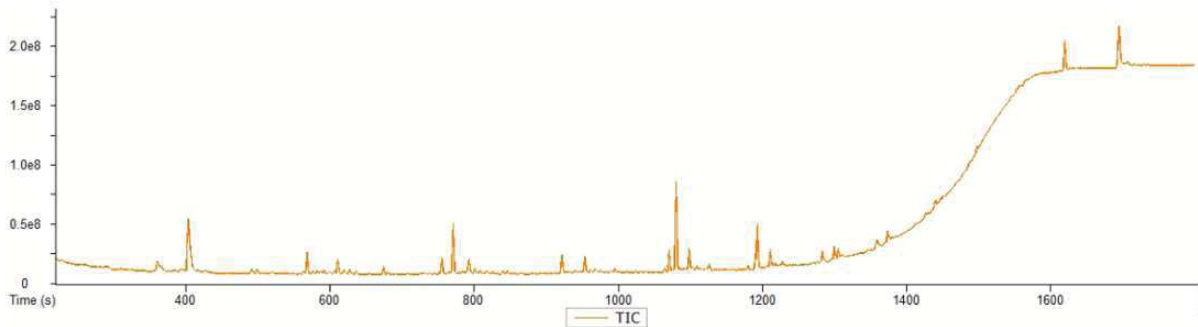
Pourcentage de recouvrement dans chaque fraction issue de trois extraction successives dans les conditions choisies. La valeur correspond à la moyenne des trois répétitions techniques \pm l'écart-type.

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
4-Aminobutyric acid	93.7 \pm 1.4	5.8 \pm 1.5	0.4 \pm 0.2
Alanine	94.3 \pm 1.2	5.7 \pm 1.2	n.d.
Aminoadipic acid	94.1 \pm 3.6	5.9 \pm 3.6	n.d.
Arginine	90.2 \pm 1.1	7.9 \pm 1.4	1.9 \pm 0.3
Aspartic acid	92.3 \pm 1.7	7.3 \pm 1.8	0.4 \pm 0.1
beta-Alanine	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Citrulline	91.9 \pm 1.4	7.6 \pm 1.5	0.5 \pm 0.1
Glutamic acid	91 \pm 1.9	8.4 \pm 2	0.6 \pm 0.2
Glutamine	90.3 \pm 1.7	9.1 \pm 1.8	0.6 \pm 0.2
Glycine	90.4 \pm 3	9.6 \pm 3	n.d.
Histidine	91.8 \pm 0.8	7.5 \pm 1	0.6 \pm 0.2
Isoleucine	94.3 \pm 1.2	5.4 \pm 1.2	0.3 \pm 0.1
Leucine	94.4 \pm 1.2	5.4 \pm 1.2	0.2 \pm 0.1
Lysine	90.8 \pm 1.6	7.6 \pm 1.8	1.6 \pm 0.3
Methionine	94.6 \pm 0.9	5.2 \pm 1	0.2 \pm 0.1
Phenylalanine	93.7 \pm 1	5.9 \pm 1.1	0.4 \pm 0.1
Proline	93.1 \pm 1.3	6.4 \pm 1.4	0.5 \pm 0.1
Putrescine	98.2 \pm 0.2	1 \pm 0.4	0.8 \pm 0.3
Serine	93.6 \pm 1.2	6.4 \pm 1.2	n.d.
Spermidine	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Threonine	93.9 \pm 1.2	5.9 \pm 1.3	0.3 \pm 0.1
Tryptophan	93.5 \pm 0.7	6.1 \pm 0.8	0.4 \pm 0.2
Tyrosine	93.9 \pm 1.1	6.1 \pm 1.1	n.d.
Valine	94.2 \pm 1.2	5.5 \pm 1.2	0.3 \pm 0.1
Chlorogenic acid	94.7 \pm 1.3	5.3 \pm 1.3	n.d.
Neochlorogenic acid	94.9 \pm 1	5.1 \pm 1	n.d.
Rutin	93.1 \pm 0.9	6.4 \pm 0.9	0.5 \pm 0.1
Citric acid	92.8 \pm 1.3	6.6 \pm 1.3	0.6 \pm 0.1
Fructose	95.6 \pm 0.7	4.2 \pm 0.7	0.2 \pm 0
Galactose	97.8 \pm 0.5	2.2 \pm 0.5	n.d.
Glucose	91.1 \pm 1.9	8.7 \pm 1.9	0.2 \pm 0.1
Malic acid	86.5 \pm 2.7	12.7 \pm 2.7	0.8 \pm 0.1
Mannose	97.2 \pm 1.7	2.4 \pm 1.7	0.4 \pm 0.1
myo-Inositol	93.2 \pm 0.7	6.4 \pm 0.7	0.4 \pm 0.1
Quinic acid	96.1 \pm 0.6	3.7 \pm 0.6	0.2 \pm 0
Succinic acid	91.2 \pm 1.3	7.3 \pm 1.6	1.6 \pm 0.4
Sucrose	87.9 \pm 2.3	11.4 \pm 2.3	0.7 \pm 0

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
2-Methylmalic acid	94.1 ± 1.1	5.3 ± 0.8	0.6 ± 0.5
2-Oxoglutaric acid	96.4 ± 0.8	3.6 ± 0.8	n.d.
3-Cyanoalanine	90.6 ± 1.3	7.8 ± 1.5	1.6 ± 0.3
Adipic acid	100 ± 0	n.d.	n.d.
Arabinose	96.7 ± 0.8	3.2 ± 0.9	0 ± 0
Azelaic acid	100 ± 0	n.d.	n.d.
cis-5-Caffeoylquinic acid	96.2 ± 0.6	3.8 ± 0.6	n.d.
cis-aconitic acid	84.6 ± 1.1	13.3 ± 1.7	2.1 ± 0.7
Fructose-6-phosphate	100 ± 0	n.d.	n.d.
Fumaric acid	91.4 ± 0.9	6.5 ± 0.7	2.1 ± 0.2
Galactinol	97.1 ± 0.6	2.9 ± 0.6	n.d.
Glucaric acid-1,4-lactone	95.6 ± 1.1	4.1 ± 1	0.4 ± 0.1
Glucose-6-phosphate	86.6 ± 3.7	9.6 ± 2.8	3.8 ± 1
Glucuronic acid	98.2 ± 0.5	1.8 ± 0.5	n.d.
Glycerate-3-phosphate	90.7 ± 1.9	8.7 ± 1.9	0.5 ± 0.2
Glyceric acid	90.1 ± 2.1	9.9 ± 2.1	n.d.
Glycerol	100 ± 0	n.d.	n.d.
Glycerol-3-phosphate	94.6 ± 1.8	5.4 ± 1.8	n.d.
Glycolic acid	64.5 ± 2	21.9 ± 3.3	13.6 ± 5.1
Homocystine	100 ± 0	n.d.	n.d.
Maltose	97.3 ± 0.9	2.7 ± 0.9	n.d.
Maltotriose	95.9 ± 1.9	4.1 ± 1.9	n.d.
Mannobiose	97.2 ± 1	2.7 ± 0.9	0.2 ± 0.1
Mannose-6-phosphate	100 ± 0	n.d.	n.d.
myo-Inositol-1-phosphate	87.6 ± 0.9	10.1 ± 1	2.3 ± 0.1
Myristic acid amide	n.d.	n.d.	n.d.
Oxalic acid	67.5 ± 1.6	20.3 ± 2.4	12.2 ± 2.1
Phloroglucinic acid	100 ± 0	n.d.	n.d.
Pyruvic acid	93.5 ± 2.2	6.5 ± 2.2	n.d.
Raffinose	96.2 ± 1.6	3.8 ± 1.6	n.d.
Ribono-1,4-lactone	95.2 ± 1.5	4.8 ± 1.5	n.d.
Ribose	96 ± 0.8	4 ± 0.8	n.d.
Saccharic acid	95.6 ± 0.8	4 ± 0.7	0.4 ± 0.1
Threonic acid	94.6 ± 0.4	4.8 ± 0.5	0.7 ± 0.1
Threonic acid-1,4-lactone	100 ± 0	n.d.	n.d.
trans-4-Caffeoylquinic acid	95.8 ± 1.3	4.2 ± 1.3	n.d.
trans-5-Caffeoylquinic acid	95.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	n.d.
Trehalose	96.4 ± 0.7	3.6 ± 0.7	n.d.
Tyramine	93 ± 1.7	6.2 ± 1.8	0.7 ± 0.1
U_Caffeoylquinic acid	97.3 ± 1.2	2.7 ± 1.2	n.d.
U_Erythritol	73.8 ± 8.9	25.5 ± 8.6	0.7 ± 0.4
U_Galactinol	96.3 ± 0.4	3.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1
U_Galactose	96.9 ± 0.3	3 ± 0.3	0.1 ± 0
U_Glucuronic acid-e-lactone	86.1 ± 1.3	10.9 ± 1.2	2.9 ± 0.4
U_Inositol	96.8 ± 0.5	3.2 ± 0.5	n.d.
U_Melibiose	96.4 ± 0.3	3.6 ± 0.3	n.d.
U_Sorbofuranose	93.5 ± 0.8	5.8 ± 0.8	0.8 ± 0
U_Sucrose	100 ± 0	n.d.	n.d.
U_Threonic acid	93.7 ± 2.7	6.3 ± 2.7	n.d.
alpha-Tocopherol	93.4 ± 0.3	5.9 ± 0.3	0.7 ± 0.1
beta-Sitosterol	92.1 ± 1.4	7.2 ± 1.3	0.7 ± 0.1
beta-Tocopherol	92.4 ± 1.5	7.6 ± 1.5	n.d.
Campesterol	92.1 ± 1.9	7.2 ± 1.6	0.8 ± 0.3
Cycloartenol	90.3 ± 0.5	9.7 ± 0.5	n.d.
Fucosterol	92.6 ± 1.4	6.7 ± 1.3	0.7 ± 0.1
gamma-Tocopherol	91 ± 2.2	7.4 ± 1.7	1.5 ± 0.9
Lupeol	91.1 ± 1.4	8.4 ± 1.5	0.5 ± 0.4
Stigmastan-3,5-diene	91.6 ± 1.7	8.4 ± 1.7	n.d.
Stigmasterol	91.9 ± 1.4	7.3 ± 1.2	0.8 ± 0.2
trans-Sinapyl alcohol	83.8 ± 1.6	11.5 ± 0.9	4.7 ± 0.8

Annexe II.6 : Chromatogramme de blanc d'extraction des lipides

Chromatogramme (TIC, *total ion current*) de blanc d'extraction des acides gras réalisé dans un micro-tube en plastique (A) ou dans un vial en verre (B).

A**B**

Annexe II.7 : Pourcentage de recouvrement lors de la récupération des FAMES

Pourcentage de recouvrement dans chaque fraction issue de trois extractions successives dans les différentes conditions. La valeur correspond à la moyenne des trois répétitions techniques \pm l'écart-type.

	25°C - 0h			25°C - 12h			4°C - 12h			90°C - 20min		
	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Arachidic	62.1 \pm 3.1	26.6 \pm 3.2	11.4 \pm 0.9	89.9 \pm 2.5	9.1 \pm 2	1 \pm 0.5	85.6 \pm 2.1	11.6 \pm 1.2	2.8 \pm 1.1	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Eliadic	77 \pm 4.6	17.6 \pm 4.4	5.4 \pm 0.6	95 \pm 1.8	4.8 \pm 1.7	0.2 \pm 0.3	92.8 \pm 1	6.2 \pm 0.6	1 \pm 0.4	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Heneicosanoic	60.5 \pm 2	27 \pm 2.6	12.5 \pm 0.8	90 \pm 2.2	10 \pm 2.2	n.d.	84.3 \pm 1.5	12.7 \pm 0.3	3 \pm 1.3	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Lignoceric	60.8 \pm 3	27.1 \pm 3	12.1 \pm 0.5	88.5 \pm 2.4	10.1 \pm 1.9	1.3 \pm 0.6	84.9 \pm 1.9	12.2 \pm 0.8	2.9 \pm 1.1	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Linoleic	68.2 \pm 2.8	23.4 \pm 1.8	8.4 \pm 1.7	90.7 \pm 2.6	8.4 \pm 2.1	0.9 \pm 0.5	86.7 \pm 2	11 \pm 1.4	2.2 \pm 0.9	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Oleic	76.3 \pm 2.7	18.4 \pm 2	5.3 \pm 1.2	93.2 \pm 2.2	6.2 \pm 1.8	0.6 \pm 0.4	90.1 \pm 1.5	8.4 \pm 1	1.5 \pm 0.6	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Palmitic	67.1 \pm 2.4	23.9 \pm 2.3	9 \pm 1.4	91.8 \pm 2.2	8.2 \pm 2.2	n.d.	86.8 \pm 1.9	11.1 \pm 1.1	2.1 \pm 0.9	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Palmitoleic	75.1 \pm 2.8	17.8 \pm 1.1	7.1 \pm 2.8	92.9 \pm 2.2	7.1 \pm 2.2	n.d.	88.4 \pm 2.6	11.6 \pm 2.6	n.d.	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Pentadecanoic	100 \pm 0	n.d.	n.d.	100 \pm 0	n.d.	n.d.	100 \pm 0	n.d.	n.d.	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Stearic	69.8 \pm 3.1	23 \pm 3.5	7.1 \pm 1.1	95.3 \pm 2.1	4.7 \pm 2.1	n.d.	91.8 \pm 1	8.2 \pm 1	n.d.	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Tricosanoic	60.6 \pm 2.8	27.1 \pm 2.6	12.3 \pm 0.8	88.3 \pm 2.5	10.2 \pm 2	1.4 \pm 0.7	84 \pm 1.8	12.8 \pm 0.5	3.2 \pm 1.3	100 \pm 0	n.d.	n.d.

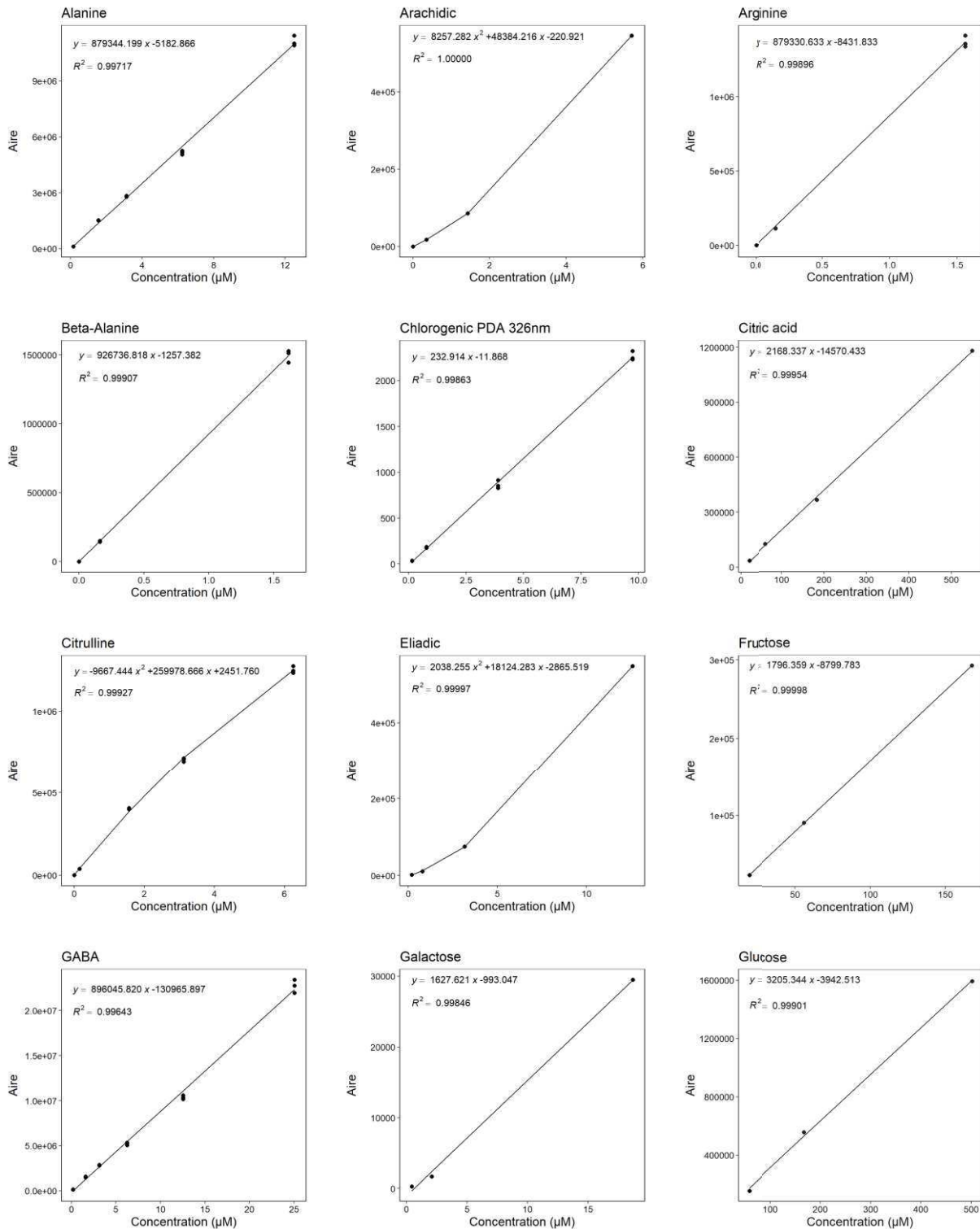
Annexe II.8 : Pourcentage de recouvrement lors de l'extraction des lipides

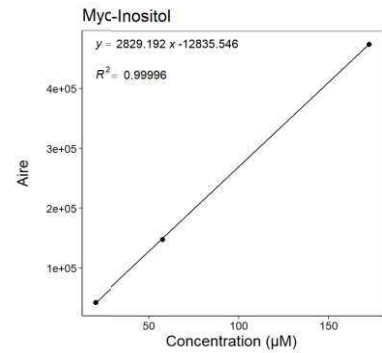
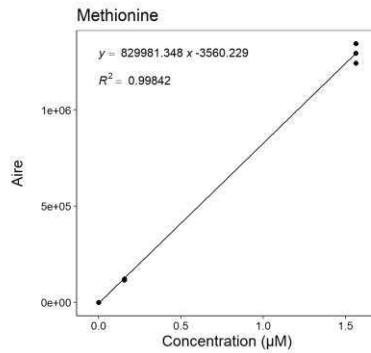
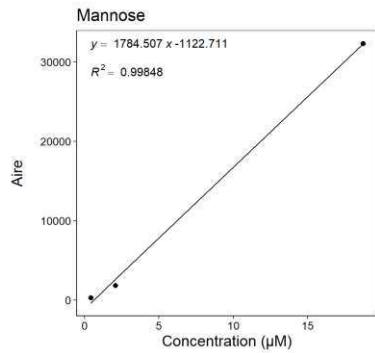
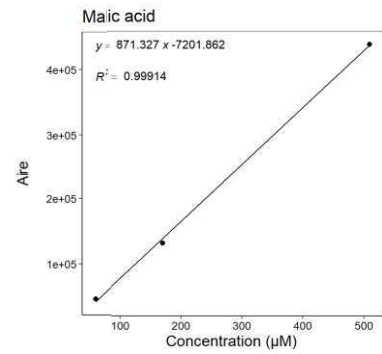
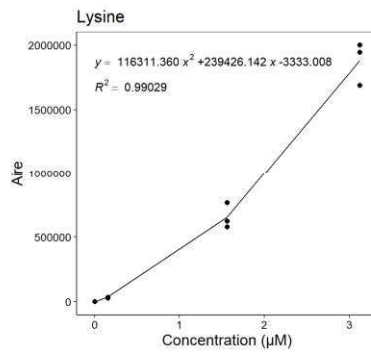
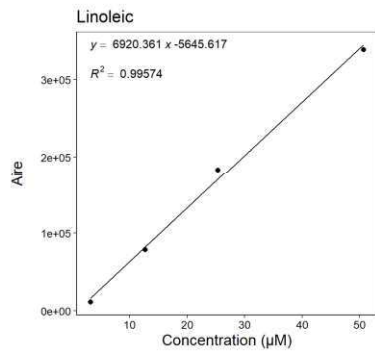
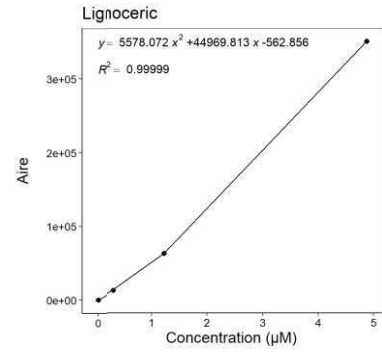
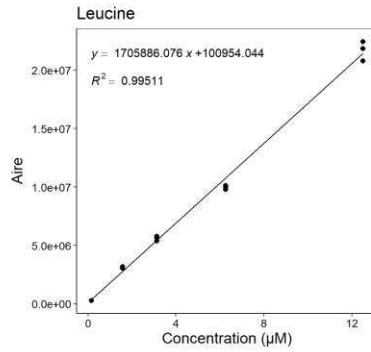
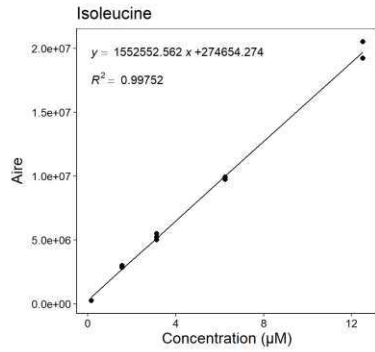
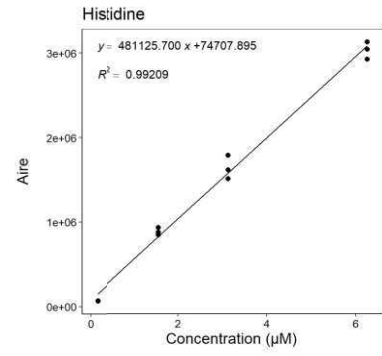
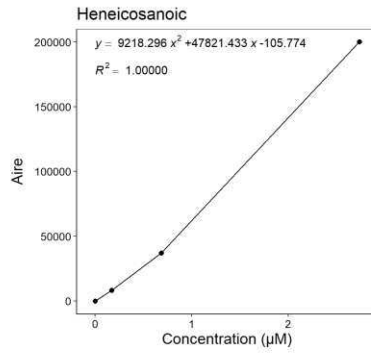
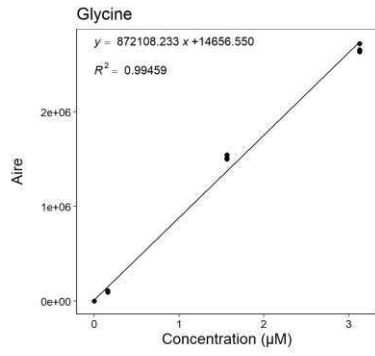
Pourcentage de recouvrement dans chaque fraction issue de trois extraction successives dans les conditions choisies. La valeur correspond à la moyenne des trois répétitions techniques \pm l'écart-type.

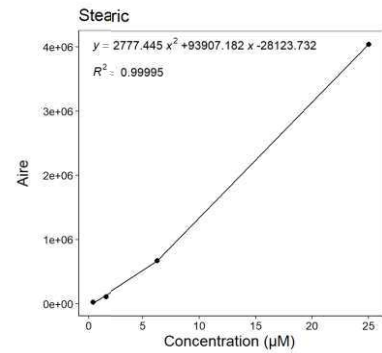
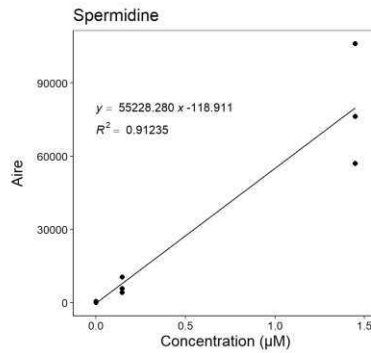
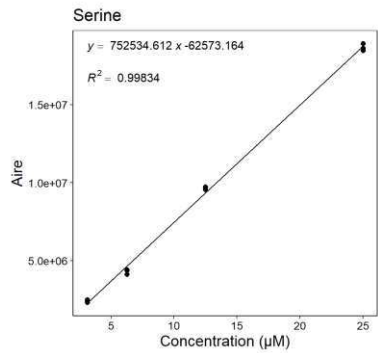
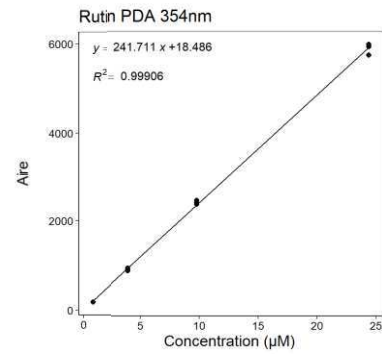
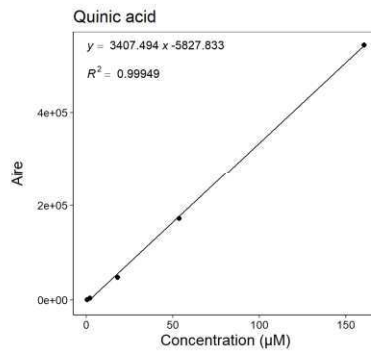
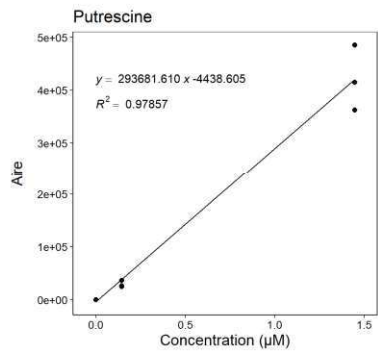
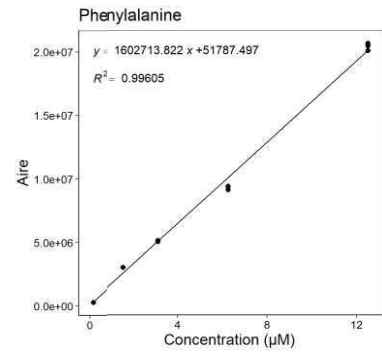
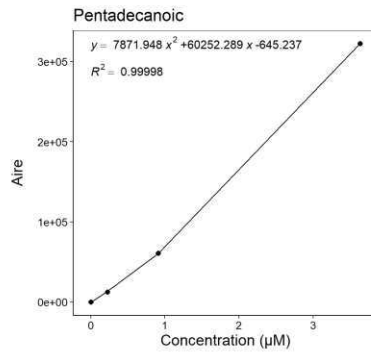
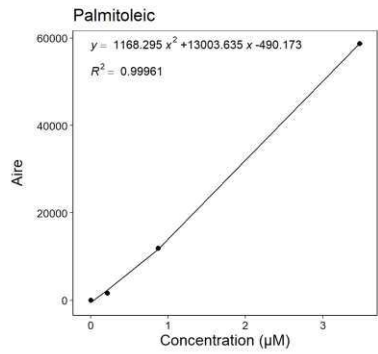
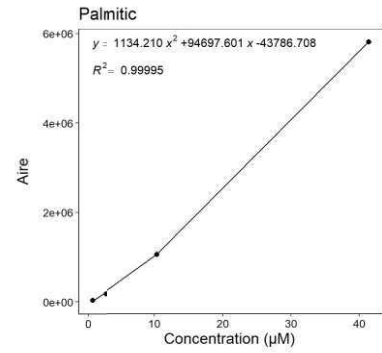
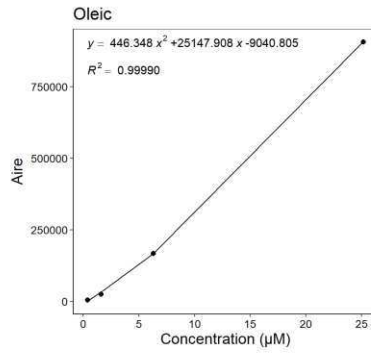
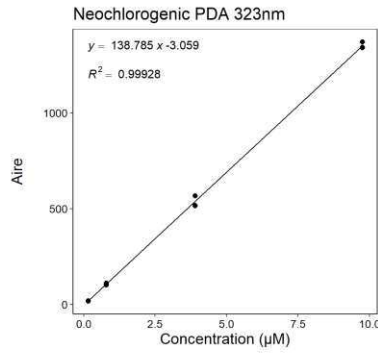
	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Arachidic	95.6 \pm 1.9	4.4 \pm 1.9	n.d.
Eliadic	97.9 \pm 1.3	1.9 \pm 1.3	0.2 \pm 0.1
Heneicosanoic	93.2 \pm 3.8	6.1 \pm 3.2	0.6 \pm 0.6
Lignoceric	81.4 \pm 11.1	17 \pm 9.7	1.7 \pm 1.5
Linoleic	96.8 \pm 1.6	3.1 \pm 1.6	0.1 \pm 0.1
Oleic	98.1 \pm 1.2	1.9 \pm 1.2	n.d.
Palmitic	96.9 \pm 1.7	3.1 \pm 1.7	n.d.
Palmitoleic	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Pentadecanoic	100 \pm 0	n.d.	n.d.
Stearic	97.7 \pm 1.6	2.3 \pm 1.6	n.d.
Tricosanoic	87.2 \pm 8.4	12.8 \pm 8.4	n.d.

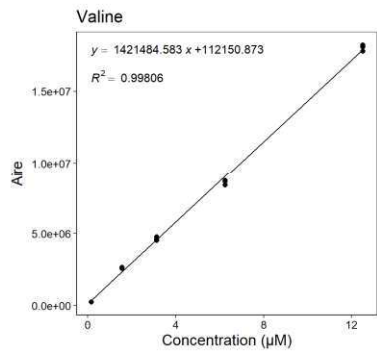
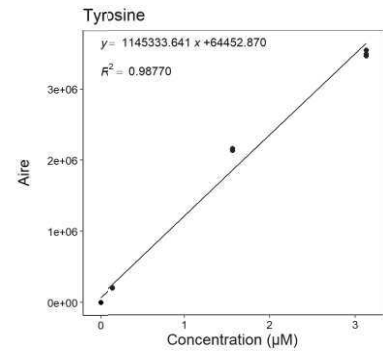
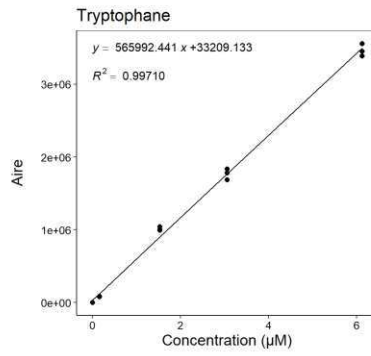
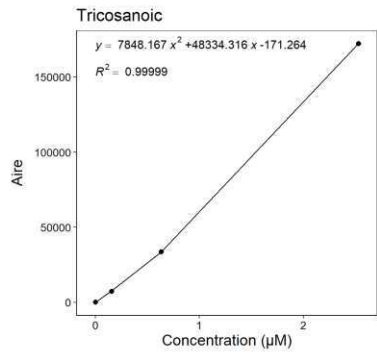
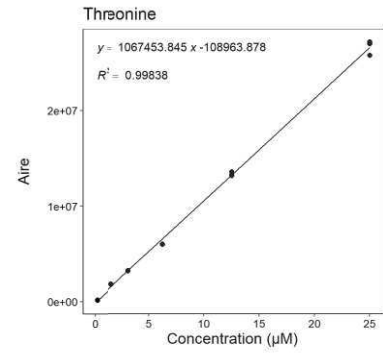
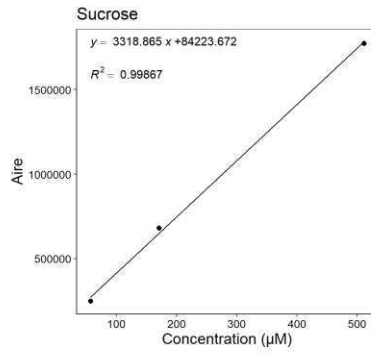
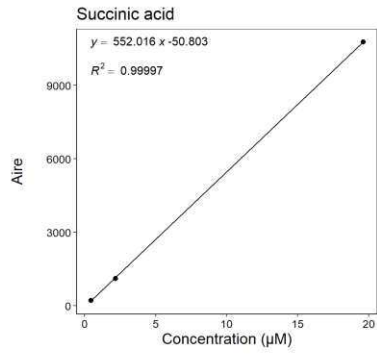
Annexe II.9 : Courbes de calibration externe

Courbes de calibration, centrée sur les échantillons, de chaque molécule quantifiée au sein d'une séquence analytique, avec l'équation de régression et le coefficient de détermination associée.









Chapitre III

Regulation of sugar metabolism
genes in the nitrogen-dependent
susceptibility of tomato stems to

Botrytis cinerea

Nathalie Lacrampe, Félicie Lopez-Lauri, Raphaël Lugan, Sophie Colombié,

Jérôme Olivares, Philippe C. Nicot and François Lecompte

Les résultats issus de l'analyse de l'expression des gènes du métabolisme des sucres ont été publiés dans le journal *Annals of Botany* en août 2020. Les figures supplémentaires se trouvent en Annexe III.

Contributions :

- Réalisation des expérimentations végétales (avec F. Lecompte et P. Nicot), réalisation des dosages biochimiques, mesure de l'expression de gènes (avec F. Lauri et J. Olivares) et analyse des résultats (avec F. Lecompte et F. Lauri)
- Rédaction du projet d'article complet et conception des figures (avec F. Lecompte et F. Lauri)
- Correction de l'article (avec l'ensemble des co-auteurs)

Regulation of sugar metabolism genes in the nitrogen-dependent susceptibility of tomato stems to *Botrytis cinerea*

Nathalie Lacrampe^{1,2}, Félicie Lopez-Lauri², Raphaël Lugan², Sophie Colombi  ³, Jérôme Olivares¹, Philippe C. Nicot⁴ and François Lecompte^{1,*}

¹PSH unit, INRAE, F-84914 Avignon, France, ²UMR Qualisud, Avignon Universit  , F-84916 Avignon, France, ³UMR 1332 BFP, INRAE, Univ Bordeaux, F-33883 Villenave d'Ornon, France and ⁴Plant pathology unit, INRAE, F-84140 Montfavet, France

*For correspondence. E-mail francois.lecompte.2@inrae.fr

Returned for revision: 3 July 2020 Editorial decision: 17 August 2020 Accepted: 24 August 2020 Electronically published: 27 August 2020

- **Background and Aims** The main soluble sugars are important components of plant defence against pathogens, but the underlying mechanisms are unclear. Upon infection by *Botrytis cinerea*, the activation of several sugar transporters, from both plant and fungus, illustrates the struggle for carbon resources. In sink tissues, the metabolic use of the sugars mobilized in the synthesis of defence compounds or antifungal barriers is not fully understood.
- **Methods** In this study, the nitrogen-dependent variation of tomato stem susceptibility to *B. cinerea* was used to examine, before and throughout the course of infection, the transcriptional activity of enzymes involved in sugar metabolism. Under different nitrate nutrition regimes, the expression of genes that encode the enzymes of sugar metabolism (invertases, sucrose synthases, hexokinases, fructokinases and phosphofructokinases) was determined and sugar contents were measured before inoculation and in asymptomatic tissues surrounding the lesions after inoculation.
- **Key Results** At high nitrogen availability, decreased susceptibility was associated with the overexpression of several genes 2 d after inoculation: sucrose synthases *SI-SUS1* and *SI-SUS3*, cell wall invertases *SI-LIN5* to *SI-LIN9* and some fructokinase and phosphofructokinase genes. By contrast, increased susceptibility corresponded to the early repression of several genes that encode cell wall invertase and sucrose synthase. The course of sugar contents was coherent with gene expression.
- **Conclusions** The activation of specific genes that encode sucrose synthase is required for enhanced defence. Since the overexpression of fructokinase is also associated with reduced susceptibility, it can be hypothesized that supplementary sucrose cleavage by sucrose synthases is dedicated to the production of cell wall components from UDP-glucose, or to the additional implication of fructose in the synthesis of antimicrobial compounds, or both.

Key words: *Botrytis cinerea*, fructokinase, hexokinase, invertase, nitrate, plant pathogen interaction, *Solanum lycopersicum* (tomato), sucrose synthase.

INTRODUCTION

The leaves of healthy plants synthesize carbohydrates through photosynthesis and they export sucrose, which is carried via the phloem and unloaded in sink tissues such as stems, roots or fruit via sucrose transporters (SWEET transporters) or plasmodesmata (Ruan, 2014). Once inside the parenchyma of sink tissues, the sucrose can enter the cells via transporters or be cleaved in the apoplast by cell wall invertases (EC 3.2.1.26) into glucose and fructose, which are then imported into the cytoplasm via hexose transporters (sugar transporter proteins). Cytosolic sucrose can be stored in vacuoles and eventually cleaved into glucose and fructose by a vacuolar invertase. Cytosolic sucrose can also be reversibly cleaved by sucrose synthases (EC 2.4.1.13), thus yielding fructose and UDP-glucose, the latter being a precursor of cell wall polysaccharides (Proels and H  ckelhoven, 2014; Stein and Granot, 2019). Glucose and fructose enter glycolysis after phosphorylation by hexokinases (EC 2.7.1.1) or fructokinases (EC 2.7.1.4). Hexokinases are the only known enzymes able to phosphorylate glucose, but they can

also phosphorylate fructose, though with lower affinity (Pego and Smeekens, 2000; Granot, 2007; Aguilera-Alvarado and Sanchez-Nieto, 2017; Stein and Granot, 2018). In the next step of glycolysis, glucose-6-phosphate is converted into fructose-6-phosphate, which is phosphorylated by phosphofructokinases (EC 2.7.1.11) into fructose-1,6-bisphosphate.

Most of the genes that encode these enzymes have already been described in tomato. *SI-LIN5* to *SI-LIN9* code for cell wall invertases, *SI-VI* codes for a vacuolar invertase and *SI-NI* for a mitochondrial invertase. *SI-SUS1* and *SI-SUS3* to *SI-SUS7* encode six sucrose synthase isozymes. Among the hexokinase genes *SI-HXK1* to *SI-HXK6*, three are located in the cytosol and associated with the mitochondrial membrane (*SI-HXK1* to *SI-HXK3*), one is plastidial (*SI-HXK4*) and two have not been located (*SI-HXK5* and *SI-HXK6*). Among the four fructokinases reported in the literature, three are cytosolic (*SI-FRK1*, *SI-FRK2* and *SI-FRK4*) and one is plastidial (*SI-FRK3*). In addition, eight putative phosphofructokinases have been identified in the tomato genome (*SI-PFK1* to *SI-PFK8*).

Host sugars play a central role in plant–pathogen interactions (Rojas *et al.*, 2014). The main soluble sugars, such as sucrose, glucose and fructose, are thought to be involved in both the production and the regulation of antifungal metabolites and the maintenance of cell homeostasis, and they can also be used as a substrate for pathogen growth (Morkunas and Ratajczak, 2014). During pathogen infection, host metabolism is substantially altered. The pathogen colonization of plant source tissues induces an inhibition of photosynthesis along with an activation of respiratory processes such as glycolysis, the TCA cycle and the mitochondrial electron transport chain, which are required for defence (Berger *et al.*, 2007; Kanwar and Jha, 2019). The host cell machinery is manipulated by many pathogens for nutrient release (Fatima and Senthil-Kumar, 2015; Oliva and Quibod, 2017). Biotic stresses have been found to increase cell wall invertase activity (Berger *et al.*, 2007; Bolton, 2009; Proels and Hüchelhoven, 2014) and to alter sucrose synthase at different levels: gene expression in leaf veins and syncytia (Hren *et al.*, 2009; Cabello *et al.*, 2014), the protein level in the phloem (Brzin *et al.*, 2011) and enzymatic activity in the wheat spikelet (Rios *et al.*, 2017).

Botrytis cinerea is a plant pathogenic fungus with a broad host range. Unlike biotrophs, necrotrophic pathogens such as *B. cinerea* kill host cells and feed on decayed tissues (Glazebrook, 2005). The metabolic adaptation of the host to infection by necrotrophic fungi has not fully been elucidated. An inhibition of photosynthesis activity measured using chlorophyll fluorescence was observed in tomato leaves infected by *B. cinerea* (Berger *et al.*, 2004). Gene transcripts linked to photosynthesis activity were also repressed in *Arabidopsis* leaves (Windram *et al.*, 2012), lettuce leaves (De Cremer *et al.*, 2013) and immature grape berries (Agudelo-Romero *et al.*, 2015). However, an increased photosynthetic rate was also observed in the area surrounding the infection site of tomato leaves (Berger *et al.*, 2004). In addition, sugar transport may undergo severe modification during *Botrytis* infection. In *Arabidopsis*, the pathogen was shown to hijack host sugar efflux systems by the direct induction of genes that encode SWEET transporters such as *At-SWEET4*, *At-SWEET7* and *At-SWEET15*, thus promoting pathogenesis (Chen *et al.*, 2010; Oliva and Quibod, 2017). However, genes that encode *At-STP4* and *At-STP13* sugar transporter proteins, causing sugar influx, may also be induced and play a role in plant defence (Fotopoulos *et al.*, 2003; Lemonnier *et al.*, 2014). The struggle for available sugars may involve the induction of cell wall invertases as well. Although the activity of invertase can be controlled at the post-translational level via their reaction products or inhibitory proteins (Fotopoulos, 2005), higher transcriptional activity of invertase genes was reported after a *Botrytis* infection. This was the case, for example, for *Sl-LIN6* in tomato (Berger *et al.*, 2004) and *At-βfruct1* in *Arabidopsis* (Fotopoulos *et al.*, 2003). Moreover, hexokinases are known to play a major role in defence, presumably as glucose sensors and regulators of gene expression (Rojas *et al.*, 2014; Aguilera-Alvarado and Sanchez-Nieto, 2017). The overexpression of two *At-HXK* genes in *Arabidopsis* increased resistance to necrotrophic fungi (Sarowar *et al.*, 2008).

The inhibition of photosynthetic mechanisms, along with the modulation of the enzymes implicated in carbohydrate

metabolism, may lead to a modification of sugar contents in infected tissues. In *Botrytis*-infected tomato leaves, sugar levels decreased with an increase in the hexose-to-sucrose ratio (Berger *et al.*, 2004, 2007; Camañes *et al.*, 2015). However, in grape berries the establishment of a pathogen-induced sink was reported, with an observed increase in fructose and glucose contents (Agudelo-Romero *et al.*, 2015). The balance between host and pathogen sugar utilization may define the outcome of the interaction. The manipulation of constitutive sugar equilibria through variations of host nitrogen nutrition in lettuce (Lecompte *et al.*, 2013) and tomato (Lecompte *et al.*, 2017) showed that the concentrations of sucrose and hexose relative to total sugar content were good markers of the plant's susceptibility to *B. cinerea* and lesion growth a few days after inoculation. Moreover, the differentiated course of glucose and fructose contents in tomato stems after infection suggested that fructose played a specific role in the defence process.

In the present work, we used the nitrogen-dependent variation of tomato stem susceptibility to *B. cinerea* to examine the transcriptional activity of selected enzymes – invertases, sucrose synthases, hexokinases, fructokinases and phosphofructokinases – before and throughout the course of infection.

MATERIALS AND METHODS

Plant production and nitrate treatments

Protocols similar to those previously described (Lecompte *et al.*, 2010, 2017) were used in this experiment. Plants were grown in a glasshouse from February to March 2018. Tomato seeds (*Solanum lycopersicum* 'Clodano'; Syngenta, Wilmington, DE, USA) were sown and the seedlings were transferred 10 d after germination onto 7 × 7 × 6 cm rock wool blocks. After three additional weeks, the plants (bearing three or four leaves) were placed on top of 2-L pots filled with a mixture (1:1 v/v) of vermiculite and pozzolana. From germination to the beginning of the nitrate treatment, the plants were fertigated twice a day with a standard commercial nutrient solution (Liquoplant Rose; Plantin, Courthézon, France). The nitrate treatments were started 7 weeks after germination. Four nutrient solutions were used, containing nitrate concentrations of 0.5, 2, 10 and 20 mM. It had been previously shown in similar experiments that 10 mM is the optimal concentration for growth, and that 20 mM corresponds to an excess of nitrogen supply, while 0.5 and 2 mM correspond to severe and mild nitrogen stress, respectively. In the solutions with lower nitrate concentrations, the equilibrium in electric charges was maintained by replacing nitrates (monovalent anions) with sulphates (divalent anions), up to 7.5 mM SO₄²⁻ in the solution containing the lowest nitrate concentration (0.5 mM NO₃⁻). This substitution is unlikely to have affected plant growth since tomato is known not to be affected by very high sulphate supply concentrations (Lopez *et al.*, 1996). The concentration of other major nutrient elements was kept constant, at the following levels: 10 mM K⁺, 3.5 mM Mg²⁺, 3.25 mM Ca²⁺ and 0.02 mM HPO₄²⁻. Micronutrients were present at the following concentrations (in μM): 0.5 B, 0.02 Cu²⁺, 8.2 Fe²⁺, 0.5 Mn²⁺, 0.01 MoO₄²⁻ and 0.1 Zn²⁺. The plants were fertigated using a

drip irrigation system (one dripper per pot) up to nine times a day depending on the climatic demand, with 2-min pulses. All plants received the same amount of water. The pH was adjusted to 6.0 in each treatment by adding H_3PO_4 .

Inoculation of leaf pruning wounds with conidia of *B. cinerea*

Botrytis cinerea strain BC1 was grown on plates containing potato dextrose agar medium (PDA; Difco, Detroit, MI, USA) in a growth chamber (18 °C night, 22 °C day and 14 h daylight). Conidia were collected in sterile ultra-pure water from the surface of 14-d-old cultures. Each suspension was filtered through a 30- μ m mesh sterile filter to remove mycelium fragments, and adjusted to a concentration of 10^7 conidia mL^{-1} with the help of a haemocytometer.

Thirty-five plants were used for each nitrate treatment, corresponding to seven batches of five biological replicates, sampled just before inoculation [0 d post-inoculation (DPI)], and at 2, 4 and 7 DPI (one batch of mock-inoculated and one batch of *Botrytis*-inoculated plants at each date). Inoculations were carried out in the morning (between 0900 and 1000 h, local time) on the petiole stubs (5–7 mm long) that remained on the stems after excision of the sixth leaf. The wounds received a 10- μ L aliquot of either the spore suspension (*Botrytis*-inoculated plants) or sterile water (mock-inoculated plants).

To foster disease development, the *Botrytis*- and mock-inoculated plants were placed in a randomized design in two growth chambers set at 21 °C day/18 °C night, 90 % relative humidity and 13 h of daylight [200 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ photosynthetic photon fluence rate (PPFR)]. During this period, the plants were fertigated manually twice a day until drainage, thus maintaining the nitrate treatments until the end of the experiment.

The disease was assessed by measuring the length of the lesion expanding on the stems on a daily basis. The area under the disease progress curve (AUDPC) was computed as: $AUDPC = [(Y_1/2) + \sum_{j=2}^{n-1} (Y_j + (Y_n/2))]I$, where Y_j was the observed lesion (in mm) at the j th observation time, n was the total number of observations, and I was the interval between each observation (in days, equal to 1 in our case).

Sample collection

Fragments of symptomless stem, 2 cm long, were collected on *Botrytis*-infected plants on each side of the lesions, ~1 cm from the lesion margins, at 2, 4 and 7 DPI. Similar positions on the stem (between the fifth and sixth internode) were sampled from intact plants at 0 DPI and from mock-inoculated plants at 2, 4 and 7 DPI. The collected samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Frozen stem tissues were ground into fine powder with liquid nitrogen using a mixer mill (MM301; Retsh, Haan, Germany) at a frequency of 30 Hz for 30 s. Powders were stored in airtight pillboxes at –80 °C until analysis.

The absence of RNA of fungal origin in the collected stem samples was verified by RT-qPCR as described below using a standard curve of *Botrytis* mRNA dilution in 100 ng μ L $^{-1}$ of tomato mRNA. The α -tubulin gene was used for quantification (Wu *et al.*, 2017).

Biochemical analyses of plant tissue

Soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) were extracted from 10 mg of powder using a 1-mL methanol/water mixture (1:1 v/v) and 300 μ L of chloroform under continuous agitation. After centrifugation, 800 μ L of the supernatant was evaporated under vacuum at room temperature. After the addition of 1.6 mL of ultrapure water and 10 mg of PVPP, the extracts were vortexed, centrifuged and purified using a C-18 cartridge (Sep-Pak; Waters, Milford, MA, USA) and a 0.2- μ m filter (Pall, NY, USA). The sugars were determined by HPLC using a Sugar-Pak II pre-column and a Sugar-Pak I 300 \times 6.5 mm column (Waters, Milford, MA, USA). Separation was carried out at 85 °C and a flow rate of 0.6 mL min^{-1} using 50 mg L^{-1} EDTA- Na_2Ca as eluent. The sugars were detected by measuring the refractive index with an RI Detector 410 (Waters, Milford, MA, USA), using Chromelon software (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sugar contents were expressed in grams per gram of dry weight, and relative glucose, fructose and sucrose contents (RGC, RFC and RSC, respectively) were calculated as the ratio of glucose, fructose and sucrose, respectively, to the total content of all three.

Gene expression analyses

The sequences of tomato genes involved in sucrose cleavage and sugar phosphorylation were obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). A total of 31 genes were identified in the tomato genome (Supplementary Data Table S1). Regarding phosphofructokinases, only predicted sequences were available, which were used to identify the corresponding genes in the tomato genome database using BLAST analyses (*Solanaceae* Genomics Network, www.solgenomics.net; Tomato Genome version SL4.0 and Annotation ITAG4.0). In order to verify their putative annotation, a protein sequence alignment was performed with the protein sequences of phosphofructokinase genes identified in other plants (Mustroph *et al.*, 2007), using the ClustalW method with default parameters, and a phylogenetic tree was constructed (Supplementary Data Fig. S1). It showed that all putative phosphofructokinases seemed valid and relevant to use.

Total RNA was isolated from 200 mg of frozen stem powder using the commercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). To avoid DNA contamination, a DNase treatment was carried out using the RNase-Free DNase set (Qiagen, Hilden, Germany) as described by the manufacturer. Total RNA was quantified by spectrophotometry and RNA integrity quality was verified by 1 % agarose gel electrophoresis.

Gene expressions were assessed by RT-qPCR. Total RNA (200 ng) was used for first-strand cDNA synthesis, using oligo-(dT)₁₅ primers and the Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Liège, Belgium) according to the manufacturer's instructions. qPCR amplification was performed in a 384-well plate using a CFX384 cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The Takyon No Rox SYBRCore Kit blue dTTP (Eurogentec, Liège, Belgium) was used with 1 μ L of cDNA and 250 nM of forward and reverse primers and the following programme was applied: 4 min at 95 °C followed by 60 cycles of 10 s at 95 °C and 1 min at 60 °C.

To confirm the specificity of the amplicon, each qPCR programme was followed by a melting curve assay. The specific primers of targeted genes are listed in [Supplementary Data Table S1](#). Each reaction was carried out in an independent technical triplicate and included a no-template control and a reagent-only control. Quantitation cycles (C_q) were defined based on the mean of the three replicates. The geometric mean of the expression level of actin (*ACT*) and cyclophilin (*CYP*) genes was used as an internal control (reference) to normalize the expression data for the target genes. The relative expression levels of target genes were calculated as fold changes in expression using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method: $2^{-[(C_{q(\text{target, sample})} - C_{q(\text{reference, sample})}) - (\text{mean}(C_{q(\text{target, calibrator})} - C_{q(\text{reference, calibrator})})])}$ (Livak and Schmittgen, 2001), where the mean C_q values corresponded to the mean of the five biological replicates. Results were \log_2 -transformed. To assess the effect of nitrate treatments before inoculation, gene expressions at 2, 10 and 20 mM NO_3^- were related to gene expressions at 0.5 mM NO_3^- . To assess the effect of infection, the gene expressions of *Botrytis*-inoculated plants were related to gene expressions of mock-inoculated plants on the same day under the respective nitrate treatments. Finally, to evaluate the change in gene expression over time, the gene expressions at 2, 4 and 7 d after inoculation were related to gene expressions before inoculation under the respective nitrate treatments.

Statistical analyses

The data presented are the averages of five biological replicates (each in technical triplicates) \pm standard error. The differences between treatments were analysed using a Kruskal–Wallis test followed by a Wilcoxon rank-sum test when necessary. All the statistical analyses were performed using R software.

RESULTS

Sufficient and over-optimal nitrate treatment increased fructose content and carbohydrate metabolism gene expressions before inoculation

Nitrogen availability affected the stem sugar contents before inoculation. The sucrose contents were higher, 0.046–0.048 g g^{-1} DW at 0.5 and 2 mM NO_3^- , compared with 0.038 g g^{-1} DW at 10 mM NO_3^- and 0.024 g g^{-1} DW at 20 mM NO_3^- . The glucose contents were around 0.062 g g^{-1} DW regardless of the nitrate treatment. The fructose contents were slightly lower, 0.0049–0.0054 g g^{-1} DW at 0.5 and 2 mM NO_3^- , compared with 0.0069–0.0072 g g^{-1} DW at 10 and 20 mM NO_3^- (Fig. 1A). For all nitrate treatments, the fructose contents were much lower than the sucrose and glucose contents. However, the relative fructose content (as defined in the Materials and methods section) increased with nitrogen availability, in parallel with a decrease in the relative sucrose content (Fig. 1B).

As the hexose-to-sucrose ratio was affected by nitrate treatments, we investigated the expression of genes that encode invertase, sucrose synthase, hexokinase, fructokinase and phosphofructokinase (Fig. 1C). Five among the 31 genes identified, namely *Sl-HXK6*, *Sl-FRK4*, *Sl-PFK3*, *Sl-PFK4* and

Sl-PFK7, were not expressed in the stems regardless of the condition. All invertase and sucrose synthase genes were found to be expressed in the stems. Before inoculation, most of the genes that encode sucrose cleavage enzymes (invertase and sucrose synthase) showed significantly different expression levels depending on the nitrate treatment, except for *Sl-SUS1*, *Sl-SUS4* and *Sl-NI* (Fig. 1C). Most of the relative expressions were higher at 10 and 20 mM NO_3^- . However, a threshold of ± 1.5 is usually recognized as the limit for the identification of differentiated expression, when using the $\log_2(2^{-\Delta\Delta C_q})$ relative value. Among all the genes examined, only the expression of *Sl-SUS3* at 20 mM NO_3^- reached a significantly higher mean value than this 1.5 threshold. As for the kinase-encoding genes, a similar trend of higher relative expression for plants grown at 10 and 20 mM NO_3^- was noted, but the differences were only significant for *Sl-HXK1* and *Sl-FRK3*.

Disease severity decreased with high relative fructose content before inoculation

Four weeks after the beginning of the nitrate treatments, the plants were inoculated with *B. cinerea* and incubated for 7 d. The petiole stubs were colonized and lesions developed on the stems within 72–96 h. The AUDPC was computed based on the measurement of lesion lengths between 4 and 7 DPI. As expected based on previous studies, nitrate treatments affected plant susceptibility ($P = 0.0003$, Fig. 2A) with a >3-fold difference in AUDPC for plants grown with 0.5 mM NO_3^- in the nutrient solution and those grown with 10 mM NO_3^- , and no difference between plants grown with 10 and 20 mM NO_3^- . We observed a tight curvilinear relationship between RFC before inoculation and AUDPC (Fig. 2B), while no significant results could be obtained when trying to fit various functions into the relationship between RSC and AUDPC, RGC and AUDPC, or plant nitrate content and AUDPC.

Susceptible plants accumulated fructose after the onset of the infection under low nitrate treatment

To ensure favourable incubation and regular disease development after leaf pruning, plants were transferred from a glasshouse to growth chambers, with adjustment of the air temperature, its relative humidity and the light intensity. Consequently, sugar metabolism was affected both in *Botrytis*-inoculated and mock-inoculated plants after this transfer (Fig. 3).

The sugar contents were analysed after confirmation by qPCR of the absence of *Botrytis* in asymptomatic regions of stems surrounding the lesions. We observed that nitrate treatments affected soluble sugar contents at all sampling dates after inoculation (Fig. 3). Under sufficient and over-optimal nitrate treatments (10 and 20 mM NO_3^-), no differences between *Botrytis* and mock-inoculated plants were observed. Fructose and glucose contents decreased between 0 and 7 DPI. Sucrose content dropped between 0 and 2 DPI, and remained roughly constant thereafter at 10 mM NO_3^- , while at 20 mM NO_3^- it remained constant between 0 and 4 DPI and slightly increased between 4 and 7 DPI. Contrasts between *Botrytis*-inoculated and mock-inoculated plants were much

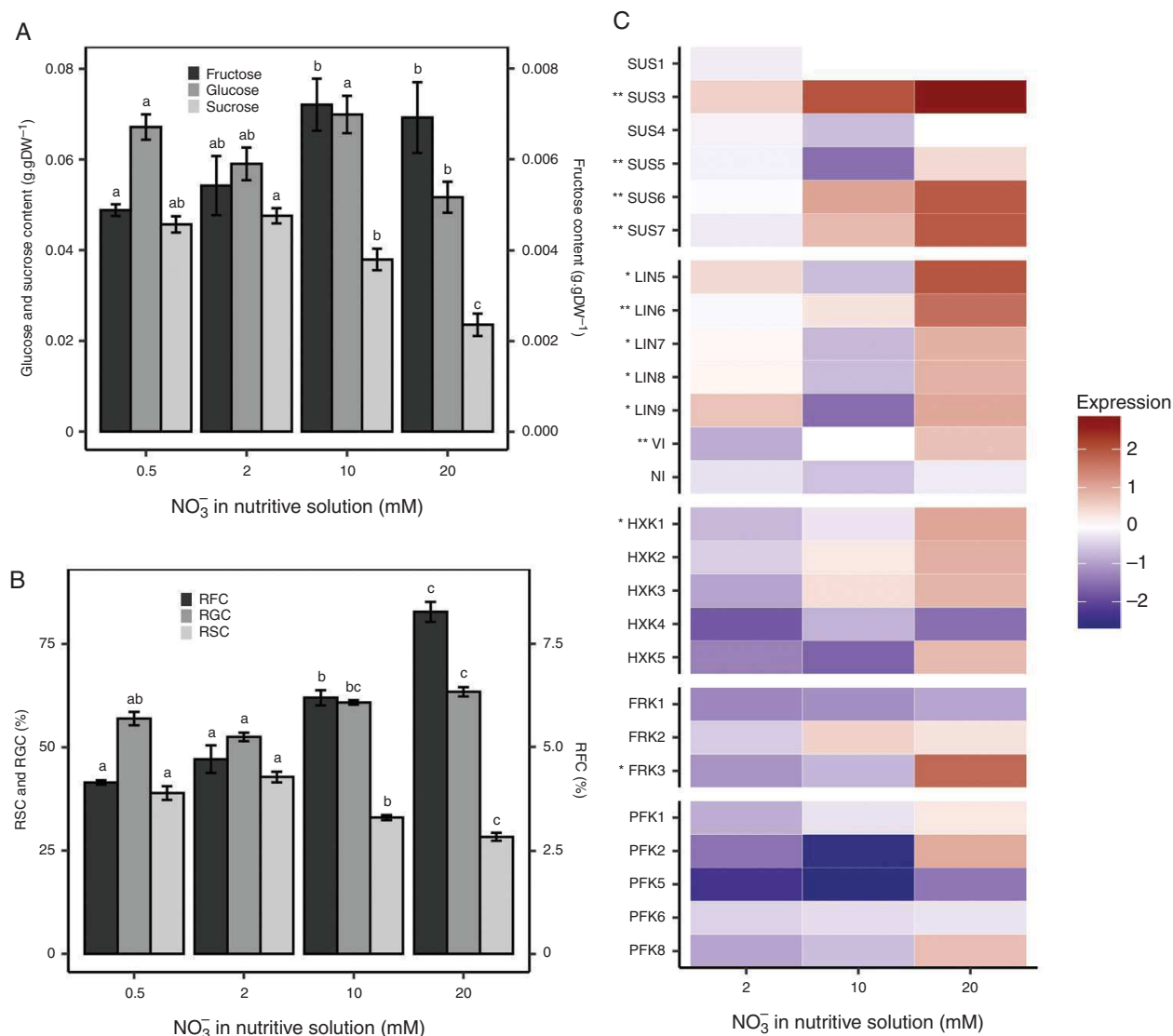


FIG. 1. Carbohydrate metabolism status of tomato stems according to nitrate treatment prior to inoculation. Sugar contents (A) and relative sugar contents (RSC, RGC and RFC for sucrose, glucose and fructose, respectively) (B) before inoculation are plotted according to nitrate treatment. Each bar is the mean \pm standard error of five observations, corresponding to five plants per nitrate treatment, one observation per plant. Different letters above columns indicate significant differences between nitrate treatments according to a Wilcoxon rank-sum test, one test per sugar. Relative gene expression (C) was calculated using the $\log_2(2^{-\Delta\Delta Cq})$ formula with *Sl-ACT* and *Sl-CYP* as a control for normalization. The mean of five observations (corresponding to five plants per nitrate treatment, one observation per plant) was computed. Asterisks next to gene names indicate level of significance according to nitrate treatment: **0.001 < P < 0.01, *0.01 < P < 0.05 (Kruskal–Wallis test).

more pronounced under low nitrate treatment. Fructose and glucose contents initially decreased after inoculation with *Botrytis*, but while glucose showed no significant change between 2 and 7 DPI, fructose started to accumulate between 2 and 4 DPI at 0.5 mM NO₃⁻, and 4 DPI at 2 mM NO₃⁻. An opposite pattern was observed in mock-inoculated plants, with an initial rise in glucose and fructose contents, followed by a decrease at 2 DPI. The sucrose content of infected plants started to drop at 4 DPI, while that of mock-inoculated plants started to decrease earlier, at 2 DPI. Thus, the major difference observed between infected and mock-inoculated plants was the accumulation of fructose in infected plants in the low nitrate treatments.

Botrytis infection affected the expression of genes that encode sucrose cleavage enzymes

The expression of genes involved in sugar metabolism after inoculation was examined. The expressions of sugar metabolism genes in *Botrytis*-inoculated plants relative to those of mock-inoculated plants measured on the same day (y axis) as well as the gene expressions of inoculated plants relative to those measured before inoculation (x axis) are plotted in Fig. 4 for sucrose-cleaving enzymes. The gene expressions that exceed the ± 1.5 threshold of $\Delta\Delta Cq$ are highlighted in Figs 4 and 5. Graphs that compare individual gene expressions under the four nitrate treatments and the related statistics are provided in Supplementary Data Fig. S2.

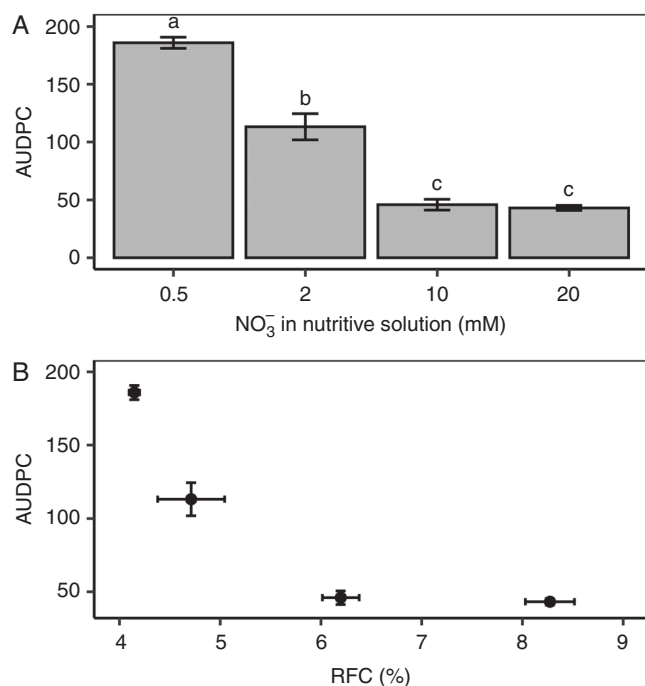


Fig. 2. Relationship between disease severity, nitrate treatment and carbohydrate metabolism. (A) Average values of area under the disease progress curve (AUDPC) on tomato stems under four nitrate treatments. Each bar is the mean \pm standard error of five observations (corresponding to five plants per nitrate treatment, one observation per plant). Different letters above columns indicate significant differences between nitrate treatments according to a Wilcoxon rank-sum test. (B) Relationship between the AUDPC and relative fructose content (RFC) of the tomato stem before inoculation. Each symbol corresponds to the mean \pm standard error of five observations (corresponding to five plants per nitrate treatment, one observation per plant).

The nitrate treatments strongly affected gene expressions after inoculation, especially at 2 DPI (Supplementary Data Fig. S2). Two groups of sucrose synthases may be distinguished. On the one hand, *Botrytis* inoculation stimulated the expression of *Sl-SUS1* and *Sl-SUS3* at 2 DPI, but the transcript levels (relative to those of mock-inoculated plants) were much higher for plants grown at 10 and 20 mM NO_3^- than for plants grown at lower nitrogen levels (Fig. 4, Supplementary Data Fig. S2A). When related to their levels of expression before inoculation, *Sl-SUS1* and *Sl-SUS3* were stimulated by the infection under all nitrate treatments, but more strongly under high nitrate treatment (Fig. 4). On the other hand, a second group of transcripts, corresponding to *Sl-SUS4* to *Sl-SUS7*, were lower at 0.5 and 2 mM NO_3^- relative to mock-inoculated plants, whereas no such repression was detected at higher NO_3^- concentrations. A similar contrast was observed for invertases. The relative expressions of *Sl-LIN5*, *Sl-LIN7*, *Sl-LIN8*, *Sl-LIN9* and *Sl-VI* were negative at 0.5 and 2 mM NO_3^- and positive at 10 and 20 mM NO_3^- (Fig. 4, Supplementary Data Fig. S2A). *Sl-LIN6* showed a particular pattern, since its relative expression was high regardless of the nitrate treatment, though it increased from 2.5 at 0.5 mM NO_3^- to 5 at 20 mM NO_3^- . The gene that encoded the Sl-NI mitochondrial invertase hardly showed any variation after inoculation, regardless of the nitrate treatment. The observed contrasts in relative expression according to nitrate treatment were attenuated at 4 and 7 DPI (Supplementary Data

Fig. S2B, C). Relative to mock-inoculated plants, *Sl-SUS1* and *Sl-SUS3* transcripts were higher under low nitrate treatments, especially at 7 DPI, while *Sl-SUS4* to *Sl-SUS7* were still repressed at 0.5 mM NO_3^- , and to a lesser extent at 2 mM NO_3^- (Supplementary Data Fig. S2C). The *Sl-LIN5*, *Sl-LIN7*, *Sl-LIN8* and *Sl-VI* invertases were still repressed, in comparison with mock-inoculated plants, at 4 DPI, but not at 7 DPI. By contrast, *Sl-LIN6* and *Sl-LIN9* were strongly expressed at 4 and 7 DPI, with higher transcript levels under low nitrate treatments. To summarize, *Sl-SUS1* and *Sl-SUS3* were activated upon infection and the early activation of these genes, as well as those that encode cell wall invertases, was associated with reduced susceptibility, while on the contrary the early repression of *Sl-SUS4* to *Sl-SUS7* and cell wall invertases, except for *Sl-LIN6*, was associated with increased susceptibility.

Botrytis infection affected hexose kinase gene expressions

Similarly to genes that encode sucrose cleavage enzymes, several genes that encode hexose kinases showed contrasted expressions 2 d after inoculation, depending on the nitrate treatment. *Sl-HXK1*, *Sl-FRK1* to *Sl-FRK3*, *Sl-PFK1* and to a lesser extent *Sl-HXK2* and *Sl-HXK5* showed enhanced expression at 10 and 20 mM NO_3^- relative to mock-inoculated plants (Fig. 5, Supplementary Data Fig. S2A). In contrast, *Sl-HXK5* and *Sl-FRK3* were repressed at 0.5 and 2 mM NO_3^- . The putative phosphofructokinase gene *Sl-PFK6* was strongly activated under all nitrate treatments relative to the expression in mock-inoculated plants and relative to its expression level before inoculation. Differences between nitrate treatments were much less pronounced at 4 DPI (Supplementary Data Fig. S2B), at which time the transcript levels of *Sl-HXK5*, *Sl-FRK1* to *Sl-FRK3*, *Sl-PFK1*, *Sl-PFK2*, *Sl-PFK5*, *Sl-PFK6* and *Sl-PFK8* were lower in *Botrytis*-inoculated plants in comparison with mock-inoculated ones regardless of the nitrate treatments. At 7 DPI, the relative expression of hexose kinases was very low, regardless of the nitrate treatments. Thus, the condition of reduced susceptibility was associated with activation of all fructokinase genes, along with *Sl-HXK1*, *Sl-HXK2* and *Sl-HXK5* hexokinases and the *Sl-PFK1* phosphofructokinase. Conversely, the condition of enhanced susceptibility was associated with repression of *Sl-HXK5* and *Sl-FRK3*.

DISCUSSION

In the present work, we used contrasted nitrate treatments to examine the sugar metabolism associated with the increased resistance or susceptibility of tomato stems to *B. cinerea*. We analysed the content of soluble sugars (sucrose, glucose and fructose) and the expression of genes involved in the catabolism of sucrose and the first phosphorylating steps of glycolysis. The metabolites and transcript levels were quantified in symptomless stem tissues surrounding *Botrytis* lesions. Stems are sink tissues for which little is known regarding the relationship between sugars and the response to infection. The particularity of sink tissues lies in the activity of sucrose synthase, generally not detected in source tissues (Wind et al., 2010). Among the 31 genes for invertases, sucrose synthases, hexokinases, fructokinases and phosphofructokinases

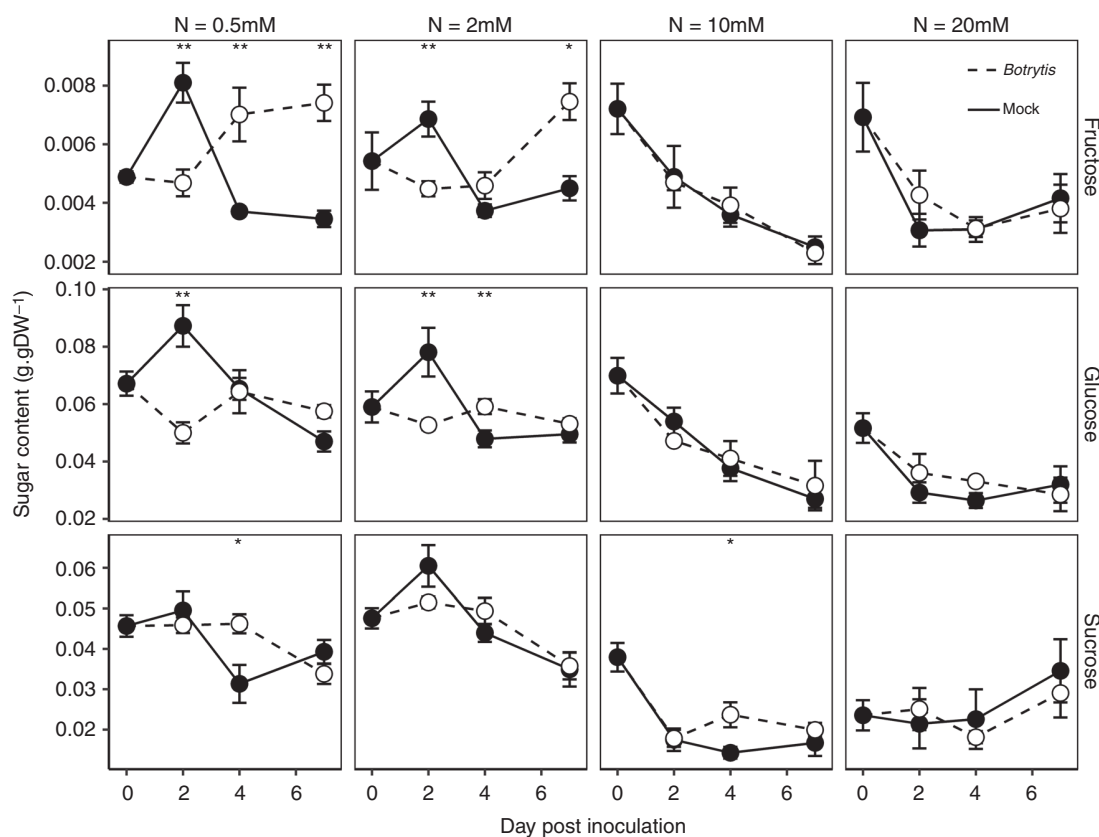


FIG. 3. Course of sugar contents after *Botrytis* inoculation in fungus-free tomato stems. Each symbol is the mean \pm standard error of five observations (corresponding to five plants per nitrate treatment, one observation per plant). Asterisks indicate levels of significance of the difference in *Botrytis*-inoculated plants compared with mock-inoculated plants with the same combination of nitrate treatment \times day of measurement: **0.001 < P < 0.01, *0.01 < P < 0.05 (Kruskal–Wallis test).—

analysed in this work (Supplementary Data Table S1), we detected the expression of 26 genes. All sucrose synthase and invertase genes are expressed in tomato stems, *Sl-SUS1*, *Sl-SUS3*, *Sl-SUS5*, *Sl-LIN8* and *Sl-VI* being the most abundant isoforms, according to Hyun *et al.* (2011) and Qin *et al.* (2016). Fructokinase genes *Sl-FRK1* to *Sl-FRK3* are expressed in all vascular tissues, unlike *Sl-FRK4*, which is specific to anthers and pollen (German *et al.*, 2002; Granot *et al.*, 2013; Stein *et al.*, 2018) and accordingly was not detected in this study. We did not record transcripts of the *Sl-HXK6* hexokinase gene and of the *Sl-PFK3*, *Sl-PFK4* and *Sl-PFK7* putative phosphofructokinase genes; it can be hypothesized that these genes are not expressed in tomato stems. The main objective of gene expression analysis was to compare the transcriptional activity of wounded and mock-inoculated plants with wounded and *Botrytis*-inoculated plants, under various nitrate treatments. Knowing that the expression levels of the genes studied are not quantitatively linked to their enzymatic activity (Keurentjes *et al.*, 2008) and that the metabolic transformation of sugars relies on multiple reversible reactions, the relationship between gene expression and sugar content observed in this work may only indicate a qualitative defence response induced by the various nitrate treatments. Moreover, a leaf was cut off in order to carry out both the mock inoculation and the *Botrytis* inoculation. In a study on *Arabidopsis*, a modification in the expression of the *AtC/NIF2* gene, which

encodes a cell wall invertase inhibitor, was measured with a mock-inoculation corresponding to an infiltration of 10 mM MgCl_2 (Bonfig *et al.*, 2010). This may indicate the possible effect of wounding on invertase activity unrelated to the pathogen infection. For all these reasons, the gene expression levels of *Botrytis*-inoculated plants presented here were expressed relative to those of mock-inoculated plants.

We initially analysed the effect of nitrate treatments on constitutive gene expressions and sugar contents before inoculation. These treatments mostly affected sucrose content, which was twice as high at 0.5 and 2 mM NO_3^- compared with 20 mM NO_3^- . In the tomato cultivar used in this work, the fructose content was much lower than the glucose content, and slightly lower under low nitrate treatments. Other studies have described higher sucrose and total reducing sugar contents in sink tissues under nitrogen stress (Cazetta *et al.*, 1999; Krapp *et al.*, 2011). Most probably, sucrose (and starch) accumulation may be linked to reduced growth at low nitrogen levels. Accordingly, in this study we found that several, but not all, isoforms of cell-wall invertases and sucrose synthases showed reduced expression levels under low nitrate treatments. A reduced activity of invertases at low nitrogen availability has been shown in cassava leaves (Cruz *et al.*, 2003) and maize kernels (Cazetta *et al.*, 1999).

Many reports, regularly reviewed in the past decade, have emphasized the role of host sugars and related enzymes in

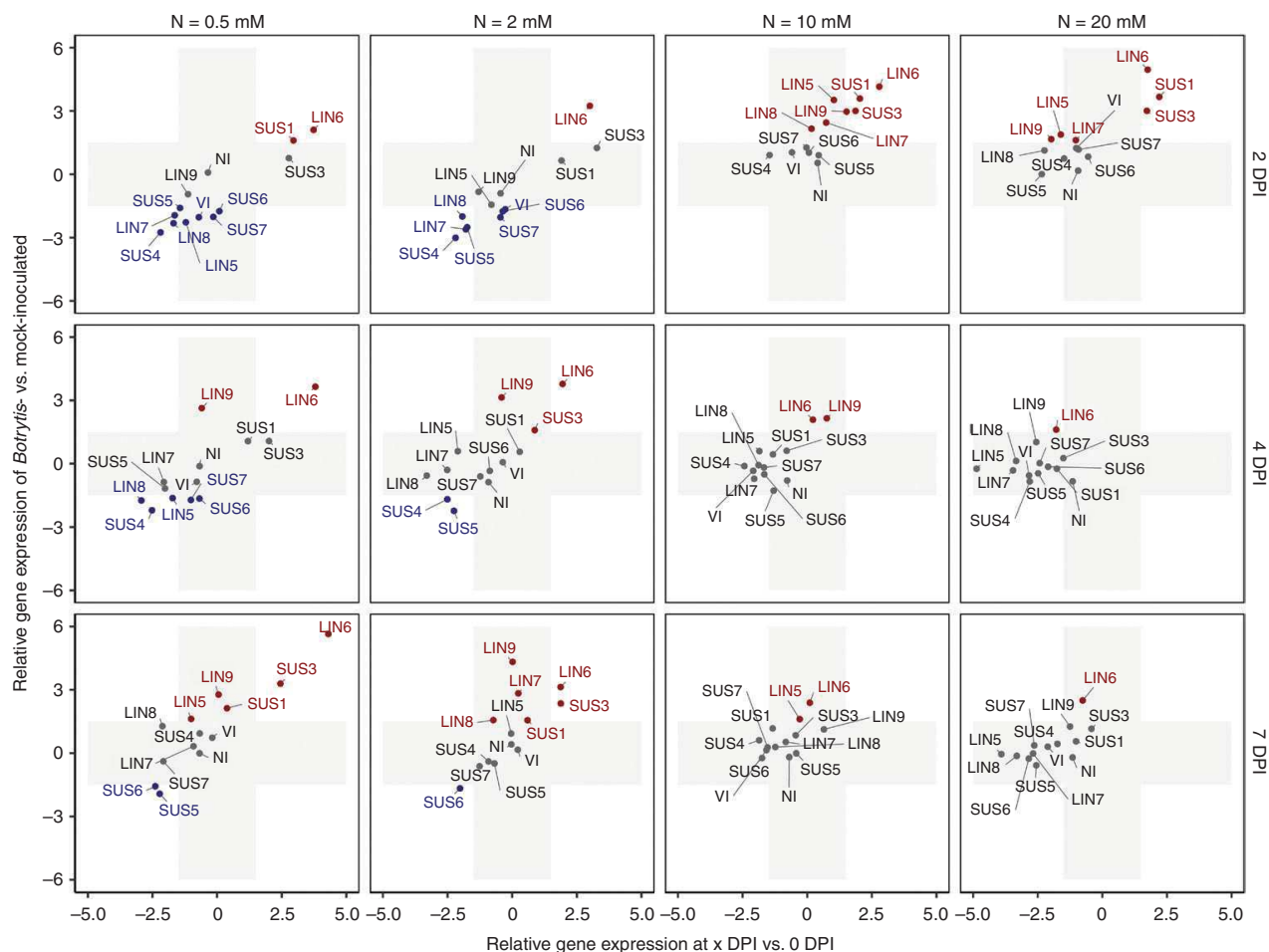


Fig. 4. Changes in expression of genes that encode sucrose cleavage enzymes after *Botrytis* inoculation. The x-axis represents the fold change in gene expression of *Botrytis*-inoculated plants at 2, 4 or 7 DPI compared with plants before inoculation. The y-axis represents the fold change in gene expression of *Botrytis*-inoculated plants compared with mock-inoculated plants with the same combination of nitrate treatment \times day of measurement. The grey area represents zones under the threshold level of significance, fixed at a 1.5-fold change. Genes in grey type show no difference in expression between *Botrytis*- and mock-inoculated plants, genes in red type are overexpressed and genes in blue type are underexpressed.

plant–pathogen interactions (Bolton, 2009; Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012; Tauzin and Giardina, 2014; Kanwar and Jha, 2019). The plant's nitrogen status is known to affect disease incidence and development in multiple ways (Fagard et al., 2014), and nitrogen nutrition has already proved to be a modulator of *Botrytis* susceptibility in tomato leaves and fruit (Vega et al., 2015) as well as stems (Lecompte et al., 2017). Plant infection by pathogens is known to induce a massive reprogramming of the host cell machinery from growth to defence. This takes place via the inhibition of photosynthesis at infection sites in photosynthetic tissues, and the coincident activation of sugar transporters and sucrose-cleaving enzymes, the modulation of carbohydrate metabolism and hexose-to-sucrose ratio, and the production of end products of hexose metabolism, e.g. cell wall compounds (Bellincampi et al., 2014), hormones (Beyers et al., 2014) and antimicrobial compounds (Tiku, 2018). It has been suggested that high levels of soluble sugars in the host generally favour plant resistance to pathogens (Morkunas and Ratajczak, 2014). Accordingly, in one study by Hoffland et al. (1999) tomato leaf susceptibility to *B. cinerea* was positively

correlated with the soluble carbohydrate content. However, this was not the case in lettuce leaves (Lecompte et al., 2013), and tomato stems, as shown in the present study and in previous work (Lecompte et al., 2017). The effect of elevated nitrate treatments on reduced tomato stem susceptibility to *B. cinerea* is not correlated, whether positively or negatively, with the total content of soluble sugars. Instead, a strong and robust correlation between stem susceptibility and the constitutive relative fructose content has been shown in previous studies (Lecompte et al., 2017) and in the present one. In this study we have observed an early accumulation of hexoses in mock-inoculated plants grown under low nitrate treatments. By contrast, a rise in fructose content was observed later (between 2 and 4 DPI) in infected plants under low nitrate treatments. Regarding mock-inoculated plants, the observed hexose accumulation may have been due to leaf pruning and the environmental changes associated with the transfer of plants into the growth chamber. However, nitrogen nutrition interfered with the response, since no hexose accumulation was observed under high nitrate treatments. Regarding *Botrytis*-inoculated plants, under low nitrate

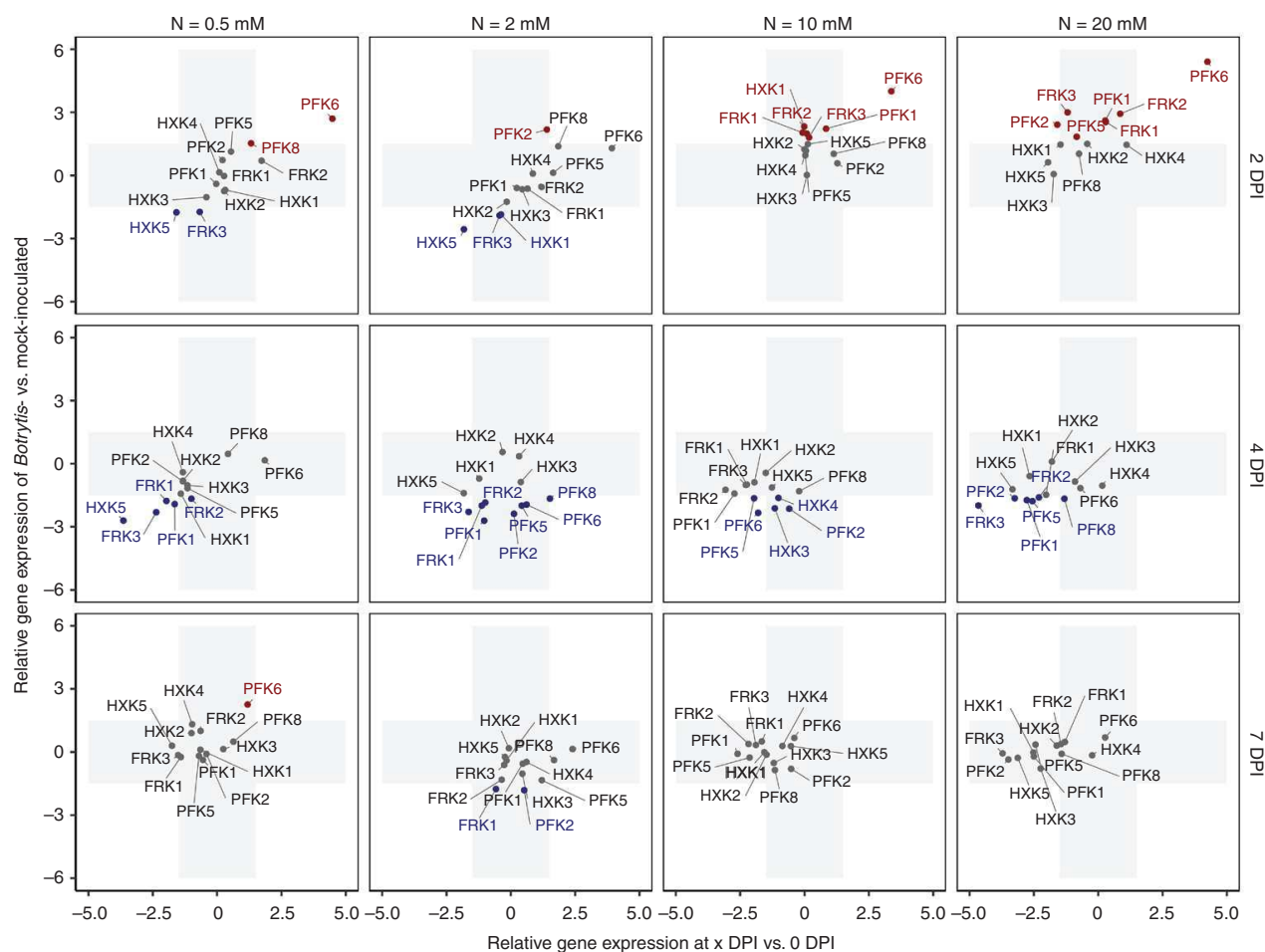


FIG. 5. Changes in expression of hexose kinase genes during *Botrytis* infection. The x-axis represents the fold change in gene expression of *Botrytis*-inoculated plants at 2, 4 or 7 DPI compared with plants before inoculation. The y-axis represents the fold change in gene expression of *Botrytis*-inoculated plants compared with mock-inoculated plants with the same combination of nitrate treatment \times day of measurement. The grey area represents zones under the threshold level of significance, fixed at a 1.5-fold change. Genes in grey type show no difference in expression between *Botrytis*- and mock-inoculated plants, genes in red type are overexpressed and genes in blue type are underexpressed.

treatments the late accumulation of fructose might be related to the lower expression of hexokinases and fructokinases observed. Thus, under low nitrate treatments less fructose might be involved in the glycolysis and further synthesis of defence compounds. However, since the measurements were performed in tissues neighbouring the lesions, it could also be hypothesized that hexoses were not used in these asymptomatic cells but rather remobilized in sucrose and then transported to the infection site. Studying the host sugar dynamics in tissues colonized with fungal mycelium is complex, since the retrieval of host sugars by the pathogen must be estimated using specific labelling techniques (Dulermo *et al.*, 2009).

In the present work, the inoculation of *B. cinerea* triggered high and early transcription of all isoforms of invertases, as well as *Sl-SUS1* and *Sl-SUS3*, under the nitrate treatments that provided 10 and 20 mM NO_3^- in the nutrient solution, and this transcriptional activity was associated with phenotypes with reduced susceptibility. By contrast, more susceptible plants displayed repressed expressions of *Sl-SUS4* to *Sl-SUS7* and of some invertase isoform genes under low nitrate treatments.

Interestingly, nitrogen availability affected the constitutive expression of *Sl-SUS3* before and after infection, while the overexpression of *Sl-SUS1* was only observable after infection. *Sl-SUS3* expression in healthy tomato plants is mostly associated with vascular tissues, and changes according to stem maturity (Goren *et al.*, 2011). In our work, the overexpression, before infection, of *Sl-SUS3* at sufficient (10 mM) and over-optimal (20 mM) nitrogen availability could correspond to the higher stem volumes observed in these treatments. However, the overexpression of *Sl-SUS1* is dependent on both infection and high nitrogen availability. Here we highlight the conditional involvement of some specific isoforms of sucrose synthases in a successful defence.

The *Sl-LIN6* invertase was overexpressed in all nitrate treatments during the course of infection. In leaves of tomato and *Arabidopsis* infected by *B. cinerea*, *Sl-LIN6* (Berger *et al.*, 2004) and *At-CWIN1* (Veillet *et al.*, 2016) invertases are activated. In addition, increased apoplastic hexose uptake and upregulation of several sugar transporter genes have been observed after infection by *B. cinerea* (Lemonnier *et al.*, 2014; Veillet *et al.*,

2017; Bezruczyk *et al.*, 2018). The internalization of sugars may participate in ‘pathogen starvation’, a defence mechanism that potentially limits the availability of apoplastic sugar for the pathogen (Bezruczyk *et al.*, 2018). However, in this work increased expression of genes that encode sucrose synthases, which have a cytosolic activity, was observed after inoculation. This strengthens the hypothesis of higher recruitment of hexoses by the host tissues. Oppositely, the downregulation of some invertases in susceptible plants may facilitate the maintenance of elevated apoplastic sucrose availability, in favour of the pathogen.

Less susceptible plants observed in this work upregulated the transcription of sugar metabolism genes 2 d after inoculation. Several studies have already highlighted the importance of the early-stage response for increased resistance (Hyun *et al.*, 2011; Birkenbihl *et al.*, 2012; De Cremer *et al.*, 2013). In this work, susceptible plants showed delayed expressions of *Sl-SUS1*, *Sl-SUS3*, *Sl-LIN8* and *Sl-LIN9* along with the continuous repression of several *Sl-SUS4* to *Sl-SUS7* isoforms throughout the course of infection. This repression of sucrose cleavage enzymes was associated with poorly effective defence. It originated from the low nitrogen status of the host, but whether the fungus is able to manipulate this expression in a nitrogen-dependent manner remains to be examined.

Hexokinases are known to be involved in plant–pathogen interaction (Morkunas and Ratajczak, 2014; Rojas *et al.*, 2014), but fructokinase and phosphofructokinase gene expression after infection by a necrotrophic fungus has not been described thoroughly in the literature. Here, more susceptible plants showed repressed fructokinase transcript levels in comparison with mock-inoculated plants, while more resistant plants under sufficient and over-optimal nitrate treatments showed higher levels of transcripts of *Sl-FRK1* to *Sl-FRK3* early after inoculation. In accordance with lower fructokinase transcript levels, higher levels of fructose content were observed at low nitrogen availability, thus suggesting lower mobilization of fructose for glycolysis. A similar accumulation of fructose in tomato stems after infection at low nitrogen availability has already been observed in another tomato cultivar (Lecompte *et al.*, 2017).

Recent work on metabolomics and transcriptomics highlighted cell wall reinforcement with callose, and lignins, as a successful strategy against *B. cinerea* (Asselbergh *et al.*, 2007; Curvers *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2018). Sucrose synthase cleaves sucrose into fructose and UDP-glucose, the latter being presumed to trigger cell wall reinforcement. The early expression of fructokinase genes in resistant plants observed in this study suggests that the activity of sucrose synthase may not be limited to cell wall reinforcement, unless fructose catabolism in glycolysis is a fortuitous consequence of defence activation. However, other work suggests that glycolysis and subsequent pathways are useful for defence (Agudelo-Romero *et al.*, 2015; Camañes *et al.*, 2015; AbuQamar *et al.*, 2016). On the one hand, GS/GOGAT (glutamine synthetase/glutamine oxaloglutarate aminotransferase) activity and the assimilation of nitrogen may control, in addition to sugar regulation, the maintenance of cell homeostasis against pathogenic fungi (Seifi *et al.*, 2013). On the other hand, the pentose phosphate pathway supports the synthesis of precursors of

phenylpropanoid compounds that are synthesized in response to *B. cinerea* (Ma *et al.*, 2018). Thus, supplementary fructose synthesis from sucrose synthase activity, followed by its phosphorylation and entry into glycolysis, may be needed for increased resistance in sink tissues.

In conclusion, this study shows that the increased resistance of the tomato stem to *B. cinerea* is supported by early activation of genes that encode sucrose cleavage enzymes: invertases and sucrose synthases. This is only observed in conditions of sufficient or over-optimal nitrogen availability. By contrast, in conditions of low nitrogen availability early repression of several sucrose synthase and invertase genes is observed after infection. The cytosolic activity of sucrose synthase associated with the enhanced expression of hexokinases and fructokinases in resistant plants supports the hypothesis of increased synthesis of cell wall components and/or the recruitment of additional fructose in glycolysis and subsequent pathways for an effective defence.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <https://academic.oup.com/aob> and consist of the following. Table S1: sequence of *Solanum lycopersicum* primers used in this study. Figure S1: phylogenetic tree of hexose kinases in the tomato and phosphofructokinases in plants. Figure S2: relative expression of carbohydrate metabolism genes at 2 (A), 4 (B) and 7 (C) DPI.

FUNDING

This study was conducted with the financial support of the European Regional Development Fund, the French government, the Sud Provence-Alpes-Côte d’Azur Region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon. N.L. was supported by a PhD fellowship of the Federative Research Structure Tersys.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. Bancel, F. De Bruyne, C. Troulet, M. Duffaud, C. Cassan and Y. Gibon for their expert technical assistance.

LITERATURE CITED

- AbuQamar SF, Moustafa K, Tran L-SP. 2016. ‘Omics’ and plant responses to *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* 7: 1–8.
- Agudelo-Romero P, Erban A, Rego C, *et al.* 2015. Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 66: 1769–1785.
- Aguilera-Alvarado GP, Sanchez-Nieto S. 2017. Plant hexokinases are multifaceted proteins. *Plant and Cell Physiology* 58: 1151–1160.
- Asselbergh B, Curvers K, França SC, *et al.* 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* 144: 1863–1877.
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–8.

- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T. 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* **122**: 419–428.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4019–4026.
- Beyers T, Vos C, Aerts R, et al. 2014. Resistance against *Botrytis cinerea* in smooth leaf pruning wounds of tomato does not depend on major disease signalling pathways. *Plant Pathology* **63**: 165–173.
- Bezruczyk M, Yang J, Eom JS, et al. 2018. Sugar flux and signaling in plant-microbe interactions. *Plant Journal* **93**: 675–685.
- Birkenbihl RP, Diezel C, Somssich IE. 2012. *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiology* **159**: 266–285.
- Bolouri Moghaddam MR, Van den Ende W. 2012. Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3989–3998.
- Bolton MD. 2009. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 487–497.
- Bonfig KB, Gabler A, Simon UK, et al. 2010. Post-translational derepression of invertase activity in source leaves via down-regulation of invertase inhibitor expression is part of the plant defense response. *Molecular Plant* **3**: 1037–1048.
- Brzin J, Petrovič N, Ravnikar M, Kovač M. 2011. Induction of sucrose synthase in the phloem of phytoplasma infected maize. *Biologia Plantarum* **55**: 711–715.
- Cabello S, Lorenz C, Crespo S, et al. 2014. Altered sucrose synthase and invertase expression affects the local and systemic sugar metabolism of nematode-infected *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 201–212.
- Camañes G, Scalschi L, Vicedo B, González-Bosch C, García-Agustín P. 2015. An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum*, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* **84**: 125–139.
- Cazetta JO, Seebauer JR, Below FE. 1999. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. *Annals of Botany* **84**: 747–754.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, et al. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532.
- De Cremer K, Mathys J, Vos C, et al. 2013. RNAseq-based transcriptome analysis of *Lactuca sativa* infected by the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Plant, Cell and Environment* **36**: 1992–2007.
- Cruz JL, Mosquim PR, Pelacani CR, Araújo WL, DaMatta FM. 2003. Carbon partitioning and assimilation as affected by nitrogen deficiency in cassava. *Photosynthetica* **41**: 201–207.
- Curvers K, Seifi H, Mouille G, et al. 2010. Abscisic acid deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **154**: 847–860.
- Dulermo T, Rasclé C, Chinnici G, Gout E, Bligny R, Cotton P. 2009. Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: from plant hexoses to mannitol. *New Phytologist* **183**: 1149–1162.
- Fagard M, Launay A, Clément G, et al. 2014. Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany* **65**: 5643–5656.
- Fatima U, Senthil-Kumar M. 2015. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–12.
- Fotopoulos V. 2005. Plant invertases: structure, function and regulation. *Journal of Biological Research* **4**: 127–137.
- Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, et al. 2003. The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atβfruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* **132**: 821–829.
- German MA, Dai N, Chmelintsky I, et al. 2002. LeFRK4, a novel tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fructokinase specifically expressed in stamens. *Plant Science* **163**: 607–613.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- Goren S, Huber SC, Granot D. 2011. Comparison of a novel tomato sucrose synthase, *SISUS4*, with previously described *SISUS* isoforms reveals distinct sequence features and differential expression patterns in association with stem maturation. *Planta* **233**: 1011–1023.
- Granot D. 2007. Role of tomato hexose kinases. *Functional Plant Biology* **34**: 564–570.
- Granot D, David-Schwartz R, Kelly G. 2013. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–17.
- Hoffland E, Van Beusichem ML, Jeger MJ. 1999. Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil* **210**: 263–272.
- Hren M, Ravnikar M, Brzin J, et al. 2009. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology* **58**: 170–180.
- Hyun TK, Eom SH, Rim Y, Kim J. 2011. Alteration of the expression and activation of tomato invertases during *Botrytis cinerea* infection. *Plant Omics* **4**: 413–417.
- Kanwar P, Jha G. 2019. Alterations in plant sugar metabolism: signatory of pathogen attack. *Planta* **249**: 305–318.
- Keurentjes JJB, Sulpice R, Gibon Y, et al. 2008. Integrative analyses of genetic variation in enzyme activities of primary carbohydrate metabolism reveal distinct modes of regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology* **9**: 1–20.
- Krapp A, Berthomé R, Orsel M, et al. 2011. *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiology* **157**: 1255–1282.
- Lecompte F, Abro MA, Nicot PC. 2010. Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology* **59**: 891–899.
- Lecompte F, Abro MA, Nicot PC. 2013. Can plant sugars mediate the effect of nitrogen fertilization on lettuce susceptibility to two necrotrophic pathogens: *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*? *Plant and Soil* **369**: 387–401.
- Lecompte F, Nicot PC, Ripoll J, et al. 2017. Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Annals of Botany* **119**: 931–943.
- Lemonnier P, Gaillard C, Veillet F, et al. 2014. Expression of *Arabidopsis* sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology* **85**: 473–484.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lopez J, Tremblay N, Voogt W, Dubé S, Gosselin A. 1996. Effects of varying sulphate concentrations on growth, physiology and yield of the greenhouse tomato. *Scientia Horticulturae* **67**: 207–217.
- Ma L, He J, Liu H, Zhou H. 2018. The phenylpropanoid pathway affects apple fruit resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **166**: 206–215.
- Morkunas I, Ratajczak L. 2014. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**: 1607–1619.
- Mustroph A, Sonnewald U, Biemelt S. 2007. Characterisation of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **581**: 2401–2410.
- Oliva R, Quibod IL. 2017. Immunity and starvation: new opportunities to elevate disease resistance in crops. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 84–91.
- Pego JV, Smeekens SCM. 2000. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends in Plant Science* **5**: 531–536.
- Proels RK, Hückelhoven R. 2014. Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses. *Molecular Plant Pathology* **15**: 858–864.
- Qin G, Zhu Z, Wang W, et al. 2016. A tomato vacuolar invertase inhibitor mediates sucrose metabolism and influences fruit ripening. *Plant Physiology* **172**: 1596–1611.
- Rios JA, Rios VS, Aucique-Pérez CE, et al. 2017. Alteration of photosynthetic performance and source-sink relationships in wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Plant Pathology* **66**: 1496–1507.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore KS. 2014. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–12.
- Ruan Y-L. 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 33–67.
- Sarowar S, Lee JY, Ahn ER, Pai HS. 2008. A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. *Journal of Plant Biology* **51**: 341–346.
- Seifi HS, Van Bockhaven J, Angenon G, Höfte M. 2013. Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe? *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 475–485.

- Stein O, Granot D. 2018.** Plant fructokinases: evolutionary, developmental, and metabolic aspects in sink tissues. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–12.
- Stein O, Granot D. 2019.** An overview of sucrose synthases in plants. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1–14.
- Stein O, Secchi F, German MA, et al. 2018.** The tomato cytosolic fructokinase FRK1 is important for phloem fiber development. *Biologia Plantarum* **62**: 353–361.
- Tauzin AS, Giardina T. 2014.** Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–8.
- Tiku AR. 2018.** Antimicrobial compounds and their role in plant defense. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* **13**: 283–307.
- Vega A, Canessa P, Hoppe G, et al. 2015.** Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–17.
- Veillet F, Gaillard C, Coutos-Thévenot P, La Camera S. 2016.** Targeting the *AtCWIN1* gene to explore the role of invertases in sucrose transport in roots and during *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–20.
- Veillet F, Gaillard C, Lemonnier P, Coutos-Thévenot P, La Camera S. 2017.** The molecular dialogue between *Arabidopsis thaliana* and the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* leads to major changes in host carbon metabolism. *Scientific Reports* **7**: 1–13.
- Wind J, Smeekens S, Hanson J. 2010.** Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* **71**: 1610–1614.
- Windram O, Madhou P, McHattie S, et al. 2012.** *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell* **24**: 3530–3557.
- Wu X, Yang H, Ren H, et al. 2017.** Selection of reliable reference genes for gene expression studies in *Botrytis cinerea*. *Journal of Microbiological Methods* **142**: 71–75.
- Yang C, Liang Y, Qiu D, Zeng H, Yuan J, Yang X. 2018.** Lignin metabolism involves *Botrytis cinerea* BcGs1-induced defense response in tomato. *BMC Plant Biology* **18**: 1–15.

Annexe III – Supplementary data

Table S1: sequence of *Solanum lycopersicum* primers used in this study.

Gene	Accession no.	Locus Symbol	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Prod. Length (pb)
ACT	NM_001321306.1	Solyc03g078400	TGTCCTATTACGAGGGTTATGC	AGTTAAATCAGCACCAGCAAGAT	73
CyP	NM_001247559.1	Solyc01g111170	CGTCGTGTTGGACAAGTTG	CCGCAGTCAGCAATAACCA	108
SUS1	NM_001247726.2	Solyc12g009300	CTGCTGAGTGAATGAAGTCT	GATACTAAATGGAAATGAACAC	100
SUS3	NM_001313910.1	Solyc07g042550	GGTTTCTGTCTGATTGTTATCC	ACAGAAGGAAAAATGGCAAA	109
SUS4	NM_001333183.1	Solyc09g098590	AACGTGGAGCATACCACCTCT	CAGCATATTGGATCAGTATTG	183
SUS5	XM_004243632.4	Solyc07g042520	GGCCTAAATTCATTTGGTAATTC	GTGCTGAAAATTTTCATCTGGAC	169
SUS6	XM_004235340.4	Solyc03g098290	CTTGCCAGTTGCACCATTAG	GTAGCTTGCTTCGCGATTTC	186
SUS7	XM_004232624.4	Solyc02g081300	CAGCAGTGGCTGTGCTTTTC	CCATGCTCGTGCAGTAAAC	103
LIN5	NM_001247864.1	Solyc09g010080	CTGAATGCTTGGAGCATGGAT	GAGGGATTTTGTGAACATCATCTACTG	140
LIN6	NM_001246913.2	Solyc10g083290	AGCACATTTATCGCCTTCAACAA	CTTTGTGACGTGGCATAAAGAT	125
LIN7	NM_001247772.1	Solyc09g010090	GAACGGAGCCAAATCACAATG	TCCCCCTTTTACCATAGTTCCTT	114
LIN8	NM_001324396.1	Solyc10g083300	AGTCATTGAATGCATGGAGCAT	GAGCAATCAAATACGTACCACAA	121
LIN9	NM_001247140.1	Solyc08g079080	ACTGGGTCAACCAACGAATC	TGCCCTCATACTTGATCCAT	97
VI	NM_001247914.2	Solyc03g083910	TCCTTCCCTTTTGAAGACTTGT	TCTCCCTTTCCTTTTCTTGATG	102
NI	XM_010320928.3	Solyc01g058010	GCCTCTTGATGGAAGGAATGGT	CCAGAATCAACAGGTGCAACAC	93
HXK1	NM_001247028.1	Solyc03g121070	TCGGCACCAGCTTTGATCC	CGACTCCACCCTGCACTTTC	159
HXK2	NM_001247477.2	Solyc06g066440	TTGGCGTGCCTCCTC	AGTTCCATAAATTTCTTGCACCTTT	223
HXK3	NM_001247781.2	Solyc12g008510	TGGGAGTGGGAAAAGTTG	ACGCTTTCTTCCACCCA	268
HXK4	NM_001247788.2	Solyc04g081400	TGTAGCAATGGATGGAGCTT	GCCTCTATAAATCCAATCATCAATCCT	295
HXK5	XM_004231915.4	Solyc02g091830	AGTGGGACTCATCCTTGTG	TCGTTTACTGCTTGTGGCT	217
HXK6	XM_010314953.3	Solyc11g065220	TACAAACACCACCCCTT	AGCTCACTGTTTTCTTCTCCTC	214
FRK1	NM_001246964.2	Solyc03g006860	TCTGGCATCTGTGGTCGGT	CTACCCATTTTTCCCTGATGCTC	76
FRK2	NM_001246959.2	Solyc06g073190	GCAATCCCAGCTTTGCCTAC	TGATGATGTAAGGAGAAAGTTACAAGG	254
FRK3	NM_001247467.2	Solyc02g091490	GTCGTCGTCGGCTAGTCTTT	GGGAAAATAGTAGCAGCGGAGA	95
FRK4	NM_001247277.2	Solyc10g017620	CATGGAAGAGTGAAGTGGCGT	TATCCACATGATTTTGTACAGGGATAG	368
PFK1	XM_004235135.4	Solyc03g093520	ATTCACCTCCCGCAGACA	TGATCCAAGGTTGAGCGATT	109
PFK2	XM_004236651.4	Solyc04g014270	ACGTGTCGATCTCCTCA	GCGGCAGCATTTTTCGGTT	250
PFK3	XM_004236594.4	Solyc04g015200	GGGTTCTGTTGTGGACCGA	GAGGAGGACAGAGAAAGCCA	191
PFK4	XM_004238461.3	Solyc04g072580	TTCATGGGATCATTGGTTGATGTT	CTAGGAATGTAATCAGACAAAATGAGGAAC	117
PFK5	XM_004243552.4	Solyc07g045160	GAGGCTTATGTCCCCTGCTC	TGTTCCACCCTGTTTATGGA	176
PFK6	XM_004245088.4	Solyc08g066100	CATAAGCGACAGCACTCACAAG	AGCAACACCTCCACAACATAGAA	229
PFK7	XM_004250088.4	Solyc11g010450	GTCAGATCCTCCAAACGCACA	CGTATTATGAGTGGTATTATTCTTCGTCAA	188
PFK8	XM_004253054.4	Solyc12g095880	CCAGATGAAGGTGGTGAAGGAG	GAAATGCACCCCTCTGGGAC	208

Figure S1: Phylogenetic tree of hexose kinases in the tomato and phosphofructokinases in plants. Sequence similarities of tomato protein sequences and 34 phosphofructokinase protein sequences from different plants were calculated using ClustalW method with default parameters.

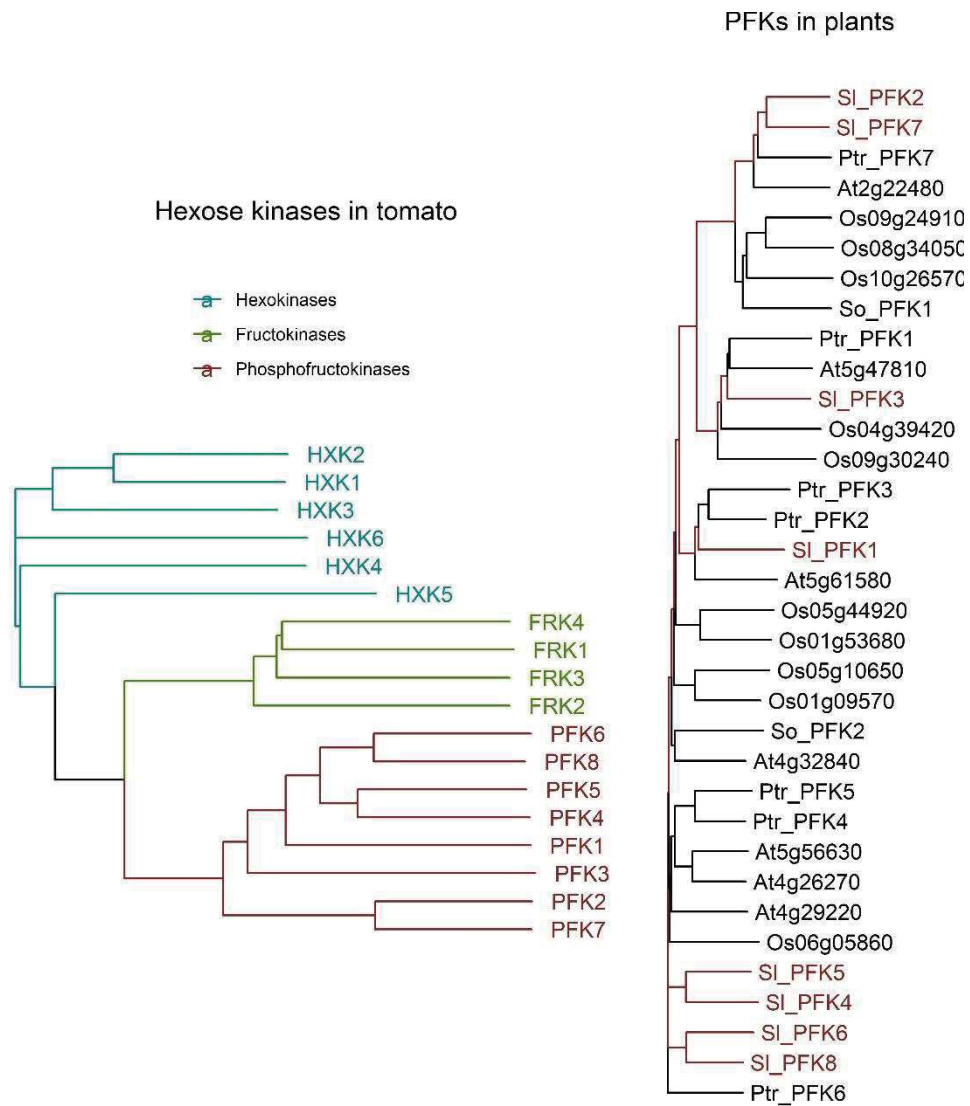
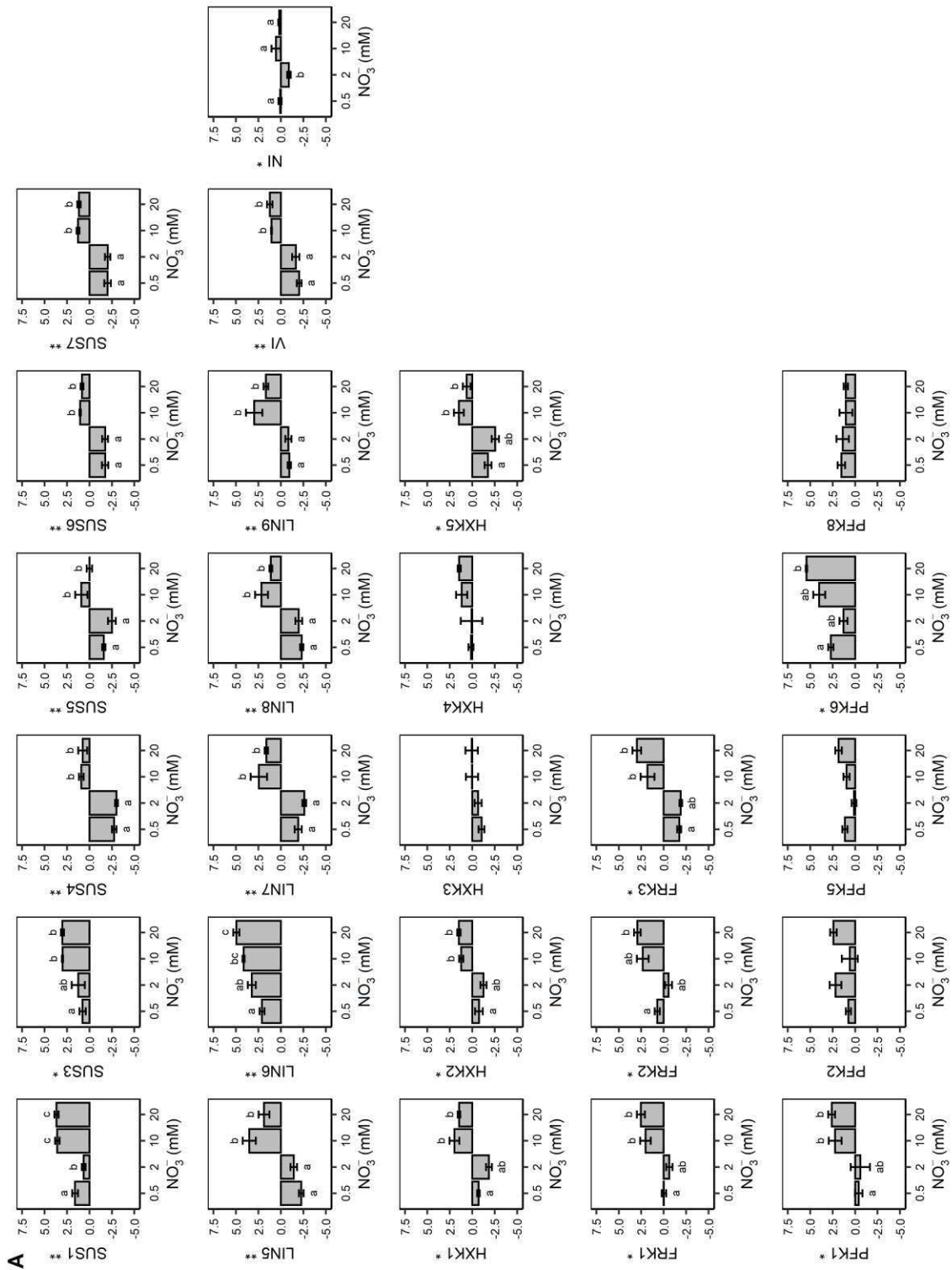
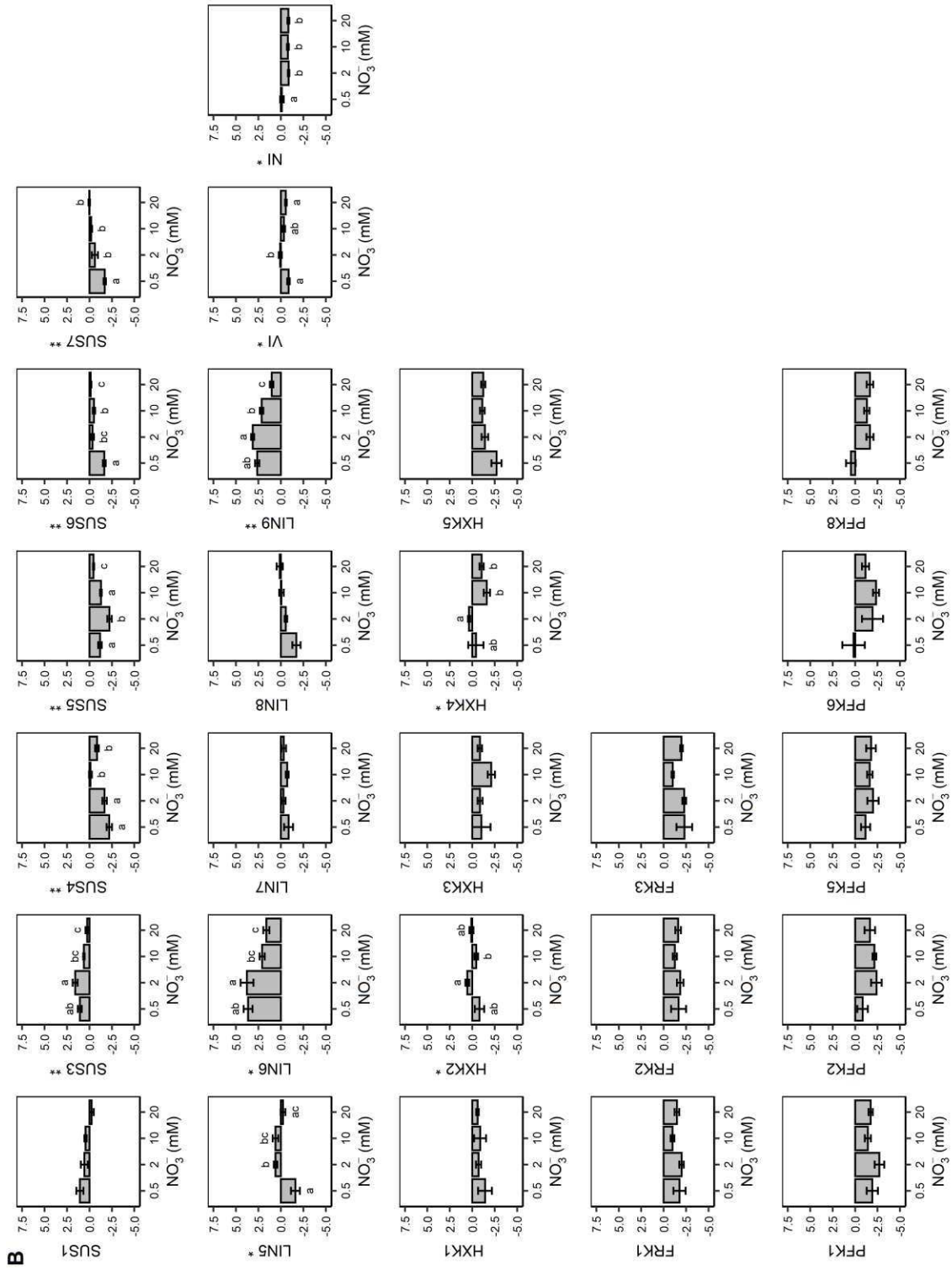
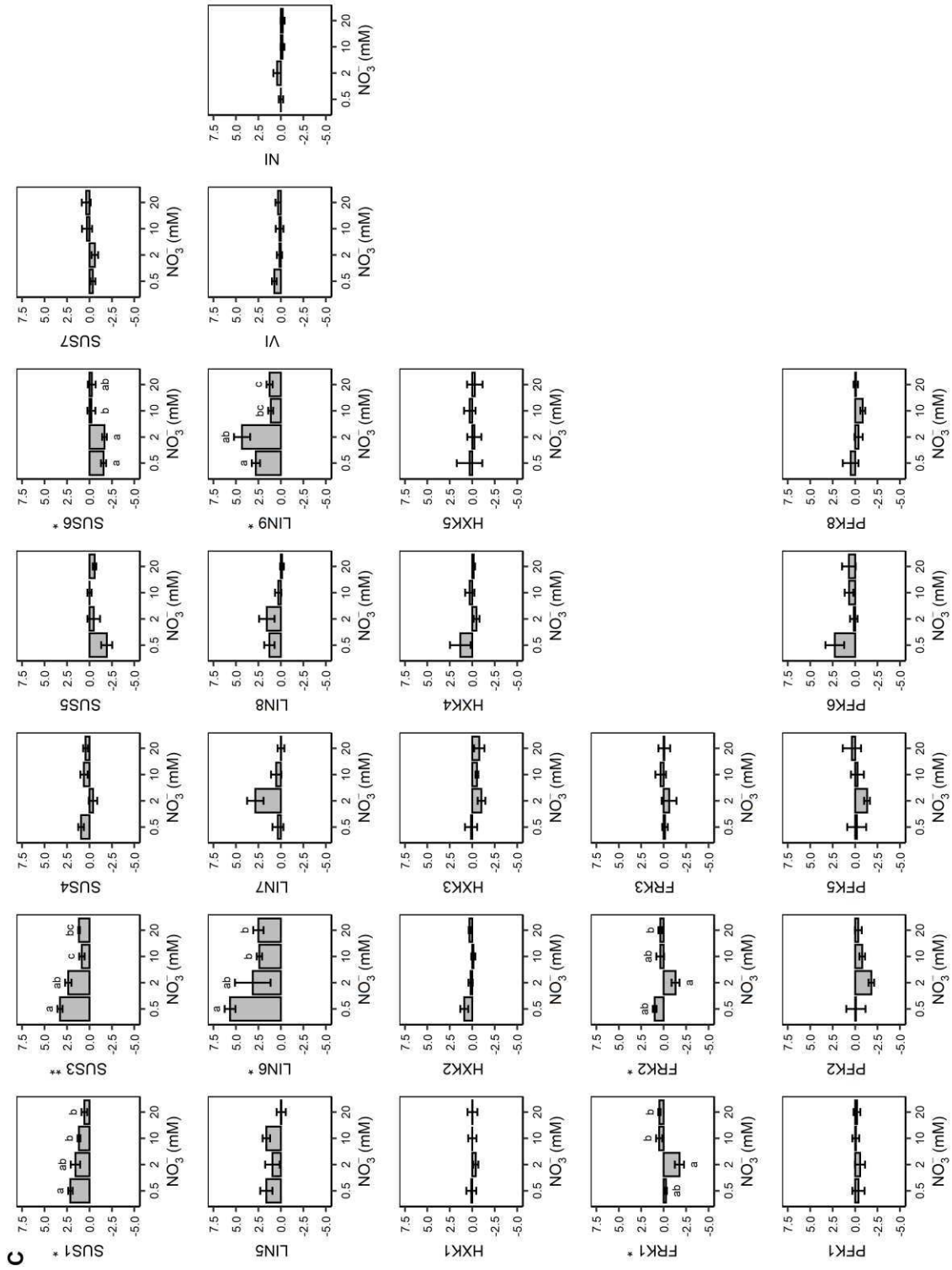


Figure S2: Relative expression of carbohydrate metabolism genes at 2 (A), 4 (B) and 7(C) DPI. Each bar is the mean \pm standard error of five observations (corresponding to five plants per nitrate level, one observation per plant). Asterisks beside gene names indicate the levels of significance according to N-treatments (Kruskal-Wallis test, *** when $P < 0.001$, ** when $0.001 < P < 0.01$ and * when $0.01 < P < 0.05$). Letters indicate significant differences between N-treatments according to a Wilcoxon rank-sum test, one test per gene.







C

Chapitre IV

A metabolomic perspective on
nitrogen-modulated resistance to
Botrytis cinerea in tomato stems
(*Solanum lycopersicum*)

Nathalie Lacrampe, Sophie Colombié, Doriane Dumont,

Philippe Nicot, François Lecompte and Raphaël Lugan

Ce chapitre, rédigé en anglais, est une version préliminaire d'un article destiné à être soumis prochainement. Les figures supplémentaires se trouvent en Annexe IV.

Contributions :

- Réalisation des expérimentations végétales (avec F. Lecompte et P. Nicot), réalisation des dosages métabolomiques (avec D. Dumont et R. Lugan), et analyse des résultats (avec R. Lugan)
- Réalisation des figures (avec R. Lugan)
- Correction de l'article (avec l'ensemble des co-auteurs)

Abstract

Botrytis cinerea is a necrotroph filamentous fungus able to infect any organ of dicots. In tomato, conidia germinating on wilted tissues or leaf removal wounds, may develop lesions potentially lethal to the plant when spreading to the stem. Metabolic deviations resulting from both infection and nitrogen limitation were investigated by measuring physiological traits and metabolic compounds. For this, tomato plants were grown in a susceptibility range to *B. cinerea*, with five nitrate concentrations. Systemic changes in the metabolome were explored in asymptomatic stems tissue surrounding the necrotic zone. Firstly, prior to infection, nitrogen-deficient plants showed unbalanced metabolic profiles, with reduced levels of amino acids, proteins, and glutathione but elevated levels of carbon-based and defense compounds such as tomatin and chlorogenic acid. Then, all plants responded to infection with alanine accumulation and galactinol depletion, indicative of a fundamental adjustment to the hypoxia and redox imbalance caused by the fungus. No other significant changes were observed in the metabolome of resistant plants obtained at high nitrate levels, while nitrogen-susceptible plants showed massive metabolic adjustments with changes in central metabolism around glutamate and respiratory pathways suggesting resource mobilization via autophagy and production of energy and reducing power. Important redox and defense metabolisms were also stimulated by the infection : glutathione and chlorogenic acid accumulated, as well as metabolites with a more controversial defensive role such as polyamines, GABA, branched-chain amino acids and phytosterols. All together, the results show that nitrogen deficiency, although leading to an increase in phytoalexins even before the pathogen attack, must have compromised the constitutive levels of defense proteins and delayed or attenuated the induced responses. The responses of nitrogen-deficient plants can be interpreted as an attempt to maintain redox homeostasis and support infected tissues, to counteract the necrotrophic mode of action of *B. cinerea* by setting up a metabolism that promotes cell survival.

Key words: stem, necrotroph, nitrate fertilization, metabolic profiling, galactinol, tomatine, cycloartenol

1. Introduction

Botrytis cinerea (perfect stage: *Botryotinia fuckeliana*) is a filamentous fungus able to infect over 200 dicot hosts. In tomato, conidia germinating on wilted tissues or leaf removal wounds, may develop lesions potentially lethal to the plant when spreading to the stem. Generally speaking, healthy plants develop two constitutive lines of defences: (i) extracellular barriers, produced on organ surfaces and around cells in the form of cuticle and cell wall, respectively made of the structural polymers suberin and lignin, and (ii) phytoanticipins, toxic secondary metabolites, such as α -tomatine, a steroidal glycoalkaloid found in most organs of tomato (Friedman 2002). Pathogens are detected by the host immune system, comprising a set of ROS-dependant recognition/signaling proteins and complex hormonal cross-talks. This in turn triggers inducible defence mechanisms, such as cell wall reinforcement, secretion of phytoalexins and pathogenesis related proteins (PR) as well as programmed cell death (PCD) in the case of the hypersensitive response (HR) (Bari and Jones 2009; Dodds and Rathjen 2010; Pitsili *et al.* 2020). All of this requires massive transcriptomic, proteomic and metabolomic reconfigurations that rely on underlying changes in central and peripheral metabolic fluxes to provide the necessary molecular building blocks, energy and redox power. The cost of defence results in a loss of biomass or fitness (Garcia *et al.* 2021; Sestari and Campos 2021) that is even harder for plants under nutrient limitation.

The negative correlation between nitrogen (N) fertilization and *B. cinerea* lesions on tomato stem was reported long ago (Verhoeff 1965). Plant N status influences infection processes differently depending on the plant species. An increased nitrogen fertilization disadvantages *B. cinerea* on tomato (leaves and stems) but conversely favors it on lettuce and Arabidopsis leaves (Lecompte *et al.* 2010, 2013; Soulie *et al.* 2020). It has also been suggested that NH_4^+ over NO_3^- would favor necrotrophs but this is controversial (Soulie *et al.* 2020; Yermiyahu *et al.* 2020). These nuances are not surprising since nitrogen resources feed both plant and pathogen growth, however the underlying precise molecular mechanisms involved are still largely unknown. In Arabidopsis, a transcriptomic study, conducted 6 hours post-infection (Soulie *et al.* 2020) to find what early biological functions explaining the contrasted resistance to *B. cinerea* under low or high N nutrition regimes did not provide definitive explanations. Nevertheless several genes related to N transport and/or metabolism were found affected by infection, regardless of the N status, with the notable exception of

nitrate reductase 1 and asparagine synthase 1, respectively more expressed and repressed after infection under low-N nutrition, compared to plants under high-N nutrition. Interestingly, some defence genes were more highly expressed in low-N plants, suggesting a regulatory role of nitrogen nutrition on the defences going beyond the simple supply of substrates. Another transcriptomic study of tomato shoots infected by *B. cinerea* at different levels of N nutrition illustrates the integration of defence and nitrogen nutrition mechanisms (Vega *et al.* 2015). This work showed that plants well supplied with nitrogen and resistant to the pathogen uniquely overexpressed NTR2, a high affinity NO₃⁻ transporter, as well as genes coding for defence proteins such as PADRE protein (AT2G01340 homolog), chitinases (AT3G12500 and AT3G04720 homologs) and secondary metabolic pathways such as homologs of CYP75B1 (AT5G07990) and CYP84A1 (AT4G36220), respectively involved in flavonoid biosynthesis and lignin biosynthesis. It is clear here that resistance is based on a proteome configuration that depends on the nitrogen status of the plant.

The picture is further complicated by the necrotrophic mode of action of *B. cinerea*, triggering HR (Govrin and Levine 2000) and promoting apoplastic and chloroplastic ROS at the site of infection (Rossi *et al.* 2017), resulting eventually in host-cell death. This pro-senescence action was revealed in a promoter expression survey conducted in and around *Arabidopsis* and tomato tissues. *B. cinerea* induced the expression of the senescence-associated genes SAG12 and SAG13, the expression of SAG12, a senescence specific gene, preceding any visible senescence symptom as early as 24-48h after inoculation (Swartzberg *et al.* 2008). The screening of *Arabidopsis* mutant infected by *B. cinerea* also revealed the critical role of cell death for fungal propagation (Van Baarlen *et al.* 2007) and highlighted the role of plant tissues surrounding the infection site in the control of pathogen-induced senescence. The fungus deploys an arsenal of molecular means to induce senescence. Its secretome includes proteins and metabolites dedicated to cell-wall degradation and manipulation of the plant immune system. *B. cinerea* effectors include xylanases to degrade hemicellulose (Yang *et al.* 2017) and endopolygalacturonases that require an acidic environment to degrade the pectin homogalacturonan chains of the plant cell wall. The acidification is thought to be achieved by the secretion of another effector, oxalic acid, key for a successful infection, as demonstrated by Kunz *et al.* (2006), who studied an oxalate-deficient *B. cinerea* mutant unable to colonize *Vitis vinifera* leaves. Still, the role of oxalic acid in the process of infection is controversial

(Velooso and van Kan 2018). The released oligogalacturonides trigger plant immunity and defence responses including accumulation of phytoalexins, glucanase and chitinase (Rasul *et al.* 2012). The plant's hormonal system that regulates development and defense mechanisms is also altered in the presence of *B. cinerea*. A role of abscisic acid (ABA) in promoting senescence and disease symptoms has been proposed by Asad *et al.* (2019) and the sesquiterpene botrydial was found to induce HR by modulating signaling pathways modulated by salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) (Rossi *et al.* 2011). As the fungus conquers new tissues by promoting cell death, its attacks extend beyond the lesions, to hyphae-free adjacent cells. This was demonstrated by a transcriptomic study, unraveling signals spreading to close or more distant tissues and inducing specific transcriptome regulations (Mulema and Denby 2012). It also follows from the operating mode of *B. cinerea* that a successful infection has massive consequences on plant metabolism, as reflected by a transcriptomic study showing that metabolism-associated genes constitute the main functional category modulated by infection (Soulie *et al.* 2020). Metabolomic studies however are scarce, focusing either on primary or secondary metabolism (Lloyd *et al.* 2011; Camañes *et al.* 2015). Metabolic deviations resulting from both infection and N deprivation were investigated by targeting C/N imbalance and biosynthesis of defence compounds or sugar metabolism (Lecompte *et al.* 2010, 2013; Lacrampe *et al.* 2021).

The present work is a metabolomic study of responses of tomato healthy stem tissues to *B. cinerea*, under contrasted NO_3^- nutrition regimes, ranging from severe deficit to over-fertilization. The aim was (i) to find metabolic markers associated with susceptibility or resistance in stems, a non-photosynthetic sink organ with distinctive histological structures and functions, that has not been given as much attention as leaves or fruits; (ii) to question how metabolic adjustments induced by N nutrition regimes favor resistance or susceptibility in healthy tissues under the influence of the fungus. For that, we adopted a strategy including both untargeted and multitargeted metabolomics (Allwood *et al.* 2021), to explore key portions of metabolome, including primary metabolites and some important defence metabolites in tomato.

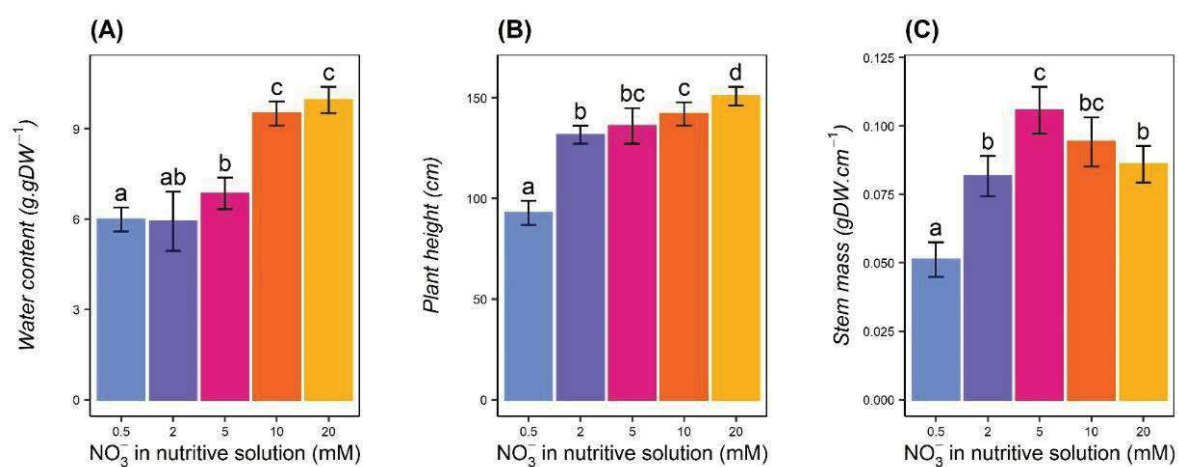


Figure IV.1 : Impact of nitrogen fertilization on plant growth before inoculation

(A) Water content (Kruskal-Wallis test, p-value = 0,0006494). (B) Plant height (Kruskal-Wallis test, p-value = 0,0008229). (C) Stem mass (Kruskal-Wallis test, p-value = 0,000976). Bars represent the mean of 5 biological replicates, error-bars indicate the standard deviation and letters indicate significant differences between nitrate treatments according to a Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney-Wilcoxon post hoc test (p-value < 0.05).

2. Results

2.1. N availability determines the metabolic profile before infection

The impact of nitrogen fertilization on plant growth before inoculation was evaluated by comparing three growth variables, water content, plant height and stem mass in the five N nutrition regimes. Up to 5 mM NO_3^- , increasing N results in increased growth, measured by plant height and stem mass with low stem water contents. From 5 to 20 mM NO_3^- , the plant height increased slightly and the stem water content increased significantly while the stem mass decreased (Figure IV.1).

A principal component analysis (PCA) on the data set, containing 107 metabolites and 3 physiological variables, before inoculation (0 dpi, day post inoculation) revealed that 47.6 % of the data variance, brought by the first principal component (PC1), was associated to the nitrogen nutrition (Figure IV.2). Samples fertilized with up to 10 mM NO_3^- were well separated while sample fertilized with 10 and 20 mM NO_3^- overlapped, indicating that these two regimes had essentially the same effect on the metabolome. Interestingly, whereas high nitrate regimes (10 and 20 mM NO_3^-) were mainly associated with higher levels of N-based compounds (amino acids, proteins), the low-N regimes, clearly segregated by PC1, largely involved the metabolome and especially C-based compounds.

A hierarchical clustering analysis (HCA) was then performed on the subset of the most discriminant variables (top 75% highest variables importance in projection, VIP, in the partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA), hence discarding noisy variables for the sake of clarity (Figure IV.3). The samples form three clusters: high N regimes (10 and 20 mM NO_3^-), low N regimes (2 and 5 mM NO_3^-), and the lowest N regime (0.5 mM NO_3^-), which forms its own cluster due to distinctive trends in the variable cluster 1.1. As for the variables, they are organized into two principal clusters: the first cluster gathers almost all N-based compounds and the growth variables, positively correlated to N regimes. The lowest N regime impacted even more dramatically the plant height and the key amino acids involved in N assimilation and transport: glutamate, glutamine, aspartate and asparagine (cluster 1.1). On the contrary, the second cluster was mostly composed by C-based compounds: starch, carbohydrates, phytosterols and phenolic compounds, all negatively correlated to N regimes. It is worth

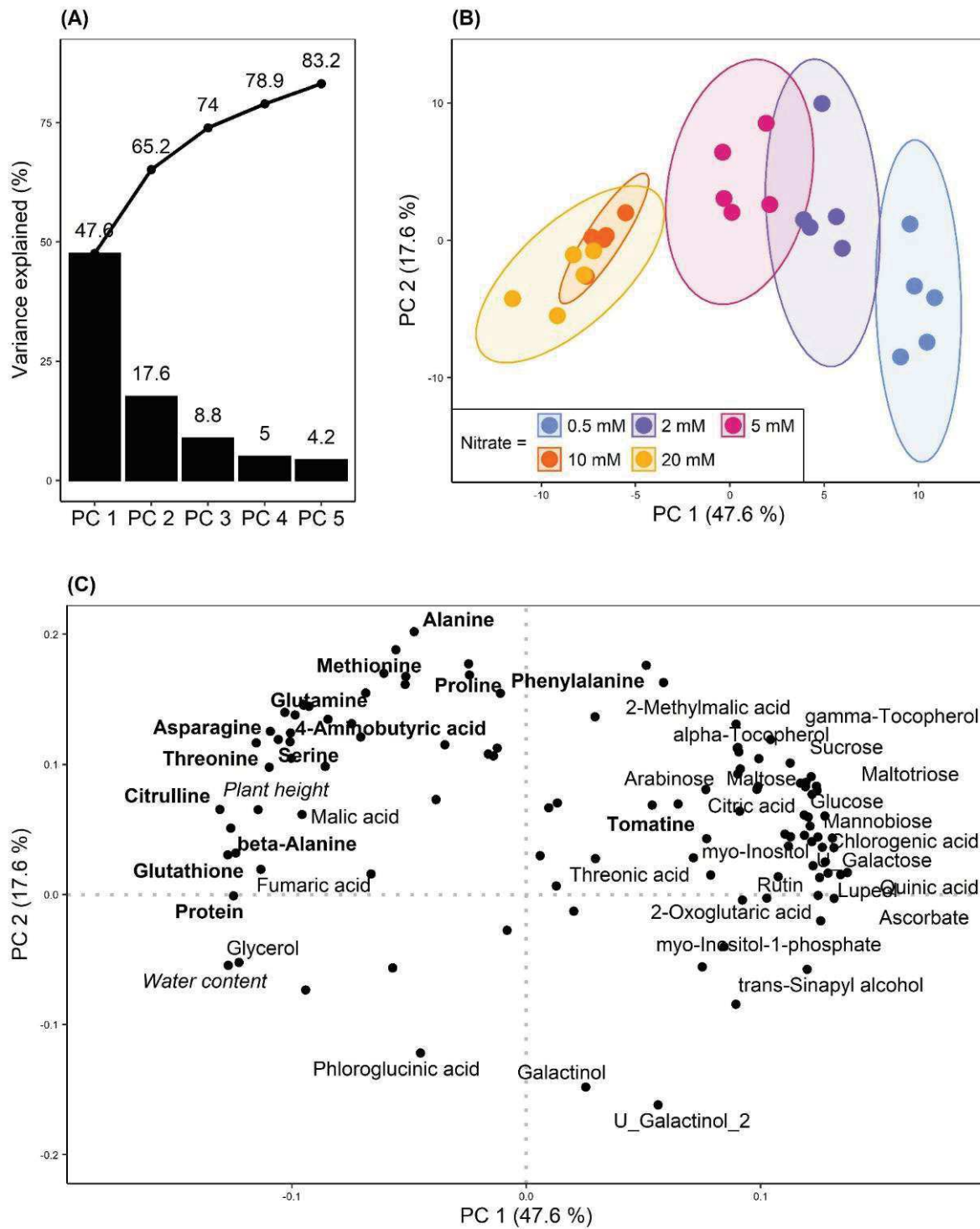


Figure IV.2 : Principal component analysis of the dataset before inoculation (0 dpi).

Data were LOG_{10} transformed and normalized (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable). (A) Scree plot where bars represent the percentage of variance explained by each principal component and dots represent the percentage of cumulated variance explained. (B) Scores plot; ellipses represent the distribution of each N groups with a 95% level of confidence. (C) Loadings plot; the names of the most contributive variables to the PC1 and PC2 are displayed, N-compounds are written in bold and growth variables in italics.

noticing some remarkable exceptions to this general pattern, such as the central carbon metabolites fumaric and malic acids, found in the first cluster.

2.2. The metabolome of lesion-surrounding tissues of resistant plants is hardly affected by the infection with *B. cinerea*

Lesions caused by *B. cinerea* were visible on the stems from 4 dpi onward and grew faster with decreasing N supply. (Figure IV.4A). A decreasing asymptotic relationship between AUDPC and N supply confirmed a previous report by Lecompte *et al.* (2010) (Figure IV.4B). This distribution reveals three levels of disease susceptibility which coincide with the metabolic profiles induced by N nutrition reported in Figure IV.3. From now on, the 0.5 mM NO₃⁻ regime will be referred as to “very-low-N”, the regimes 2 and 5 mM NO₃⁻ as “medium-low-N” and 10 and 20 mM NO₃⁻ as “high-N”.

A PCA performed on the dataset 7 dpi discriminated the samples according to the N regimes on PC1, accounting for 41 % of the total variance, while samples from the low N regimes (0.5 to 5 mM NO₃⁻) were discriminated according to inoculation on PC2, accounting for about 18 % of the total variance (Figure IV.5). This means there has been a higher impact of N nutrition than *B. cinerea* infection on the metabolome. The PCA also clearly indicated a low impact of *B. cinerea* at high-N, since these samples were not separated along PC2. This limited impact of the fungus is reflected by the number of variables significantly different after inoculation, at any time point (Mann-Whitney test, p-value < 0.05): 13 at 10 mM NO₃⁻ and 8 at 20 mM NO₃⁻, instead of 71 at 0.5 mM NO₃⁻, 42 at 2 mM NO₃⁻ and 57 at 5 mM NO₃⁻ (Supplementary Table S2). On PC2, the infection was mostly associated to the depletion of three compounds: galactinol, U_galactinol_2 and cycloartenol as well as the accumulation of many C- or N-based compounds such as ribose, 2-methylmalate, β-alanine, putrescine, 4-aminobutyric acid (GABA) and branched-chain amino acids (BCAAs).

A more precise view of the metabolic changes induced by the infection can be seen on orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) plots in the subsets of data representing the three levels of susceptibility (Figure IV.6). HCAs were also performed on the OPLS-DA VIPs. At very-low-N and medium-low-N, the OPLS-DA model was good at discriminating mock- and *Botrytis*-inoculated plants ($R^2Y > 0.88$ and $Q^2 > 0.83$) while it failed to do so at high-N ($R^2Y = 0.607$ and $Q^2 = -0.295$), thereby confirming that the metabolome of

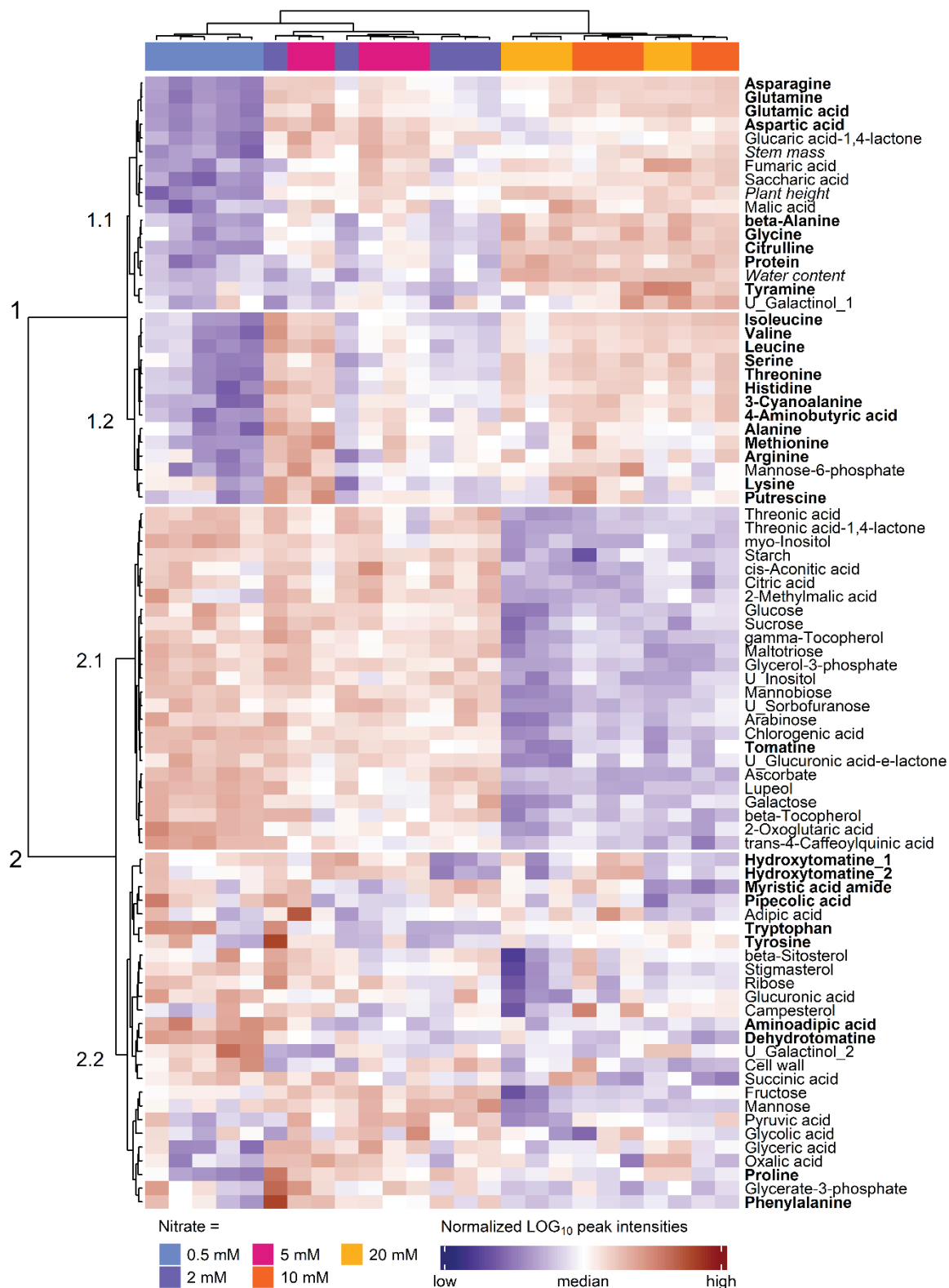


Figure IV.3 : Hierarchical clustering analysis before inoculation.

A subsetted dataset of the most discriminant variables (top 75% highest VIP in the PLS-DA) in mock-inoculated plants 0 dpi was used for the analysis. HCA was performed using the Euclidian distance and the Ward algorithm on data LOG₁₀ transformed and normalized (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable). N-compounds are written in bold and growth variables in italics.

resistant plants was weakly impacted by the infection. Among the 18 metabolites with any significant variation at high-N (Supplementary Table S2), only galactinol and alanine showed a clear pattern when examining the full kinetics (Figure IV.7). It could also be reasonably argued that the cell wall was increased 7 dpi and myo-inositol was decreased, but other variations are far too erratic to be considered. Based on the OPLS-DA S-plots and HCAs performed on the OPLS-DA best VIPs, it is however possible to spot the most *Botrytis*-responsive variables in very-low-N and medium-low-N plants. The depletion of galactinol, U_galactinol_2, cycloartenol and myo-inositol is shared by all N-deficient plants, as well as the accumulation of hexose-phosphates, glycerate-3-phosphate, 2-oxoglutarate, putrescine, ribose and alanine. Increase in alanine and decrease in galactinol were also characteristic of high-N plants and indeed constitute the only responses common to every N regimes. Conversely, GABA accumulation is a specific response in very low-N plants and BCAAs accumulation is specific of medium-low-N plants and more precisely of plants grown under 5 mM NO₃⁻.

2.3. Contrasted effects of *B. cinerea* infection in severely and moderately N-deficient plants

To better visualize the contrasted responses to *B. cinerea* in plants grown under 0.5 and 5 mM NO₃⁻, a HCA was carried out on a selection of variables displaying significant variations at 7 dpi, using the ratios of their concentrations at either 0.5 or 5 mM NO₃⁻, over their concentrations at 10 mM NO₃⁻ (Figure IV.8). The cluster 1.2 gathered compounds, mostly nitrogenated, that were very low in severely N-deficient plants and only weakly accumulated after infection, while they were more abundant in moderately N-deficient plants and accumulated after infection far beyond the levels found in severely N-deficient plants. These compounds include glucuronic acid, the total protein fraction, BCAAs, glutamate, aspartate and glutathione. The cluster 2.2.1 gathered tomatine, dehydrotomatine and hydroxytomatine_1. These compounds accumulated after infection in moderately N-deficient plants but decreased in severely N-deficient plants. The cluster 2.1 comprised mostly C-based compounds, with low levels in severely and moderately N-deficient plants but accumulated in both treatments after infection. Interestingly, C-based compounds found at high concentrations in stems, such as sucrose, glucose, citric acid and malic acid, did not significantly accumulate as did other C-based compounds presenting lower concentrations.

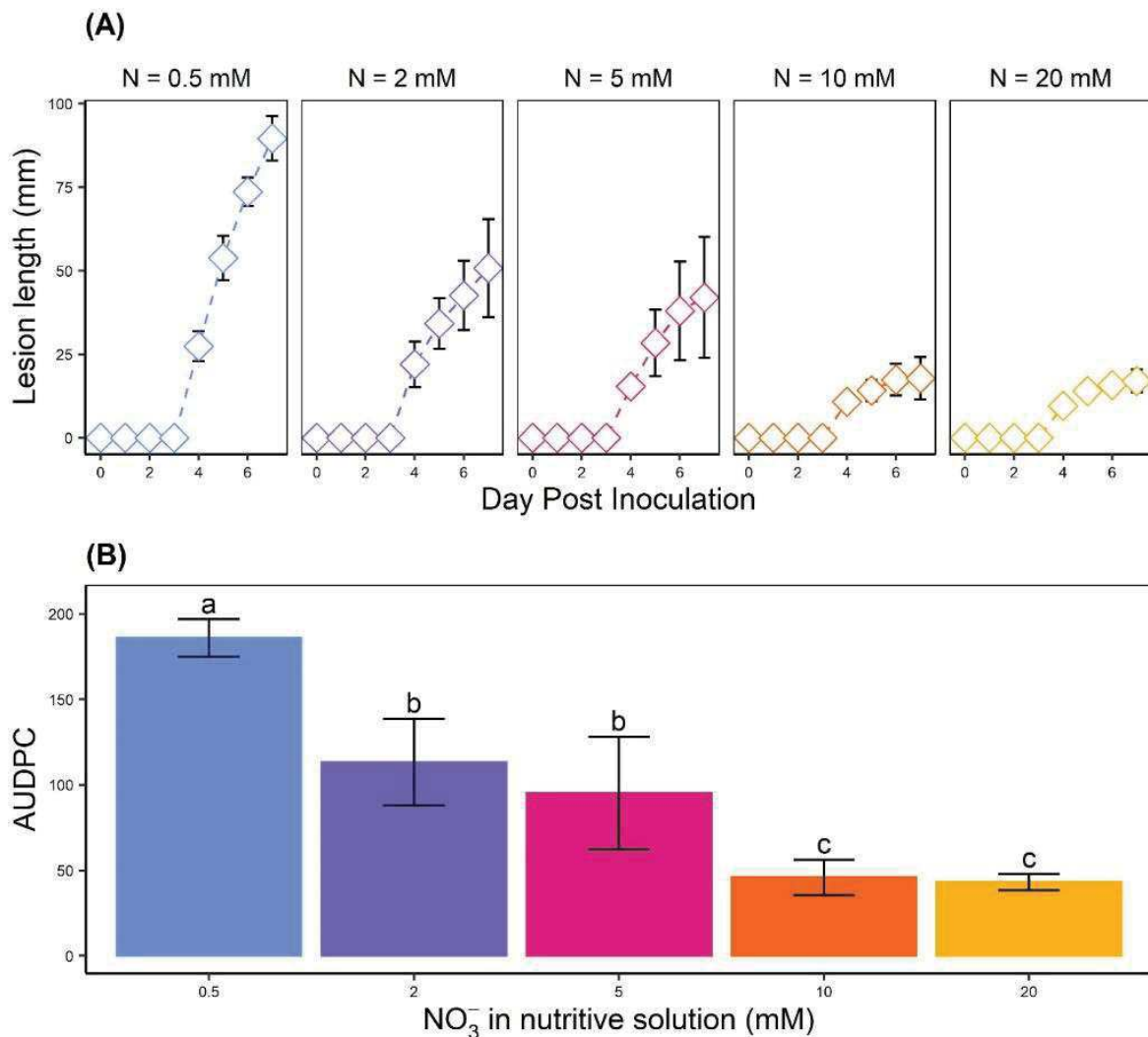


Figure IV.4 : Disease severity caused by *B. cinerea* on tomato stems.

(A) Lesions size on stem of tomato plants. Each dot represents the mean of 5 biological replicates and error-bars represent the standard deviation. (B) Area under the disease progress curve (AUDPC) on tomato stems under five nitrate treatments. Each bar represents the mean of 5 biological replicates, error-bars represent the standard deviation and letters indicate significant differences between nitrate treatments according to a Kruskal-Wallis test (p -value = 0,0003248) followed by a Mann-Whitney-Wilcoxon post hoc test (p -value < 0.05).

This heatmap shows to what extent plants with severe (0.5 mM NO_3^-) or moderate (5 mM NO_3^-) metabolome distortion as compared to well fertilized plants (10 mM NO_3^-), were able to quantitatively mobilize metabolic pathways to address the challenge of infection. Overall, this suggests that when challenged by the infection, severely N deficient plants were able to shift toward the accumulation of some C-based compounds with the same efficiency than moderately N-deficient plants, but not toward the accumulation of N-based compounds. The tomatine-related metabolites even showed opposite trends, suggesting they were degraded in severely N-deficient plants.

3. Discussion

3.1. N-starvation impairs growth, water status and increases C / N ratio

Under N restriction, plant height and stem biomass were roughly reduced proportionally to the intensity of N deprivation (Figure IV.1), probably traducing an alteration of the photosynthetic and growth capacity (Renau-Morata *et al.* 2021). The water content however fell by a third in the stem of every low-N plant, probably because of a reduced water flux, since NO_3^- is involved in the control of root hydraulic conductance through NO_3^- transporters and aquaporins (Cramer *et al.* 2009; Tyerman *et al.* 2017). In tomato leaves, a linear relationship between NO_3^- concentration and water content was established (Cárdenas-Navarro *et al.* 1999) and the authors suggested that nitrate content changed, on a dry weight basis, according to the size of the water reservoir. No obvious metabolic marker of drought (Rabara *et al.* 2015) was found constitutively accumulated in the samples, such as proline, polyols, raffinose family oligosaccharides (RFOs) or GABA.

N starvation also provoked a characteristic decrease in amino acids and proteins, and increases in the levels of starch, most carbohydrates, phosphoesters and secondary metabolites, pretty much in line with the profiles reported in tomato leaves by Urbanczyk-Wochniak and Fernie (2005). Remarkable exceptions are malate and its precursor fumarate, linked by the mitochondrial fumarase activity in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, here more abundant in high-N plants. The nitrogen assimilation and distribution are plugged on the TCA cycle via the 2-oxoglutarate, so subtle retrocontrols can occur under N starvation. Lower NO_3^- reduction to NH_4^+ for instance, means less protons consumed, a situation potentially balanced

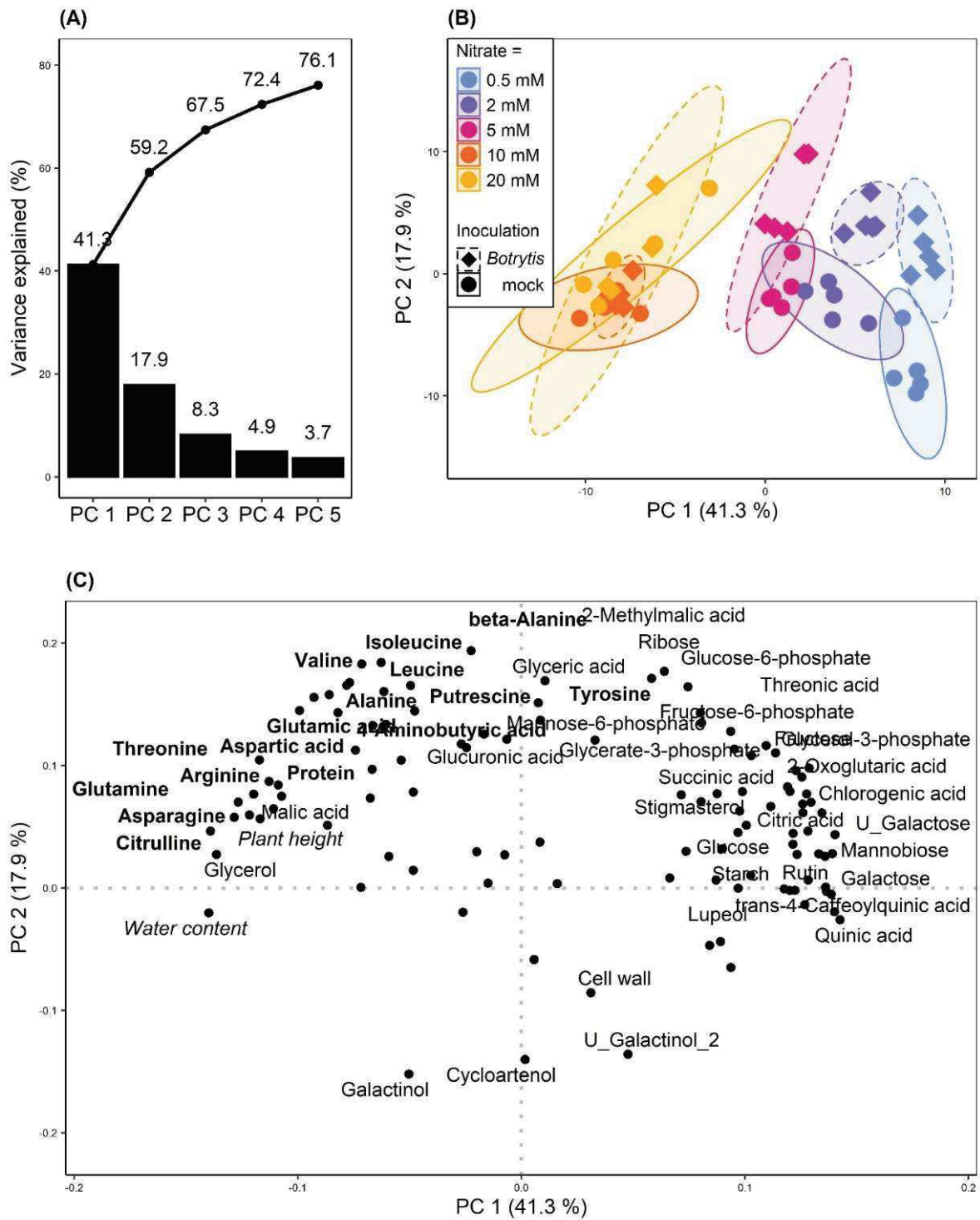


Figure IV.5 : Principal component analysis of the dataset 7 dpi.

Data are LOG_{10} transformed and normalized (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable). (A) Scree plot where bars represent the percentage of variance explained by the principal components and dots represent the percentage of cumulated variance explained. (B) Scores plot; ellipses represent the distribution of each N groups with a 95% level of confidence. (C) Loadings plot; the names of the most contributive variables to the PC1 and PC2 are displayed, N-compounds are written in bold and growth variables in italics.

by lower malate and fumarate pools to maintain the pH homeostasis. As a sink organ, stem might have a different respiration and NO_3^- assimilation regime than leaves, which would explain the differences regarding organic acids compared to what was reported in leaves (Urbanczyk-Wochniak and Fernie 2005; Renau-Morata *et al.* 2021). An alternative explanation would involve a second cytosolic fumarase, like in *Arabidopsis*, where it is required for the massive accumulation of fumarate when plants are grown on high nitrogen (Pracharoenwattana *et al.* 2010). However, in tomato, a single gene encoding a mitochondrial fumarase has been identified so far. Another exception is saccharic acid (glucaric acid), dramatically decreased in very-low-N plants. The biosynthetic pathway of this compound, an oxidation product of glucose, has not been elucidated in plants yet, but it is thought to originate from myo-inositol and is a precursor of a major phenylpropanoid in tomato: 2-O-caffeoylglucarate (Strack *et al.* 1987), so its variations could impact defence capacity. C-based secondary metabolites accumulated under N starvation, in agreement with the data reported by Larbat *et al.* (2012). High C / N ratio induced by nitrogen limitation is thought to redirect C allocation toward defence metabolism and notably increased contents of chlorogenic acid and tomatine in leaves and stems (Løvdaal *et al.* 2010; Royer *et al.* 2013). These observations indicate a state of N deficiency-induced C / N imbalance, in accordance with the trophic theories of carbon nutrient balance and growth-differentiation balance (Bryant *et al.* 1983; Herms and Mattson 1992), implying a trade-off between growth and defence under nutrient limitation. Indeed, chlorogenic acid, trans-4-caffeoylquinic acid, trans-5-caffeoylquinic acid and quinic acid showed a strong negative correlation with plant height (Figure IV.9). Finally, ascorbate and glutathione showed opposite trends, because N scarcity limited the constitution of the glutathione pool while ascorbate accumulated. This is indicative of a notable imbalance in the central ascorbate/glutathione cycle that controls the redox status (Sakhno *et al.* 2019). As to whether these constitutive traits are impacting the resistance to *B. cinerea*, we are facing a paradox because the most susceptible plants are also those accumulating the highest levels of secondary metabolites. It seems therefore that other defence mechanisms explain the resistance of high-N plants.

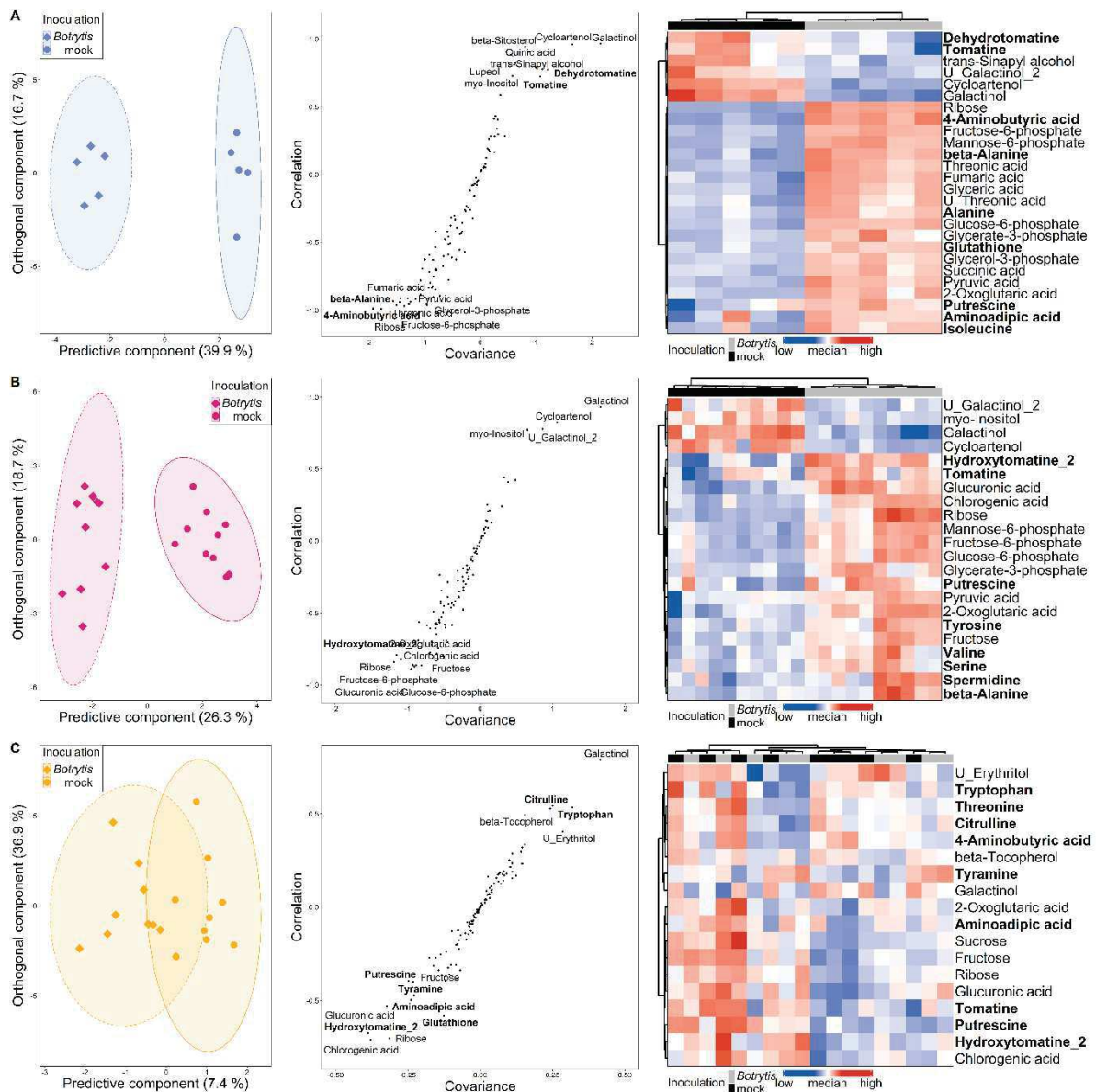


Figure IV.6 : Orthogonal partial least squares discriminant analysis performed 7 dpi.

Data were LOG_{10} transformed and Pareto normalized (mean-centered and divided by the root-square of standard deviation). On scores plots ellipses represent the distribution of each group with a 95% level of confidence; on S-plots the names of the most contributive variables are displayed. A HCA was then performed on the variables with a VIP score > 1.2 . (A) Very-low-N samples, on the first predictive component, the goodness-of-fit is $R^2 = 0,94$ and the goodness-of-prediction is $Q^2 = 0,85$. (B) Medium-low-N samples, on the first predictive component, the goodness-of-fit is $R^2 = 0,94$ and the goodness-of-prediction is $Q^2 = 0,85$. (C) high-N samples, on the first predictive component, the goodness-of-fit is $R^2 = 0,65$ and the goodness-of-prediction is $Q^2 = -0,43$. N-compounds are written in bold and growth variables in italics.

3.2. Only a few metabolic changes are induced by *B. cinerea* regardless of N status

The only significant variations observed in high-N plants after inoculation concern a handful of metabolites and are not restricted to this nutrition regime: the fall of galactinol and myo-inositol and the accumulation of alanine (Figure IV.7).

3.2.1. Galactinol and myo-inositol depletion are revealing of redox disruption after infection

Galactinol (galactosyl-myo-inositol) was not impacted by N fertilization, while myo-inositol displayed the typical trend of C-based compounds accumulated in low-N plants. Both however showed a remarkable drop after infection. These compounds are carbohydrates involved in many metabolic and physiological processes (see reviews Elsayed *et al.* 2014 and Sengupta *et al.* 2015). Myo-inositol biosynthesis takes place in the cytosol in three steps, starting by the phosphorylation of glucose by a hexokinase, followed by the conversion of glucose-6-phosphate to myo-inositol-1-phosphate catalyzed by the myo-inositol phosphate synthase (MIPS). Myo-inositol-1-phosphate is eventually converted to myo-inositol by a myo-inositol monophosphatase (MIMP). Galactinol can be synthesized from myo-inositol and UDP-galactose by a galactinol synthase (GOLS), opening the path to the biosynthesis of raffinose family oligosaccharides (RFOs), very common galactose-containing carbohydrates in higher plants. During the past decade, galactinol and myo-inositol have both been related to oxidative stress, ROS signaling and plant defence.

Myo-inositol related pathways are imbedded in structural and cellular stress management functions. On top of its role as a substrate for galactinol and RFOs biosynthesis, myo-inositol is the precursor of (i) inositol phosphates, such as phytic acid, an ubiquitous molecule involved in phosphorus storage and hormone mediated stress responses, (ii) the membrane components phosphatidyl inositol phosphates and glycosylinositol phosphoceramides (a class of sphingolipids) and (iii) glucuronic acid, a precursor of cell wall polysaccharids and, controversially, ascorbic acid (Ivanov Kavkova *et al.* 2019). The most interesting discovery is the involvement of myo-inositol in programmed cell death (PCD). Meng *et al.* (2009) showed that the Arabidopsis mutant *mips1*, with reduced levels of myo-

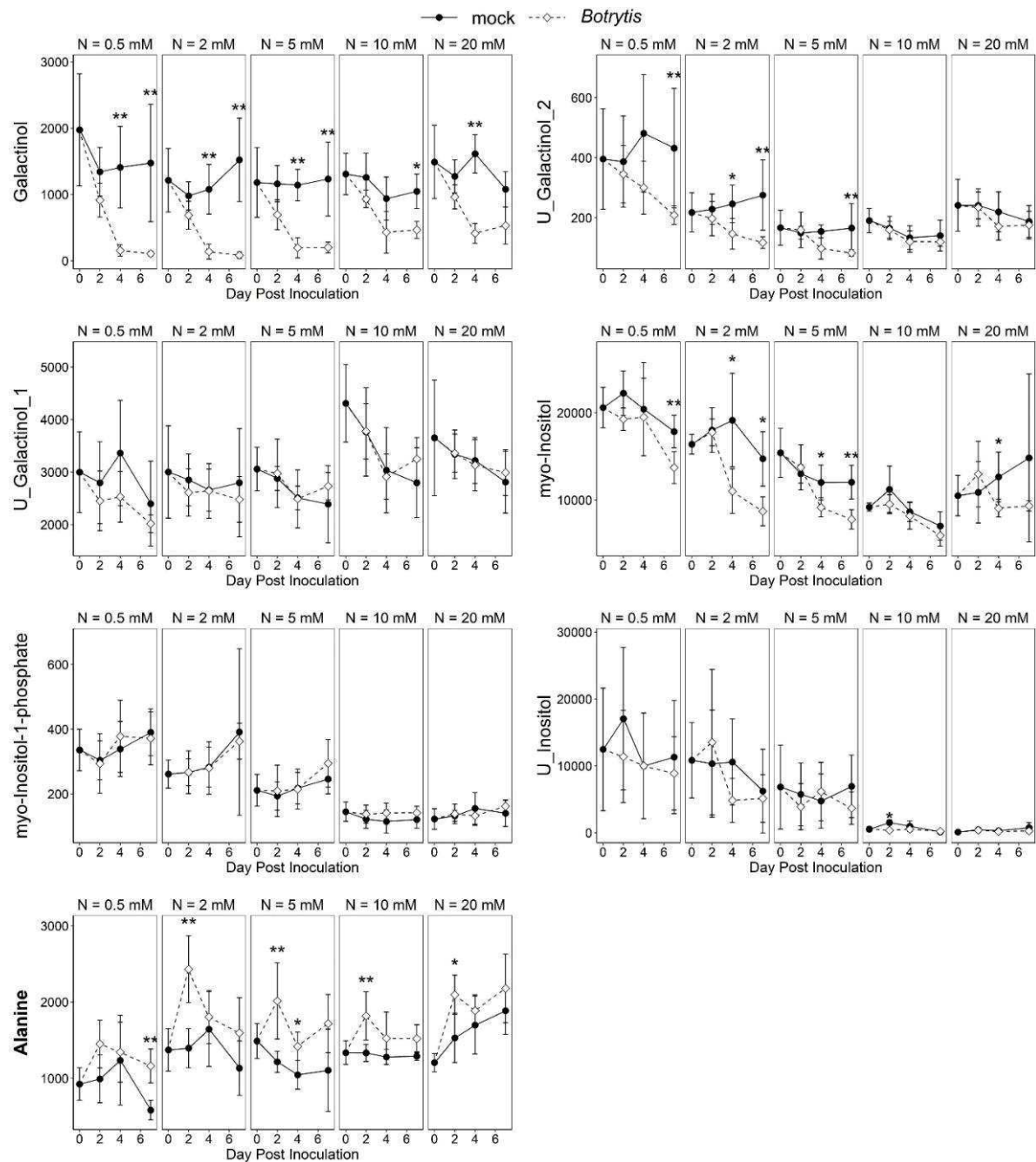


Figure IV.7 : N nutrition-independent metabolome changes upon infection

Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with 5 nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

inositol and galactinol, developed light- and SA-dependent necrotic lesions that can be rescued by myo-inositol supplementation. A connection between myo-inositol and oxidative stress was found in the *mips1* mutant that contains lower levels of ascorbic acid and is more susceptible to oxidative stress (Donahue *et al.* 2010). Moreover, studies on the catalase-deficient *Arabidopsis* mutant (*cat2*) pointed out the involvement of myo-inositol downstream of ROS signaling and upstream of SA in pathogen-associated responses (Chaouch and Noctor 2010). The mechanism by which myo-inositol regulates PCD is not clear but data suggest a role of inositol-phosphoceramides and ceramides homeostasis (Liang *et al.* 2003; Wang *et al.* 2008; Donahue *et al.* 2010). A link with SA and ethylene (ET) regulation was also pointed out in *mips1/2* silenced apple leaves developing a ROS-mediated PCD (Hu *et al.* 2020). Since cell death is a major component of the HR, which is hijacked by necrotrophic fungi to promote their growth (Mulema and Denby 2012; Pitsili *et al.* 2020), the decrease of myo-inositol after infection observed in our experiment, especially at low N regimes, could be indicative of a fungus attempt to provoke an oxidative burst.

Botrytis-induced galactinol variations are unlikely a simple consequence of its precursor depletion, because the trends followed by myo-inositol are quite different and their variations are not correlated (Figure IV.10). It is interesting to note the presence of two galactinol related molecules, especially U_galactinol_2 that shared a similar pattern in very-low-N and medium-low-N plants only. This supports the idea of an important and unexplored function of this pathway in response to *B. cinerea*. In many plant species, galactinol and RFOs, accumulate in response to abiotic stress including cold, dehydration, and hypersalinity where they are thought to stabilize membranes and maintain redox homeostasis (Nishizawa *et al.* 2008; Nishizawa-Yokoi *et al.* 2008). Data also accumulate about the involvement of galactinol in defence against pathogens. Tobacco lines overexpressing the cucumber *GOLS* accumulated up to 10-fold more galactinol than the wild type and had up to 63 % higher survival rate when infected by *B. cinerea* (Kim *et al.* 2008). Moreover, the authors found that a pharmaceutical application of galactinol reduced significantly the disease lesion areas. Cho *et al.* (2010) demonstrated that in *Arabidopsis* primed by plant growth-promoting rhizobacteria, the induction of *GOLS1* was effective against *B. cinerea* and was mediated by JA. Recently, an expression study of three *GOLS* isoforms in *Camellia sinensis* revealed that the transcription of one isoform was specifically upregulated by abiotic stress and abscisic acid, while the other

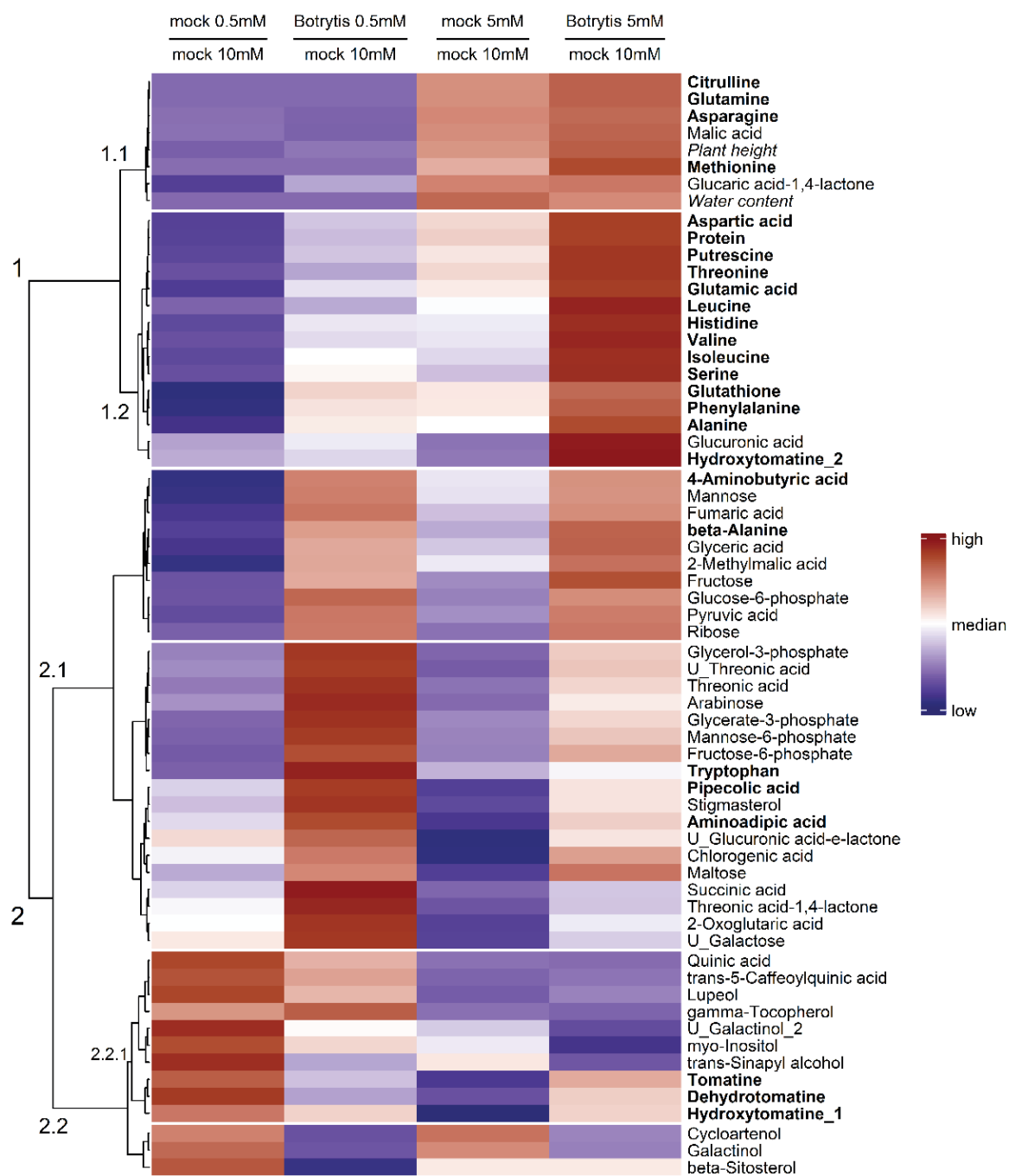


Figure IV.8 : Hierarchical clustering analysis of a subset of metabolites displaying a significant difference (Mann-Whitney test, p -value < 0.05) at any time point between *Botrytis*- and mock-inoculated plants upon 0.5 or 5 mM NO_3^-

The columns contain the ratios of concentration at either 0.5 or 5 mM NO_3^- over the concentration measured on 10 mM NO_3^- , 7 dpi. HCA is performed using the Euclidian distance and the Ward algorithm on data after square root transformation and Pareto normalization (mean-centered and divided by the square root of the standard deviation). N-compounds are written in bold and growth variables in italics.

two were specifically induced by biotic stress, SA and JA (Zhou *et al.* 2017). We thus propose that galactinol is exported from healthy regions to the site of infection, where it could to sustain antioxidant activity and delay PCD. This hypothesis is supported by the existence of phloem loading and transportation mechanisms in stem (Hannah *et al.* 2006).

These results prove that although remote and without apparent symptoms, the tissues adjacent to the lesions receive signals of the presence of the fungus and performed targeted changes of their metabolism.

3.2.2. Alanine accumulates as a symptom of hypoxia induced by the fungus

Under every N nutrition regime, alanine displayed a rapid increase after infection, followed by a relative decrease. Alanine is reversibly synthesized from pyruvate by the transfer of an amino group from glutamate catalyzed by alanine aminotransferases (ALAT). This amino acid was found to accumulate in Arabidopsis shoots and roots during hypoxic stress and then decreased with subsequent optimal O₂ concentrations, due to the activation of ALAT1 and ALAT2 (Miyashita *et al.* 2007). The corresponding genes were constitutively expressed in vascular tissues and their transcription was induced rapidly under hypoxia, possibly as an anticipation of the return to normoxia. A model of alanine shunt has been proposed, stipulating that hypoxia leads rapidly to insufficient ATP production, triggering the less efficient alcoholic fermentation for NAD⁺ regeneration intended to sustain glycolysis and ATP supply (Diab and Limami 2016). An ALAT/GOGAT (glutamine-2-oxoglutarate amino transferase) cycle would mitigate the C depletion of fermentative pathway that could eventually lead to cell death, by channeling the pyruvate toward alanine accumulation (Limami *et al.* 2008). Alanine synthesis would store C and N to remove them from the fermentation pathway, and restore 2-oxoglutarate replenishing the TCA cycle, while the GOGAT activity would regenerate glutamate and produce NAD⁺ available for glycolysis.

Recently, infection by the necrotrophs *B. cinerea* and *Alternaria brassicicola*, but not the hemibiotroph *Pseudomonas syringae*, have been proved to trigger local hypoxic stress in Arabidopsis leaves (Valeri *et al.* 2021). The hypoxia resulted from faster O₂ consumption due to a three fold increased respiration in *Botrytis*- than in mock-inoculated leaves. A relation between hypoxia and defence against *B. cinerea* is further supported by the dual role of transcription factors, such as RAP2.2 and WRKY33. RAP2.2 is an ethylene responsive gene

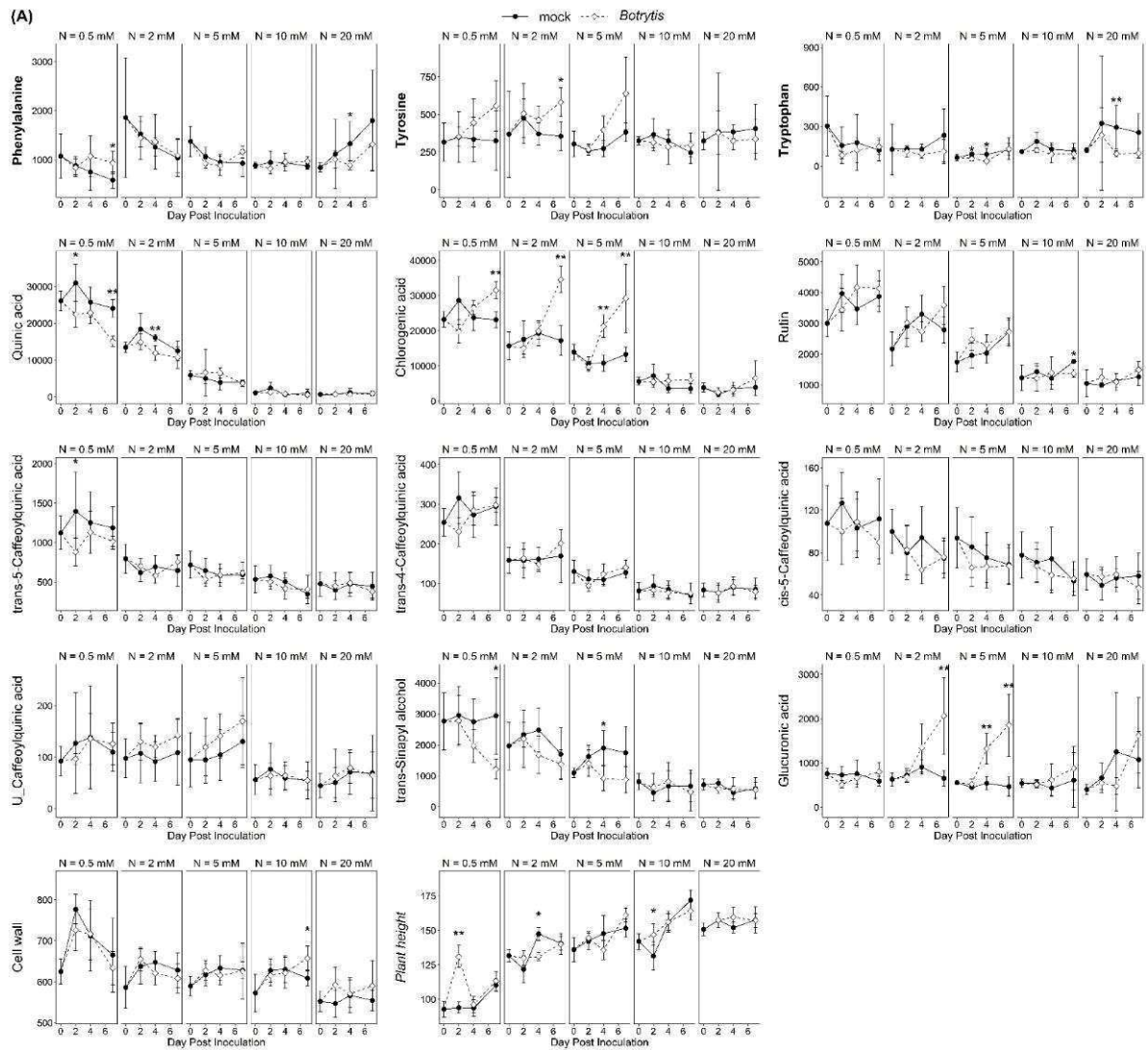


Figure IV.9 : C-based defence compounds variations upon *B. cinerea* infection.

(A) Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plant fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

induced by both *B. cinerea* infection and hypoxia, and WRKY33 is a transcription factor activating RAP2.2 during hypoxia and required for resistance to *B. cinerea* (Zheng *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2012; Tang *et al.* 2021).

These informations raise the hypothesis that alanine build up in our experiment in remote tissues could be a metabolic manifestation of hypoxia occurring at the site of infection. This could indicate a plant attempt to deal with incoming hypoxia induced by *B. cinerea*, an ambivalent response with no straightforward defensive character that would benefit both organism equally.

3.3. Massive reconfigurations occur in the central metabolome upon infection of susceptible plants

3.3.1. Glycolysis and TCA cycle activation upon infection could contribute to defense

B. cinerea had no impact on C-based compounds in high-N resistant plants (Figure IV.11). However, fluxes can be modified without change in metabolic pools and one must consider that some pools, such as glucose, may also be fueled or depleted by transportation (Lemonnier *et al.* 2014; Moore *et al.* 2015), a primary function of stems. On the contrary, *B. cinerea* inoculation selectively increased C reserves under low-N regimes. Starch content was barely affected, with only a slight decrease upon 2 mM NO_3^- , while a significant accumulation of maltose suggests a possible mobilization of the carbon stocks toward glycolysis. Fructose accumulated, but not sucrose and glucose, as well as glycolysis intermediates such as hexose phosphates, glycerate-3-phosphate, pyruvate, and most acids of the TCA cycle, with the notable exception of malate and citrate. The pentoses arabinose, and especially ribose, also accumulated in low-N plants. Interpreting these trends is challenging, given the high flexibility of central metabolism (Sweetlove *et al.* 2010). Sucrose, glucose, malate and citrate stability however, suggest the conservation of homeostasis in the global respiratory process, despite intensive ongoing metabolic reconfigurations. The many glycolysis and TCA cycle intermediates that are accumulated might be adjustment variables, possibly traducing the simultaneous activation of these central pathways, providing the necessary energy and reducing power to install specific defences. Important sink pathways are still being fueled after

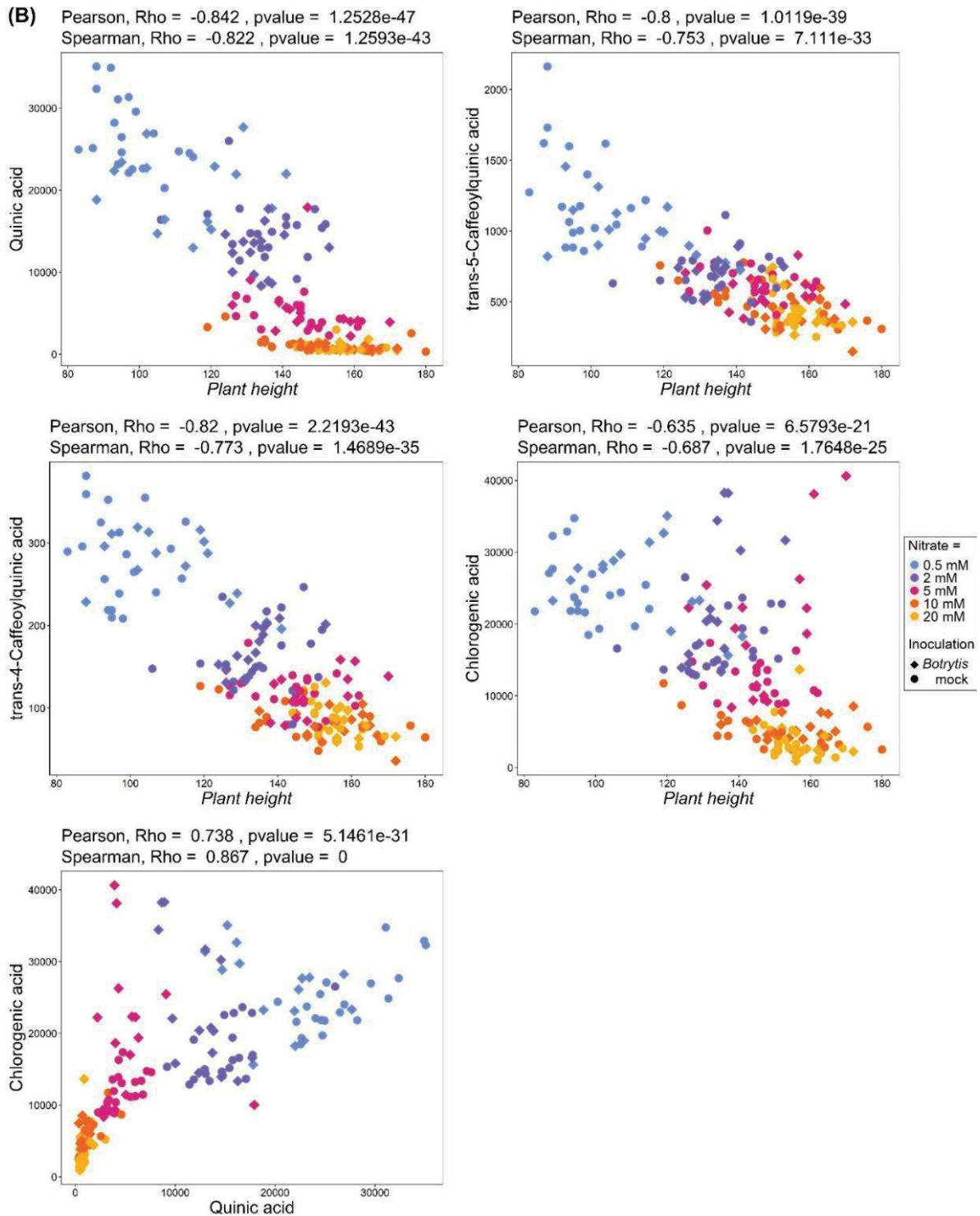


Figure IV.9 (continued): C-based defence compounds variations upon *B. cinerea* infection.

(B) Correlation plots of selected variables.

inoculation at least under medium-low-N regimes, like proteins, chlorogenic acid and tomatine, potentially at the expense of growth.

The specific involvement of soluble sugars metabolism in defence has been underlined by many studies (see Meyer *et al.* 2007, for review) and the singular link between the relative fructose content of tomato stems and tomato stems susceptibility to *B. cinerea* was reported by Lecompte *et al.* (2017). The dramatic increase in fructose under low N regimes is consistent with the repression of fructokinases genes (FRKs) at low N reported by Lacrampe *et al.* (2021). Another explanation could be based on the fact that invertases produce fructose and glucose while sucrose synthase provides fructose and UDP-glucose, the latter presumed to be consumed in cell-wall reinforcement.

3.3.2. Low-N susceptible plants display atypical glutamate and aspartate accumulation following infection

Nitrogen can be assimilated by roots as NO_3^- or NH_4^+ . NO_3^- is first reduced to nitrite NO_2^- by the cytosolic nitrate reductase (NR) and further to NH_4^+ by the plastidial nitrite reductase (NiR). NH_4^+ is assimilated into amino acids via the glutamine synthetase/glutamine-2-oxoglutarate amino transferase (GS/GOGAT) cycle with the contribution of aminotransferases, glutamine synthetase (GS) and asparagine synthetase (ASN), transferring amino groups from glutamate on keto-acids derived from the TCA cycle (Mur *et al.* 2017). Aspartate and glutamate are the predominant amino acids in the leaves of tomato, representing between 47 and 70 % of the total soluble amino acids (Sung *et al.* 2012). Aspartate is a substrate for several amino acids biosynthesis and glutamate is the source of amino groups in the biosynthetic pathways of many amino acids. Asparagine and glutamine on the other hand contribute to long distance transport. The four amino acids are tightly co-regulated, as reflected by their positive correlations in our dataset (Figure IV.12), in both mock- and *Botrytis*-inoculated plants. They form a functional unit for N assimilation, storage and distribution, revolving around glutamate and ultimately determining the protein production potential.

Interplays between central N metabolism and plant-pathogens interaction, although not fully understood, may reflect opposites trophic strategies between biotrophic and necrotrophic fungi. Necrotrophic infections are known to impact central nitrogen metabolism

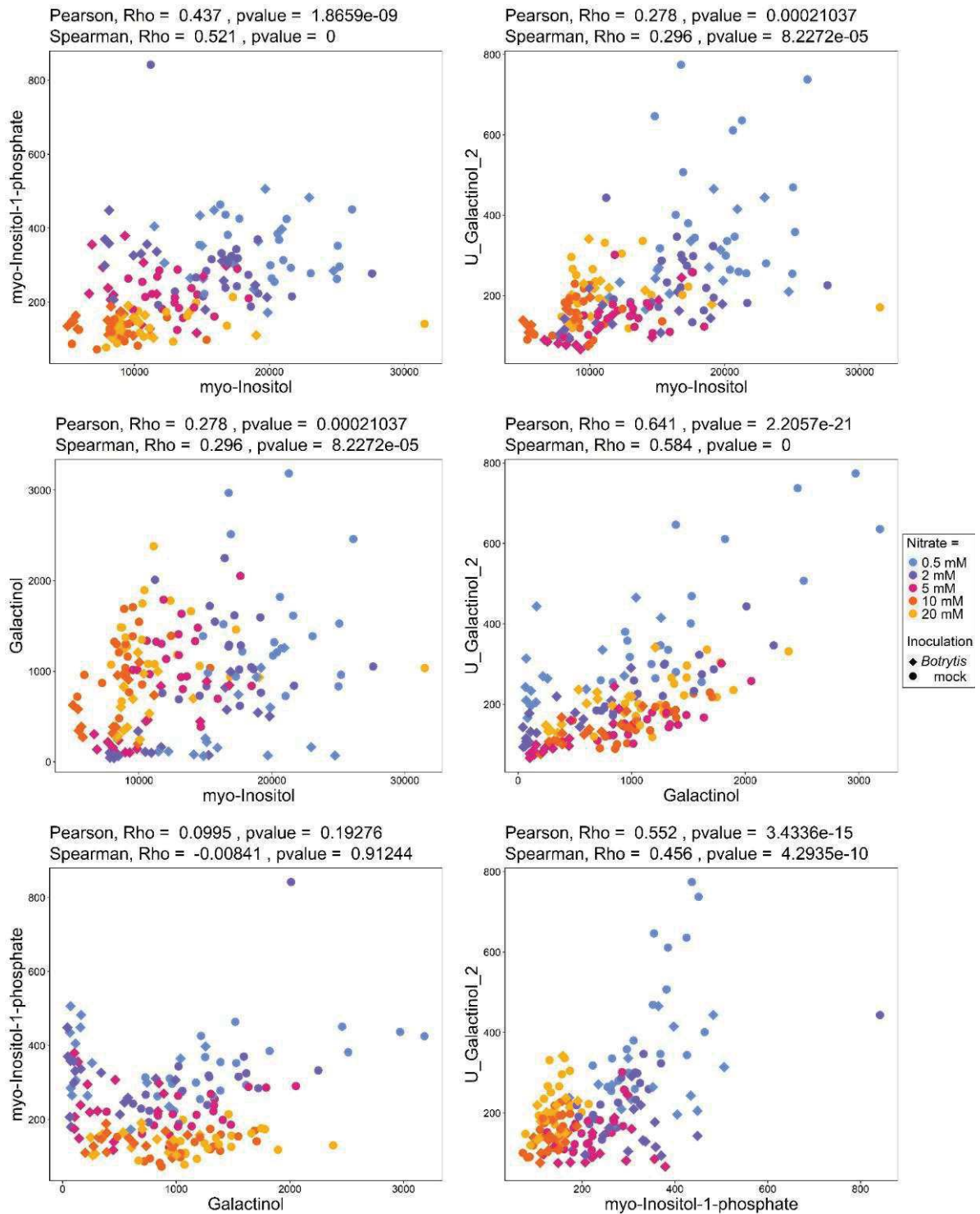


Figure IV.10 : Correlation plots of selected variables related to galactinol.

Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution.

in relation with senescence. Watanabe *et al.* (2013) mapped the metabolome changes during the senescence of Arabidopsis leaves. As cell death progressed with aging, glutamine, asparagine, BAACs, starch, sugars and their derivatives such as galactinol and myo-inositol increased. In contrast, soluble proteins, aspartate, glutamate and putrescine decreased. In *Nicotiana tabacum* leaves, the expression levels of *NR* and chloroplastic *GS* decreased with leaf age whereas the expression levels of glutamate dehydrogenase (*GDH*) and cytosolic *GS* increased (Pageau *et al.* 2006). Senescence is therefore characterized by a reduction in the pools of N-based compounds, with the exception of glutamine. These enzymes involved in primary nitrogen assimilation and senescence are also regulated during pathogen attack: fungal elicitors and oxidative stress activate *GDH* and cytosolic *GS* expression and repress chloroplastic *GS*. The cytosolic aspartate aminotransferase, another key enzyme for C / N balance, catalyzes the reversible transformation of aspartate into glutamate and was reported to be induced in Arabidopsis leaves after infection by *B. cinerea* (Brauc *et al.* 2011). Transgenic lines overexpressing this gene were more susceptible to *B. cinerea*. Even more interesting is the case of asparagine synthetase (*ASN*), which is activated for N remobilization during senescence (Gaufichon *et al.* 2010) and is transcriptionally induced in tomato leaves infected by *B. cinerea*, with a simultaneous depletion of the asparagine pool. This was interpreted as the sign of a pathogen-induced senescence, fueling the fungus with a high quality and quantity of N (Seifi *et al.* 2014). A concurring observation was made in tomato leaves infected by *Pseudomonas syringae*, which overexpressed a cytosolic *GS* (Pérez-García *et al.* 1998) and a cytosolic *ASN* in phloem cells (Olea *et al.* 2004), traducing a strong N mobilization in diseased tissues. Yang *et al.* (2017) proposed a stimulating model placing glutamate metabolism at the center of a binary survival strategy when plants are under attack. The “evasion” state is dedicated to fighting biotrophs by promoting fast senescence. It involves N remobilization away from the infection site, i.e. the export of glutamine and asparagine, ROS generation and TCA cycle exhaustion. On the contrary the “endurance” state is dedicated to fighting necrotrophs by countering cell death. It is characterized by the preponderance of N reutilization, i.e. N translocation towards the site of infection, ROS scavenging and replenishment of the TCA cycle. A consistent observation was made in *Botrytis*-infected sunflower: tissues adjacent to the necrotic spot displayed a glutamate depletion (Dulermo *et al.* 2009), while the *GDH* transcription was stimulated in invaded region, suggesting a glutamate transfer to invaded regions in order to delay senescence. Therefore, it seems to

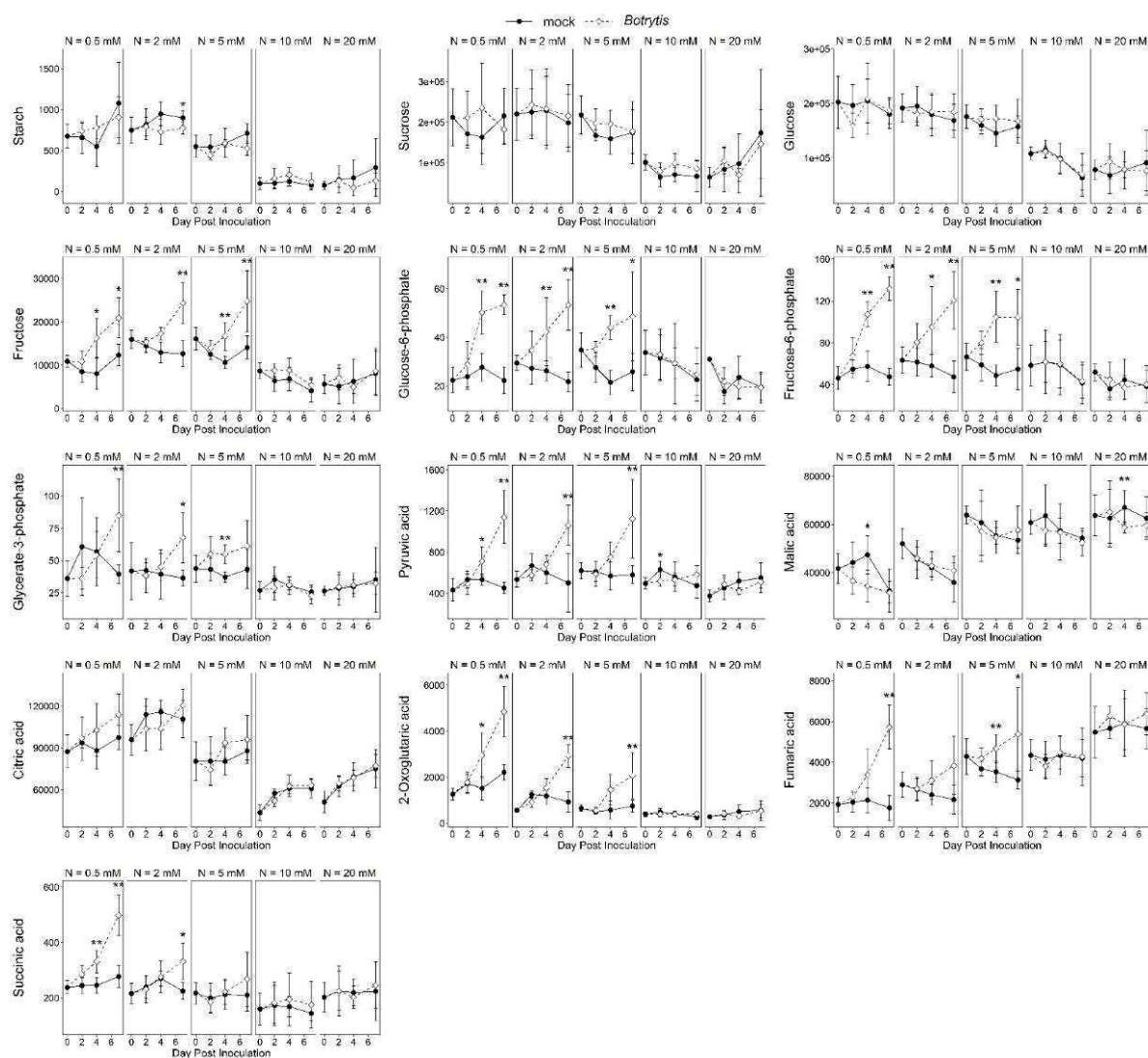


Figure IV.11 : Central C intermediates variations upon infection.

Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

exist in central N metabolism a signature of *Botrytis*-induced senescence and/or plant attempts to deal with it. In the present work, glutamate increased upon infection, as soon as 2 dpi under low N regimes, as well as aspartate, from 4 dpi to 7 dpi. Glutamine and asparagine however remained perfectly stable. Neither these variations in metabolites, nor the protein accumulation observed under low-N regime (Figure IV.12), fit with the hypothesis of a *Botrytis*-induced senescence, or a coordinated N transfer toward infected tissues.

Glutamate and aspartate are metabolic hubs very well buffered whereas their respective amines are prone to variations in relation to N assimilation and transportation. The glutamate levels in particular are known to remain steady, independent of time of day or nitrogen status, while on the contrary glutamine level displays huge diurnal variations (Scheible *et al.* 2000). Their variations in our experiment are intriguingly similar to that reported in *Arabidopsis atg* mutants, KO for autophagy associated membrane proteins (ATGs), which specifically accumulated glutamate and aspartate while glutamine and asparagine remained constant (Masclaux-Daubresse *et al.* 2014). The mutants also displayed enhanced amino acids and soluble proteins (Guiboileau *et al.* 2013; Masclaux-Daubresse *et al.* 2014). The authors explained this phenotype by a deficiency in N mobilization, N resources being trapped in the leaves by some defect in phloem loading or cell-to-cell amino acid translocation, independently of the senescence phenotypes also expressed by the mutants. The accumulation of glutamate and aspartate was interpreted as a blockage of autophagy, a fundamental catabolic mechanism by which nutrients are recycled, including proteins and organelles upon C or N starvation, abiotic stresses, as well as senescence (Xiong *et al.* 2005; Liu *et al.* 2009). However, a recent ¹³C metabolic flux analysis in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) provides an alternative explanation: autophagy degrades proteins and feeds the released amino acids to a series of transaminations and deaminations, specifically supporting glutamate and subsequently aspartate accumulation (Liu *et al.* 2021). Evidence shows that autophagy is not strictly a senescence process but acts as a pro-survival pathway, recycling damaged structures to sustain new biosynthesis that feed growth or proteome reconfiguration in a new challenging environment. Of the 35 ATG identified in *Arabidopsis*, 17 are involved in plant immunity. Autophagy is activated during *B. cinerea* infection, as revealed by transcriptomic studies (Windram *et al.* 2012) and was found to downregulate HR and PCD under *Pseudomonas syringae* attacks, in a SA-dependant manner (Yoshimoto *et al.* 2009). Van

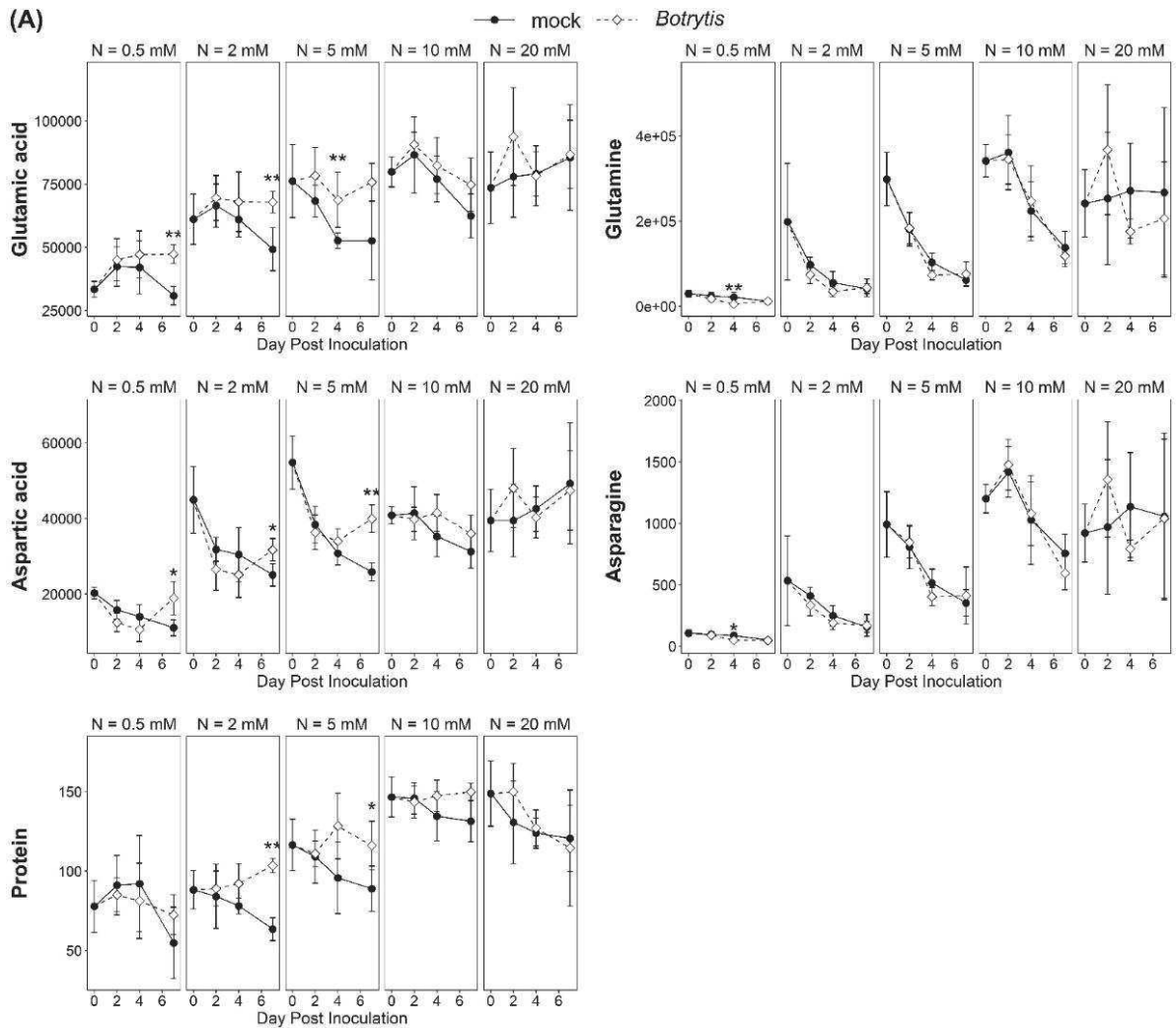


Figure IV.12 : Central N-metabolites variations upon infection.

(A) Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

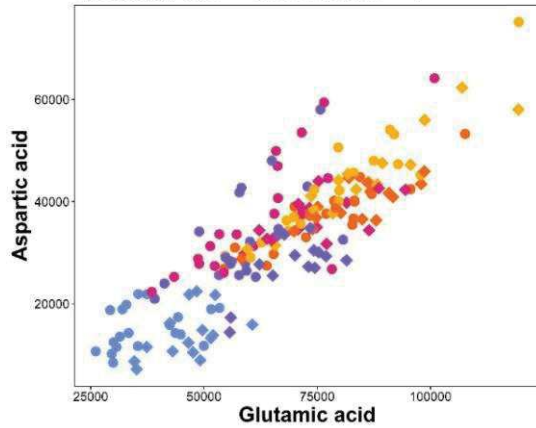
Baarlen *et al.* (2007) and Lai *et al.* (2011) have provided histological and molecular proofs that *B. cinerea* infection triggers autophagy in Arabidopsis leaves, with a strong induction of *ATG8A* in tissues adjacent to the lesion. Strikingly, *atg* KO mutants displayed enhanced susceptibility to necrotrophs, accelerated protein degradation and altered expression of defence genes. This was confirmed recently in a study of Arabidopsis *atg18a* KO, demonstrating the unequivocal protective effect of autophagy upon necrotroph infection (Zhang *et al.* 2021). The patterns of N metabolism observed in our experiment could thus reflect more the control of autophagy than the control of senescence.

3.4. Defence metabolic pathways are activated by *B. cinerea* in susceptible plants

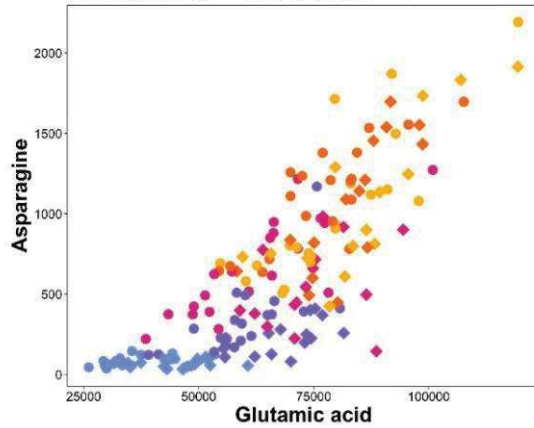
3.4.1. Glutathione

Fighting PCD is crucial to fight necrotrophs. Stress-generated ROS are usually kept under control in chloroplasts and cytosol by the ascorbate-glutathione cycle, a major redox regulation system. In our experiment, the constitutive levels of glutathione were higher under high N regimes and strongly increased under low N regimes after infection (Figure IV.13). Ascorbate variations however, were not much impacted by *B. cinerea*. The only significant difference was a slight reduction observed 7 dpi at 2 mM NO_3^- . These observations are consistent with previous reports by Simon *et al.* (2013): in infected Arabidopsis leaf tissues, *B. cinerea* triggered H_2O_2 accumulation and a drop in the antioxidant system, including ascorbate and glutathione pools, eventually leading to cell death. In the surrounding non-inoculated tissues however, the glutathione content rose gradually but failed at preventing chloroplastic H_2O_2 accumulation 4 dpi. In *Botrytis*-infected tomato leaves (Kuźniak and Skłodowska 1999; Kuźniak and Skłodowska 2004; Kuźniak and Skłodowska 2005), no change in total ascorbate and a decrease in total glutathione were observed after 5 days, whereas in non-inoculated leaves, a less pronounced decrease in total glutathione was measured. The authors also pointed out a shift in the redox status of these compounds, since dehydroascorbate was transiently increased and reduced glutathione was decreased. It was attributed to a drop in the antioxidant capacity, as ascorbate peroxidase, monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase activities declined. Such variations of ascorbate and glutathione pools were not observed in the present work and

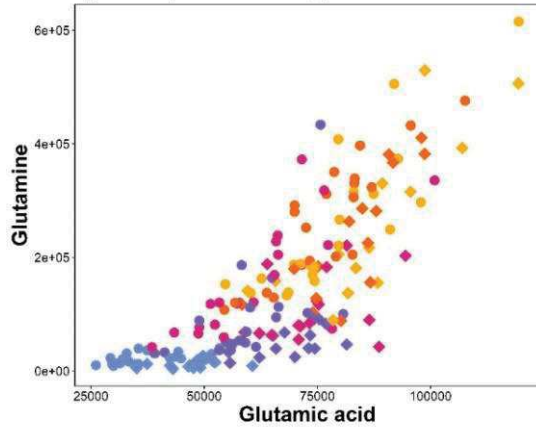
(B) Pearson, Rho = 0.857 , pvalue = 4.9266e-51
Spearman, Rho = 0.853 , pvalue = 0



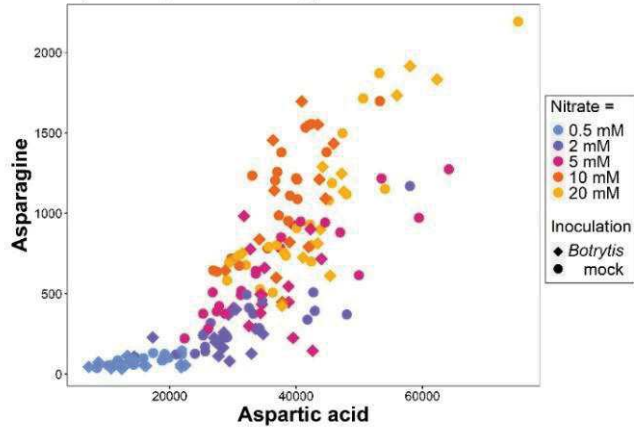
Pearson, Rho = 0.819 , pvalue = 4.7281e-43
Spearman, Rho = 0.831 , pvalue = 0



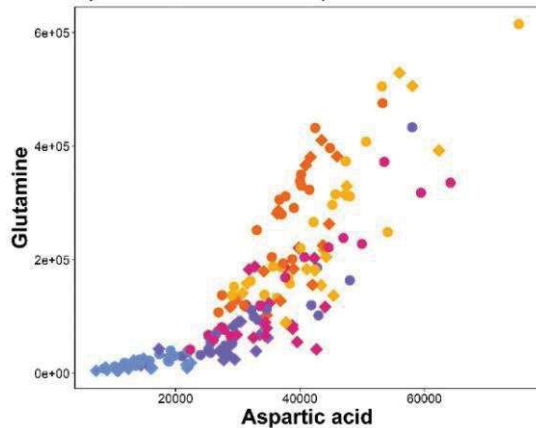
Pearson, Rho = 0.795 , pvalue = 5.0824e-39
Spearman, Rho = 0.821 , pvalue = 0



Pearson, Rho = 0.82 , pvalue = 2.743e-43
Spearman, Rho = 0.859 , pvalue = 0



Pearson, Rho = 0.835 , pvalue = 3.2569e-46
Spearman, Rho = 0.893 , pvalue = 0



Pearson, Rho = 0.969 , pvalue = 3.8579e-106
Spearman, Rho = 0.981 , pvalue = 0

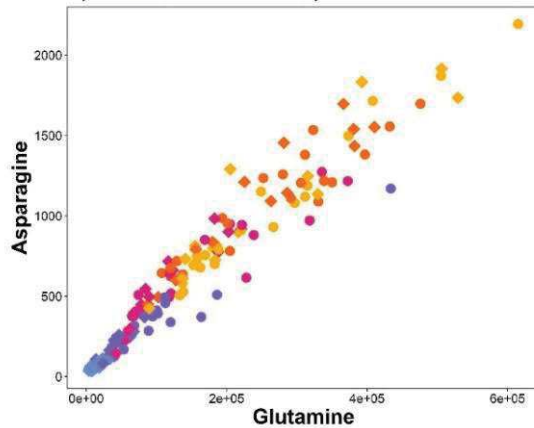


Figure IV.12 (continued) : Central N-metabolites variations upon infection.

(B) Correlation plots of selected variables.

overall, the trends suggest the setup of a powerful antioxidant system to fight the fungus spreading, which was constitutive under high N regimes and induced by infection under low N regimes.

3.4.2. Phenolic compounds

Tomato organs, including stems, are rich in secondary metabolites with antimicrobial activities (Tam *et al.* 2021). Several defence related compounds were accumulated under low N regimes after inoculation (Figure IV.9) and the shikimate pathway activation is visible through the accumulation of phenylalanine at very-low-N. The accumulation of tyrosine in stem was already observed after application of plant growth-promoting rhizobacteria and tyrosine-derived tyramine phenolic conjugates were detected in tomato, such as feruloyltyramine glycosides (Mhlongo *et al.* 2020). Rutin, a flavonoid, remained stable but chlorogenic acid massively accumulated, especially at medium-low-N, while its precursor quinic acid decreased. Chlorogenic acid is a major secondary metabolite found in every part of tomato plants, including stems (Kim *et al.* 2014). It has a direct antimicrobial activity, as demonstrated by the anti fungic activity of phenol extracts application (Mendoza *et al.* 2013; Patzke and Schieber 2018). Like other orthodiphenols, it also has a strong reducing power involved in ROS scavenging that can increase resistance to *B. cinerea* (Oliva *et al.* 2020). The phenylpropanoid pathway provides free phenolic compounds as building blocks for lignin biosynthesis. In *Arabidopsis*, ethylene-dependant phenylpropanoid and monolignols pathways are activated by *B. cinerea*, contributing to the cell wall reconfiguration (Lloyd *et al.* 2011). *B. cinerea* effectors such as BCGS1, a glucan 1,4- α -glucosidase, trigger ROS burst, phenylalanine-ammonia lyase and peroxidase activity, as well as lignin accumulation in tomato leaves (Yang *et al.* 2018). *B. cinerea* infection and elicitors such as chitosan induce the deposition of callose, a β -1,3-glucan polysaccharide (Nie *et al.* 2017; De Vega *et al.* 2021) in an ABA- and 12-oxo-phytodienoic acid-dependant manner (Ton and Mauch-Mani 2004; Scalschi *et al.* 2015). Callose deposition, by callose synthases, closes plasmodesmal apertures (Radford *et al.* 1998) and stops intercellular trafficking benefic to fungal invasion. Interestingly, the concentration in glucuronate, a precursor of cell wall sugars, was increased in inoculated medium-low-N plants, which is an indication of callose deposition. Another mechanism of cell wall reinforcement involves ferulic acid, shown to be implicated in the crosslinking of pectic polysaccharides and extensin, strengthening the cell-wall and making it less accessible to

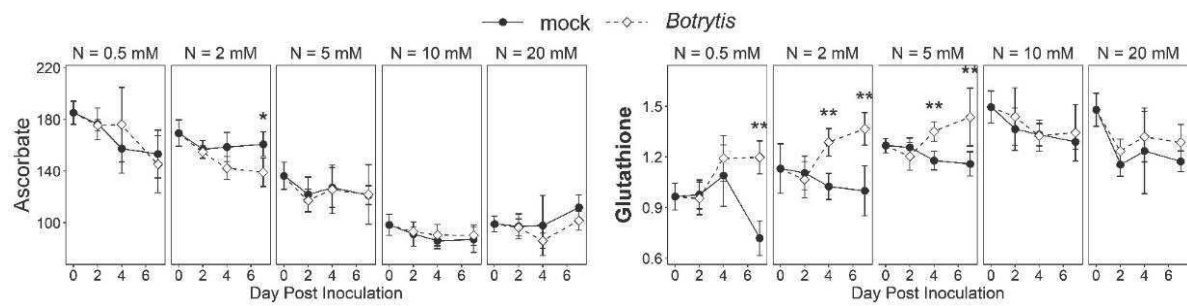


Figure IV.13 : Redox defence metabolites variations upon infection.

Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

fungal degrading enzymes (Reem *et al.* 2016). Here, trans-sinapyl alcohol, the precursor of S lignin, decreased especially under very-low-N regime. This could either mean an accelerated consumption of sinapyl alcohol to produce lignin, or a downregulation of the pathway by *B. cinerea* effectors. The former explanation is the most probable, since in wheat, a highly localized ten-fold increase in sinapyl alcohol dehydrogenase activity was observed in lignifying tissues after elicitation (Wheat *et al.* 1994).

3.4.3. Steroidal glycoalkaloids

Tomatine and dehydrotomatine are steroidal glycoalkaloids found in every part of the tomato plant: the highest contents are found in young leaves, where they can accumulate up to 5 % of the fresh mass, then in the stem where its concentration is three times lower (Kim *et al.* 2014). Tomatine however, is about 30 times more abundant in stems than chlorogenic acid. Steroidal glycoalkaloids biosynthesis occurs from cholesterol through glycoalkaloid metabolism (GAME) genes organized in metabolic clusters coding for cytochrome P450s, a dioxygenase and a transaminase (Itkin *et al.* 2013). Interestingly, the transamination is catalyzed by GAME12, one of the four GABA-T isoforms found in the tomato genome, using GABA as a donor, which connects tomatine with primary defence metabolism. The GAME12 protein is probably cytosolic since it lacks a N-terminal addressing sequence, in contrast with other GABA-T involved in the GABA shunt and addressed to the mitochondria or the chloroplast (Sonawane *et al.* 2020). Hydroxytomatine is then produced by GAME31, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (Cárdenas *et al.* 2019). It is thought that tomatine owes its toxic properties to its ability to interact with 3-beta-hydroxy-sterols such as cholesterol, inducing the disruption of pathogen membranes (Steel and Drysdale 1988). An alternative mode of action was also described in the hemibiotroph *Fusarium oxysporum*. It involves a rapid ROS burst triggering PCD in the fungus (Ito *et al.* 2007). Some researches stated that necrotrophic fungi are susceptible to host plant-induced PCD in the early stage of their development, just after germination (Shlezinger *et al.* 2011; Lin *et al.* 2020) and that tomatine and its catabolites might play a role in it (Ito *et al.* 2004).

In this work, α -tomatine and dehydrotomatine were positively correlated (Figure IV.14). In mock-inoculated plants, despite their nitrogenous nature, they were more abundant under low N regimes, behaving like typical C-based compounds, probably because of their very high

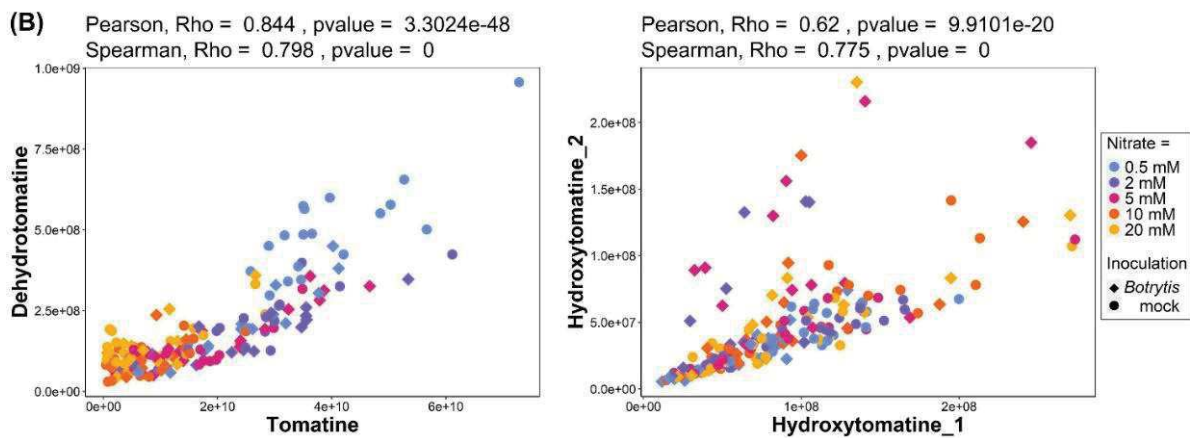
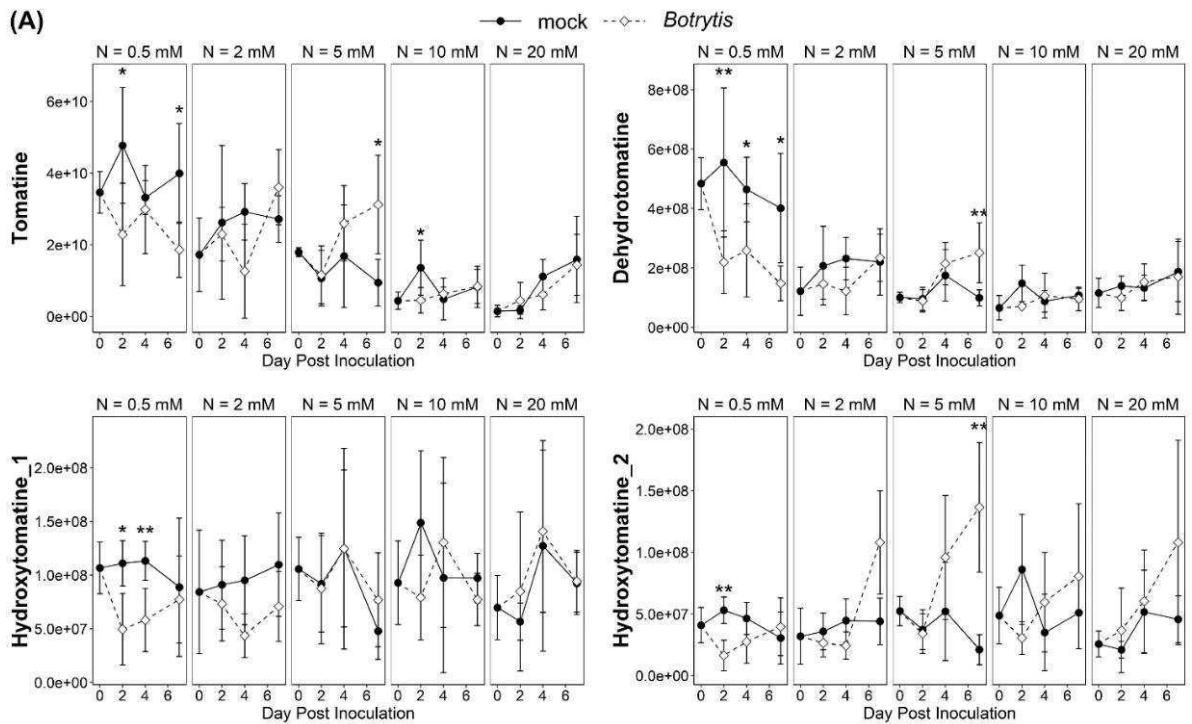


Figure IV.14 : N-based defence compounds variations upon infection

(A) Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants. (B) Correlation plots of selected variables.

C / N ratio (Hoffland *et al.* 1999). After inoculation they were both depleted under very-low-N regime and accumulated in plants grown upon 5 mM NO₃⁻. Hydroxytomatine_2, one isomer of hydroxytomatine (Cárdenas *et al.* 2019), followed a similar trend but accumulated to a greater extent under medium-low-N regimes, and even under high-N regimes, although not in a statistically significant way. According to our data, steroidal alkaloids might be associated with susceptibility. Pathogenic fungi are usually not susceptible to tomatine and most of them degrade it to less toxic tomatidine by full deglycosylation (Sandrock and VanEtten 1998). Most *B. cinerea* strains also exhibit another tomatinase activity, removing the xylose moiety and releasing β1-tomatine (Quidde *et al.* 1998). If such a mechanism occurred in our experiment, it was efficient only under very-low-N regimes. This result contrasts with that reported by Hoffland *et al.* (1999), perhaps because of the localization in asymptomatic stems near an infection spot, where tomatinase might not have not penetrated yet.

3.4.4. Polyamines and GABA

In this experiment, putrescine and spermidine accumulated over time after inoculation under low N regimes (Figure IV.15). GABA however, only accumulated in very-low-N plants, reaching the constitutive level measured under high N regimes 7 dpi. This is consistent with reports of polyamines accumulation for several days after *B. cinerea* infection, both in the necrotic spot and in adjacent pathogen-free tissues (Marina *et al.* 2008; Nambeesan *et al.* 2012; van Rensburg *et al.* 2021). No apparent competition between GABA and either putrescine or glutamate was observed here, in contrary to what was reported by Brauc *et al.* (2011). Polyamines are nitrogenous basic metabolites with many hormonal and structural functions. They are involved in plant growth, development and stress responses (Chen *et al.* 2019) and interconnected with the metabolic pathways of ET, GABA, nitric oxide (NO), and ABA. Their biosynthesis starts with the formation of putrescine produced from amino acids by an arginine decarboxylase (ADC) or ornithine decarboxylase. Then putrescine is converted to spermidine and finally spermine by a spermidine synthase and a spermine synthase respectively. The complete oxidation of polyamines by polyamine oxidases leads to putrescine, further convertible to GABA via Δ¹-pyrroline (Shelp *et al.* 2012).

The physiological significance of polyamines in plant-pathogen interactions seems to depend on the pathogen life-style: beneficial against biotrophs and detrimental against

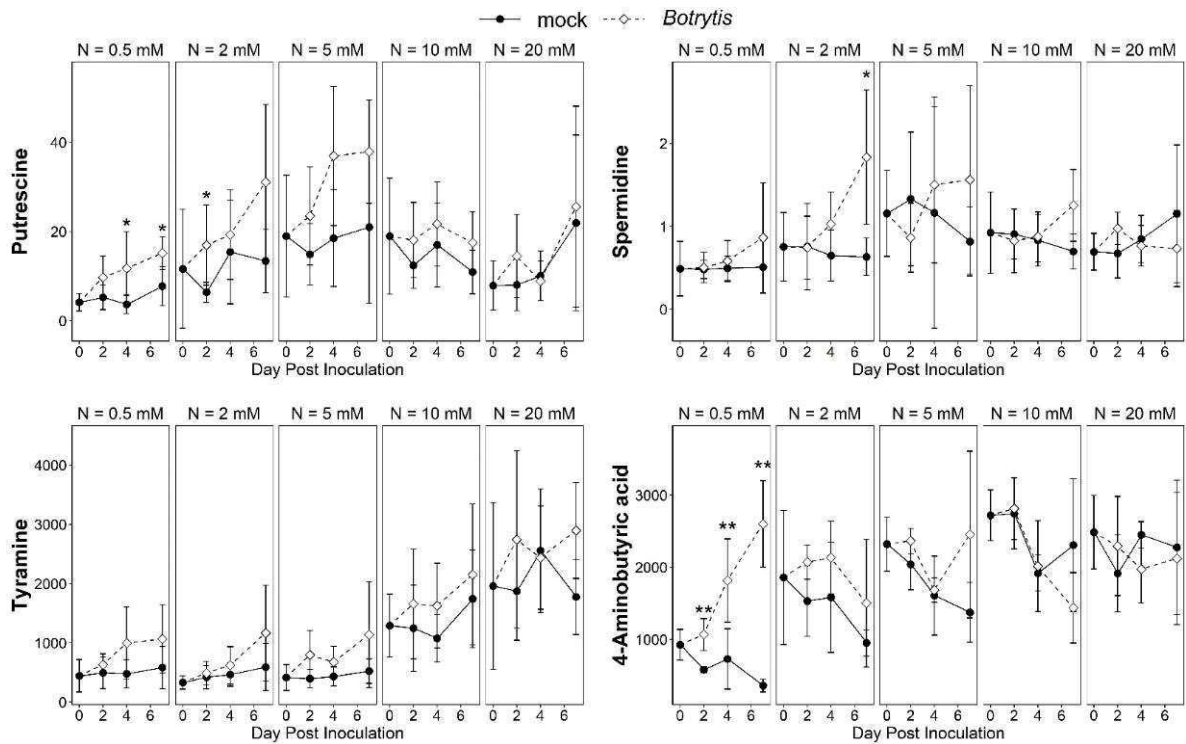


Figure IV.15 : Polyamines and GABA variations upon infection.

Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

necrotrophs (Marina *et al.* 2008). Confusing results have been reported so far when using transgenic lines and exogenous polyamines applications. Transgenic tomato lines expressing the yeast spermidine synthase and accumulating spermidine were more susceptible to *B. cinerea* than the wild-type in relation with a downregulation of ET biosynthetic pathway and an upregulation of the SA pathway (Nambeesan *et al.* 2012). This strongly suggests a pro-PCD action of spermidine favorable to the pathogen. On the other hand an ADC-silenced Arabidopsis line displayed drastically reduced polyamines levels and was also more susceptible to *B. cinerea*. Pre-treatment of Arabidopsis plants sprayed with polyamines proved to prime resistance against *B. cinerea*, but higher concentrations provoked cell death (van Rensburg *et al.* 2021), while tobacco leaf disk infiltrations with polyamines before *S. sclerotiorum* inoculation increased the subsequent lesion size (Marina *et al.* 2008). These contradictions might originate in the amounts of polyamines accumulated and their nature; the tetra-amine spermine was more effective than spermidine in priming Arabidopsis resistance (van Rensburg *et al.* 2021). Moreover, tobacco infiltrated with spermine triggered a stronger level of cell death than putrescine or spermidine (Kim *et al.* 2013). Over all, these results seem to underline the importance of the timing and quantity of polyamines. Both biosynthesis and degradation of polyamines are activated by necrotrophs (Kim *et al.* 2013; Hatmi *et al.* 2014), increasing the apoplastic production of H₂O₂ by polyamine catabolic enzymes: copper diamine oxidases and PAOs (Hatmi *et al.* 2014). This ROS burst could participate to defence via cell wall strengthening and host-cell death in HR, the later favoring necrotrophic fungus colonization. As we see, the activation of polyamines and GABA pathway could ambiguously be interpreted as a pro cell death attack or a defence mechanism.

GABA is a non-proteogenic amino acid, mainly synthesized from glutamate by the glutamate decarboxylase in the cytosol and degraded by GABA transaminase to succinate semialdehyde, finally oxidized to succinate by succinate semialdehyde dehydrogenase. An alternative route for GABA synthesis is the oxidation of putrescine by diamine oxidase, generating 4-aminobutyraldehyde and H₂O₂, followed by a reduction by either 4-aminobutyraldehyde dehydrogenase or pyrroline dehydrogenase (Shelp *et al.* 2012). The former is an anaplerotic pathway, called the GABA shunt of the TCA cycle, linking isocitrate and succinate by recycling the carbon backbone 2-oxoglutarate produced by isocitrate deshydrogenase, feeding glutamate deshydrogenase for glutamate synthesis (Li *et al.* 2021).

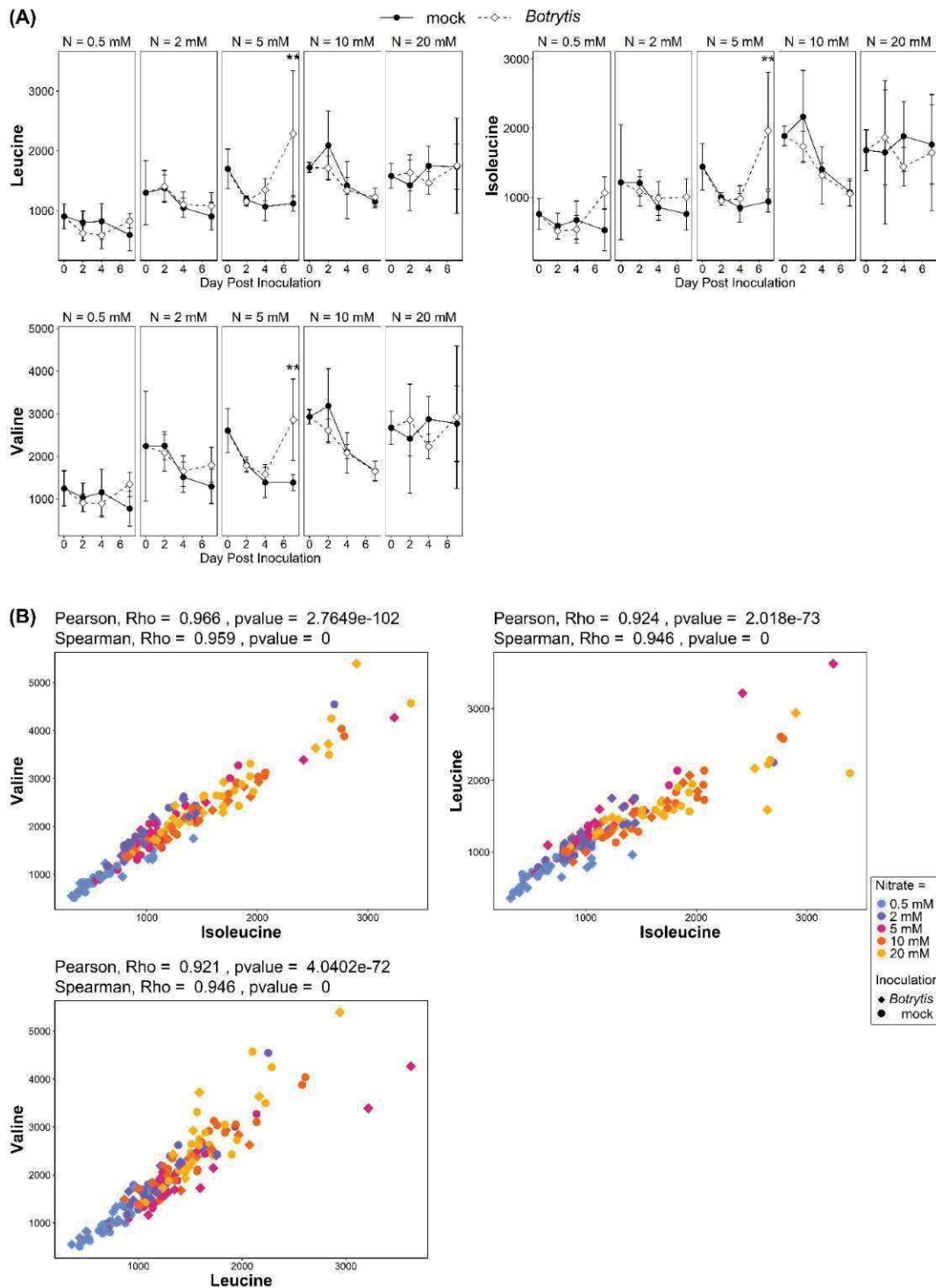


Figure IV.16 : Branched-chained amino acids variations upon infection

(A) Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p -value < 0.05) and ** (p -value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants. (B) Correlation plots of selected variables.

The early accumulation of GABA and succinate under low N regimes can be interpreted as a rapid activation of the GABA shunt ensuring the constant replenishment of the TCA cycle to afford the defence-associated costs. This position in central metabolic pathways inserts GABA simultaneously in plant development, C / N balancing, biotic and abiotic stress responses and signaling (Tarkowski *et al.* 2020). Using the *sitiens* ABA-deficient mutants, virus-induced gene silencing and pharmacological approaches, it was demonstrated that during the interaction between tomato leaf disks and *B. cinerea*, maintenance of cell viability in distal tissues via GS/GOGAT and GABA metabolisms is crucial for resistance (Seifi *et al.* 2013). This work revealed early cell death alleviating mechanisms in the cells surrounding the infected epiderm, highlighting the importance of the timing and localization of the responses. It was stated that GS/GOGAT supplied 2-oxoglutarate C skeletons channeled into the TCA cycle via the GABA shunt, which sustained a pro-survival / anti-cell death defence. Application of exogenous GABA to the leaf disks, with or without GABA shunt inhibitors, also underlined the positive role of this pathway in resistance. It also suggests that GABA has a direct positive role in addition to this TCA cycle anaplerotic function. Indeed, exogenous GABA treatment on Arabidopsis leaves showed its priming properties, implicating the control of ROS burst (van Rensburg and Van den Ende 2020). This antioxidant activity of GABA was found to occur at least via the regulation of ROS scavenging enzymes in tomato fruits (Yang *et al.* 2017). A strong accumulation of GABA, as observed in very-low-N and medium-low-N plants in the present study, could thus either help reduce oxidative stress levels and counter senescence induced by the fungus, or indicate a blockage of its catabolism and a degraded anaplerotic function.

3.4.5. Branched-chain amino acids

BCAAs levels are highly correlated (Figure IV.16) in the present dataset, revealing a strong co-regulation of their metabolic pathways. They are constitutively lower under N deprivation, but increase 4 dpi, very moderately under very-low-N regime but more significantly in plants grown upon 5 mM NO₃⁻. BCAAs are known to accumulate in plants in response to osmotic stress (Lugan *et al.* 2010) and nitrogen starvation (Huang and Jander 2017). Under osmotic stress, it was shown that BCAAs accumulation comes mainly from intensive protein degradation (Huang and Jander 2017). An involvement in response to biotic stresses has been pointed out as well by different studies. BCAAs accumulate in Arabidopsis leaves challenged by SAR-inducing *Pseudomonas syringae* (Návarová *et al.* 2013). In *Triticum*

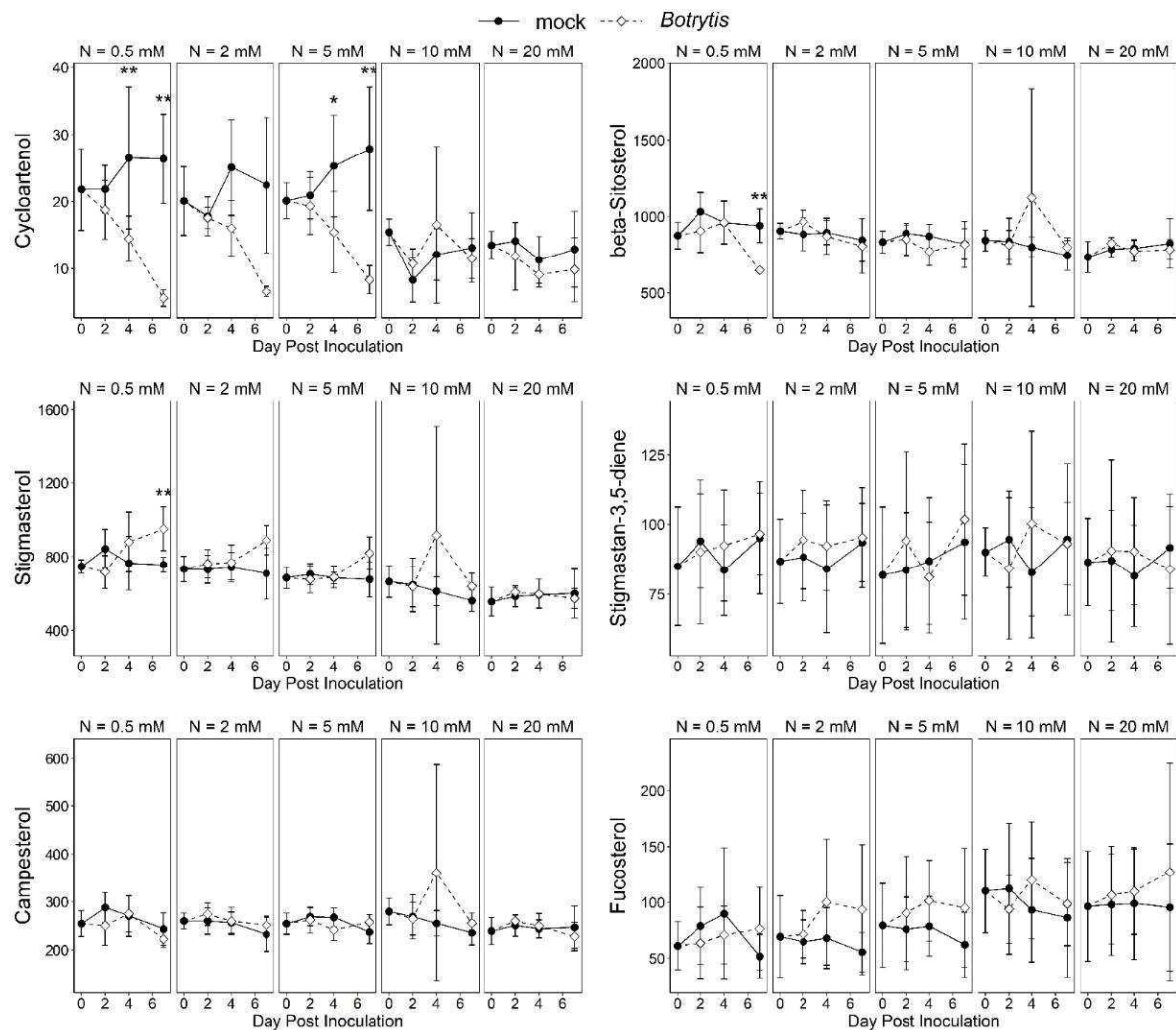


Figure IV.17 : Phytosterols variations upon infection

Metabolites levels measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plants fertilized with five nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

annuum, 37 genes involved in BCAAs biosynthetic processes were differentially expressed after yellow rust infection (Corredor-Moreno *et al.* 2021). The authors focused on the control exerted by a branched-chain amino acid aminotransferase, BCAT1, involved in BCAAs degradation. They also found a positive correlation between resistance and levels of BCAAs. The function of BCAAs metabolism as a « block » in plant-pathogen interactions is still unknown. In the case of isoleucine however, it is worth mentioning its role as precursor of defence-related compounds. Isoleucine is the precursor of the bioactive jasmonate-derived jasmonoyl-isoleucine, involved in response to *B. cinerea* (Aubert *et al.* 2015). It is also the precursor of isoleucic acid, ubiquitous in plant kingdom and involved in plant defence (von Saint Paul *et al.* 2011; Bauer *et al.* 2020). Moreover, we report herein the induction of 2-methylmalate (citramalate) accumulation under low N regimes after inoculation. The 2-methylmalate pathway has only been discovered recently in plants (Sugimoto *et al.* 2021). It produces isoleucine from pyruvate and acetyl-coA, bypassing the aspartate/threonine regular pathway. The contribution of this pathway in defence is unknown, but in the transcriptomic study published by Vega *et al.* (2015), the most intensely overexpressed gene in tomato leaves infected by *B. cinerea* encoded for a threonine dehydratase, the enzyme involved in the first step of isoleucine biosynthesis, confirming that isoleucine plays a particular role in defence.

3.4.6. Phytosterols

Phytosterols are triterpenic derivatives of the mevalonate pathway whose biosynthesis starts with cycloartenol. Campesterol, stigmasterol and sitosterol are the most abundant sterols in plant and important components of the membranes. Cholesterol is also produced from cycloartenol in plants, usually in low amounts, but in *Solanaceae* it is the precursor of defence steroidal glycoalkaloids (Sonawane *et al.* 2016). In the stem under low N regimes we observed a dramatic fall in cycloartenol after infection (Figure IV.17), that could be interpreted either as an upstream downregulation of the entire pathway, or a strong stimulation of the downstream productions depleting the pool of precursors. The latter option is more likely in the present case since no major change in downstream phytosterols was induced by infection. In very-low-N plants, we observed a significant change in the stigmasterol to β -sitosterol ratio. A similar shift toward stigmasterol accumulation and its incorporation into membranes has been reported in *Arabidopsis* infected by *Pseudomonas syringae* and *B. cinerea* (Griebel and Zeier 2010). It correlated with the pathogen-associated molecular patterns (PAMP)- and ROS-

triggered transcriptional induction of *CYP710A1*, a C22 desaturase responsible for most of the sitosterol conversion into stigmasterol. No link was found between this metabolic process and SA, JA, ET or HR. Interestingly, the study of the *cyp710A1* KO mutant showed that stigmasterol accumulation is a susceptibility factor in *Pseudomonas*- but not in *Botrytis*-infected plants. Later work reported a probable role of *CYP710A1* in the control of nutrient efflux into the apoplast, by maintaining membrane integrity. However, it reported opposite observation about resistance and suggested stigmasterol accumulation reflect a plant attempt to reduce membrane permeability and *de facto* dry out nutrients transport toward the apoplast (Wang *et al.* 2012).

3.5. N-deficiency impairs constitutive and inducible N-related defences

Overall, the results suggest that back of the front line, tissues adjacent to the necrotic spot are undergoing *B. cinerea* remote attacks and aim at maintaining plant cells alive. In this grey zone however, it is difficult to sort out what metabolic changes reflect the setup of a defence mechanism by the plant or a manipulation by the fungus. Despite the apparent lack of defence induction under high-N regimes, the variations in alanine and galactinol prove that these healthy tissues were nevertheless impacted by the nearby infection. Changes in metabolic fluxes that would not translate into changes in metabolic pools cannot be ruled out, but it can be assumed that strong constitutive defences are also responsible for the resistance observed under non-limiting N supply. The importance of constitutive defence was highlighted in the tomato ABA-deficient mutant *sitiens*, which showed high constitutive defence gene expression and enhanced resistance to *B. cinerea* thank to timely, localized oxidative bursts, leading to rapid epidermal cell wall fortification and high induction of defence-related gene expression (Asselbergh *et al.* 2007). The accumulation of secondary metabolites constitute an unlikely effective constitutive defense, since rutin, chlorogenic acid or α -tomatine were constitutively less abundant in resistant plants. They were not even induced under high-N regimes after inoculation, excepted maybe an isomer of hydroxytomatine. On the other hand, proteins were constitutively far more abundant in resistant plants. The rapid setup of defence implies proteome reconfiguration upon pathogen detection. Signaling cascades include many proteins such as MAP kinases (Li *et al.* 2014) or histone H2B monoubiquitination enzymes (Zhang *et al.* 2015). Plants also produce proteins counteracting fungal effectors such as

polygalacturonases-inhibiting proteins in grapevine (Joubert *et al.* 2006) and pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* (Lionetti *et al.* 2007, 2017). Supporting a weakening of the proteic lines of defence under nitrogen limitation, the enzymatic chitinase or peroxidase were found constitutively lowered under low N regime (Dietrich *et al.* 2004). A lack of proteins in the susceptible plants may thus be a serious initial handicap, impairing attack detection, signaling or inducible defences. Among the observed metabolic responses attributable to defence activation, some were quantitatively limited and barely reached the constitutive levels found under high N regimes, like proteins and glutathione. This quantitative limitation was also visible when considering the respective metabolome upon 0.5 and 5 mM NO_3^- (Figure IV.8): very-low-N plants cannot accumulate central amino acids, BCAAs or polyamines to the same level than less deficient plants.

Consequently, it appears that under low N regimes, plants lack important N-related constitutive defence mechanisms and fail at implement quantitative sufficient induced defences.

4. Conclusions

This work is, to our knowledge, the first metabolomic exploration of tomato stems infected by *B. cinerea*. The involvement of galactinol, alanine, cycloartenol and citramalate in the response to *B. cinerea* is also reported here for the first time. A major surprise was the lack of changes induced by infection in the metabolic pools of resistant plants grown at high nitrogen regimes. This indicated the importance of other resistance mechanisms, which can only develop under non-limiting N supply. High levels of proteins could confer constitutive defences or superior proteome reconfiguration capabilities after attack. In contrast, the metabolome of susceptible plants grown under nitrogen deficiency showed massive changes following inoculation. No obvious sign of senescence was detected in the tissues adjacent to the necrotic lesions. On the contrary, several confirmed or more elusive defence systems against necrotrophs were activated, including accumulation of antimicrobial compounds, antioxidants and reconfigurations of central metabolism with a possible role in systemic oxidative stress control. This supports the setting of an endurance strategy, aiming at delaying cell-death even under low N regime. However, all these changes proved to be unable to provide effective resistance, perhaps because of their limited amplitude or their slowness in

a context of N deprivation. None of the findings reported here explain the opposite effects of nitrogen deficiency on resistance to *B. cinerea* in different species, such as tomato and *Arabidopsis*. A direct comparative study would probably be necessary to address this question. Another limitation of this work is probably the lack of information about the reallocation of metabolic pools from or to other organs, while it is a fundamental process occurring in the stems. Some of the variations we observed could originate in distant transport fluxes that were not assessed. Future differentiated analysis at finer spatial scales, including analysis of the epidermis, parenchyma, and conducting vessels, could provide a better understanding of these fluxes.

5. Methods

5.1. Plant materials

Obtention of biological samples was describe in Lacrampe *et al.* (2021). Briefly, tomato plants (*Solanum lycopersicum* CV “Clodano” ; Syngenta, Wilmington, DE, USA) were grown in glasshouse from February to March 2018. Seven weeks after germination, plants were fertigated with five nutrient solutions containing NO₃⁻ concentrations of 0.5, 2, 5, 10 and 20 mM. Thirty-five plants were used for each NO₃⁻ treatment, corresponding to seven batches of five biological replicates, sampled just before inoculation [0 days post-inoculation (dpi)], and then 2, 4 and 7 dpi (one batch of mock-inoculated and one batch of *Botrytis*-inoculated plants at each date). Inoculations were carried out on the petiole stubs (5-7 mm long) that remained on the stems after excision of the sixth leaf. The wounds received a 10-μL aliquot of either the spore solution (*Botrytis*-inoculated plants) or sterile water (mock-inoculated plants). Two-cm long fragments of symptomless stem were collected between the fifth and sixth internode. The collected samples were immediately frozen in liquid nitrogen and ground into fine powder with liquid nitrogen using a mixer mills (MM301, Retsh, Haan, Germany) at a frequency of 30 Hz for 30 s. The fresh powders were stored at - 80°C until analysis.

5.2. Growth parameters

The height of the plants was measured from photographs taken at the time of sampling, using ImageJ software. The water content was determined from an additional series of

samples whose mass was measured before and after drying in the oven for five days. A third series of stem pieces was collected near the pieces used for the metabolomics analysis, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . We measured the fresh mass and estimated their diameter and volume, based on photographs, considering these portions of stem as a cylinder. These measurements allowed to calculate the dry mass of stem per unit of length.

5.3. Chemicals

Methanol (MeOH, LC-MS grade, $\geq 99.9\%$) was purchased from Honeywell (Charlotte, NC, USA). Chloroform (CHCl_3 stabilized with ethanol) and hexane (both for analysis, $99+\%$), ethanol absolute (EtOH, laboratory reagent grade), acetonitrile (ACN, LC-MS grade, $\geq 99.9\%$) and formic acid (FA, LC-MS grade) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Sulfuric acid (H_2SO_4 , ACS reagent, $95.0\text{-}98.0\%$) and sodium chloride (NaCl , $\geq 99.5\%$) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q system (Merck, Darmstadt, Germany) with a resistance of $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ at 25°C . Standard substances used for identification were of analytical grade and purchased from different suppliers.

5.4. Metabolites extraction

The extraction protocol derived from Bligh and Dyer (1959). 60 mg of frozen fresh powder was extracted for 15 minutes at 70°C under constant stirring, with $600 \mu\text{L}$ of MeOH containing $104.2 \mu\text{M}$ of ribitol and taxifolin as internal standards. Then, $450 \mu\text{L}$ of CHCl_3 was added and samples were incubated under stirring for 10 minutes at 37°C . Finally, $650 \mu\text{L}$ of H_2O was added. Samples were centrifuged at $21,600 \text{ g}$ during 5 minutes at 4°C . Both solvent phases were collected and analysed. The upper phase containing water and methanol was used for the analysis of primary metabolites, amino acids, polyamines, and phenolic compounds. The lower phase containing chloroform was used for the analysis of phytosterols. In order to exhaust the matrix, the extraction was performed twice on the same powder and fractions were pooled before analysis. All collected extracts were stored at -80°C until analysis. Polar extracts were filtered before analysis using $0.20 \mu\text{m}$ filters with 4 mm PTFE hydrophilic membrane (Milles-LG, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

5.5. GC-EI-TOF Analysis

Data acquisition was performed on a 7890B GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) fit out with MultiPurpose Sampler (Gerstel GmbH & Co, Mülheim, Germany), split/splitless injector, Zebron ZB-SemiVolatiles 34.590 m × 0.25 mm × 0.25 μm column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and Pegasus BT TOF mass spectrometer (LECO, St. Joseph, MI, USA). 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). Polar extracts were derivatized online before injection: 50 μL of extract was dried, then incubated in 50 μL of a pyridine solution containing 20 mg.mL⁻¹ of methoxyamine hydrochloride under constant shaking at 600 rpm and 80°C for 30 min. Then, 80 μL of BSTFA containing a mixture of 9 n-alkanes (14 μM decane, 29.3 μM dodecane, 0.3 μM pentadecane, 21.6 μM octadecane, 18.6 μM nonadecane, 19.3 μM docosane, 27.8 μM octacosane, 25.9 μM dotriacontane and 18.7 μM hexatriacontane) were added before heating for 30 min at 80°C under constant shaking at 600 rpm. Apolar extract were derivatized online before injection: 50 μL of extract were dried and 50 μL of pyridine followed by 100 μL of BSTFA containing the mixture of n-alkanes were added before heating for 30 min at 80°C under constant shaking at 600 rpm. One microliter of sample was injected in splitless mode at 270°C. Helium was used as carrier gas at 1.0 mL.min⁻¹. The initial oven temperature was kept at 70°C for 1 min and then increased to 220°C at a rate of 9°C/min, and then increased to 330°C at a rate of 15°C/min and maintained for 5 min. The m/z scan range was 50-630 with a cycle time of 10 scans/s and an acquisition delay of 310 s. Source temperature and transfer line were set at 250°C.

5.6. UPLC–DAD–ESI–TQ Analysis

Data acquisition was performed with an Acquity I-Class UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) hyphenated to a mass spectrometer Xevo TQ-XS (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source. The system was controlled by MassLynx Version 4.1 (Waters, Milford, MA, USA).

Chromatographic separation of amino acids and polyamines was achieved using an Acquity 1.7 μm BEH C18 UPLC column (50 x 2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA) and an Acquity

BEH C18 1.7 μm UPLC pre-column (Waters, Milford, MA, USA). Samples were derivatized with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit, Waters, Milford, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. One microliter of derivatized sample was injected in the chromatographic system. Separation was carried out at a constant temperature of 55°C and flow rate of 0.7 mL.min⁻¹ using H₂O:FA 99.9:0.1 v/v (A) and ACN:FA 99.9:0.1 v/v (B) as eluents. The chromatographic gradient started with 99.9% solvent (A) and changed as follows, 0.54 min: 99.9%, 4.5 min: 96.9%, 6.5 min: 90.9%, 8.5 min: 78.8%, 9.9 min: 40.4%, 10.5 min: 40.4%, 10.6 min: 99.9%, 12 min: 99.9%. The source temperature was set at 150°C and the desolvation temperature 500°C. The capillary voltage was set at 3.1 kV. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas at 150 L.h⁻¹ for the gas flow and 1000 L.h⁻¹ for the desolvation gas flow. Compounds were analysed in positive mode, using a Multiple Reactions Monitoring (MRM) method described in Supplementary Table S1.

Chromatographic separation of phenolic compounds was achieved on an Acquity 1.7 μm BEH C18 UPLC column (50 x 2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA) and an Acquity HSS T3 1.8 μm UPLC pre-column (Waters, Milford, MA, USA). Two microliters of sample were injected in the chromatographic system. Separation was carried out at a constant temperature of 35°C and flow rate of 0.4 mL.min⁻¹, using H₂O:FA 99.9:0.1 v/v (A) and ACN:FA 99.9:0.1 v/v (B) as eluents. The chromatographic gradient started with 98% solvent (A), and changed as follows, 0.5 min: 98%, 6.5 min: 55.5%, 7.5 min: 0%, 9 min: 0%, 9.5 min: 98%, 10 min: 98%. The source temperature was set to 150 °C and the desolvation temperature was set to 500 °C. The capillary voltage was set to 3.10 kV. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas at 150 L.h⁻¹ for the gas flow and 1000 L.h⁻¹ for the desolvation gas flow. Phenolic compounds were analyzed in positive mode using a Multiple Reactions Monitoring method described in Supplementary Table S1.

Chromatographic separation of steroidal glycoalkaloids was achieved using an Acquity 1.7 μm BEH C18 UPLC column (50 x 2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA) and an Acquity BEH C18 1.7 μm UPLC pre-column (Waters, Milford, MA, USA). One microliter of derivatized sample was injected in the chromatographic system. Separation was carried out at a constant temperature of 40°C and flow rate of 0.4 mL.min⁻¹ using H₂O:FA 99.9:0.1 v/v (A) and ACN:FA 99.9:0.1 v/v (B) as eluents. The chromatographic gradient started with 95% solvent (A) and changed as follows, 0.25 min: 95%, 1.25 min: 80%, 3.75 min: 75%, 4.25 min: 75%, 5.50 min:

68%, 5.55 min: 0%, 8.00 min: 0%, 8.05 min: 95%, 11.00 min: 95%. The source temperature was set at 150°C and the desolvation temperature 550°C. The capillary voltage was set at 3.2 kV. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas at 150 L.h⁻¹ for the gas flow and 1000 L.h⁻¹ for the desolvation gas flow. Compounds were analysed in positive mode, using a Multiple Reactions Monitoring (MRM) method described in Supplementary Table S1.

5.7. HPLC-FLR Amino acids

Major amino acids (Aspartic acid, Glutamic acid, Asparagine, Glutamine and Proline) were analysed after AccQ-Tag chemical derivatization as described above, on a HPLC system Alliance 2695 separation module (Waters, Milford, MA, USA) paired to a 2475 fluorescence detector (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was achieved using AccQ-Tag 4 µm Amino Acid Analysis column (3.9 x 150 mm, Waters, Milford, MA, USA). The chromatography system with fluorescence detector were controlled by Chromeleon Version 7.2.10 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Separation was carried out at a constant temperature of 37°C and flow rate of 1 mL.min⁻¹, using sodium acetate buffer (A), ACN (B) and UP Water (C) as eluents. The chromatographic gradient started with 100% solvent (A) and changed as follows, 1 min: 99% (A) and 1% (B), 16 min: 97% (A) and 3% (B), 22 min: 94% (A) and 6% (B), 37 min: 86% (A) and 14% (B), 42 min: 86% (A) and 14% (B), 50 min (82% (A) and 18% (B), 51 min: 0% (A) and 60% (B), 54 min: 100% (A), 63 min: 100% (A). The sodium acetate buffer was prepared daily by mixing 1 L of filtered sodium acetate 140 mM, 964 µL of triethylamine and 1 mL of EDTA 2.7 mM then pH was adjusted to 5.8 using H₃PO₄ 8.5%. Derivatized amino acids were detected by fluorimetry using an excitation wave length of 250 nm and an emission wave length of 395 nm.

5.8. Other analysis

Total glutathione was quantified as GSSG equivalent by enzymatic assay (Massot *et al.* 2013). The reduced and oxidized forms of ascorbate were quantified by enzymatic assay (Sérino *et al.* 2019). Starch was measured by enzymatic assay in glucose equivalent (Biais *et al.* 2014). Total protein was quantified by Bradford assay (Biais *et al.* 2014). The cell wall corresponds to the insoluble material obtained after successive washes with MeOH and acetone and starch determination (Renard *et al.* 1990).

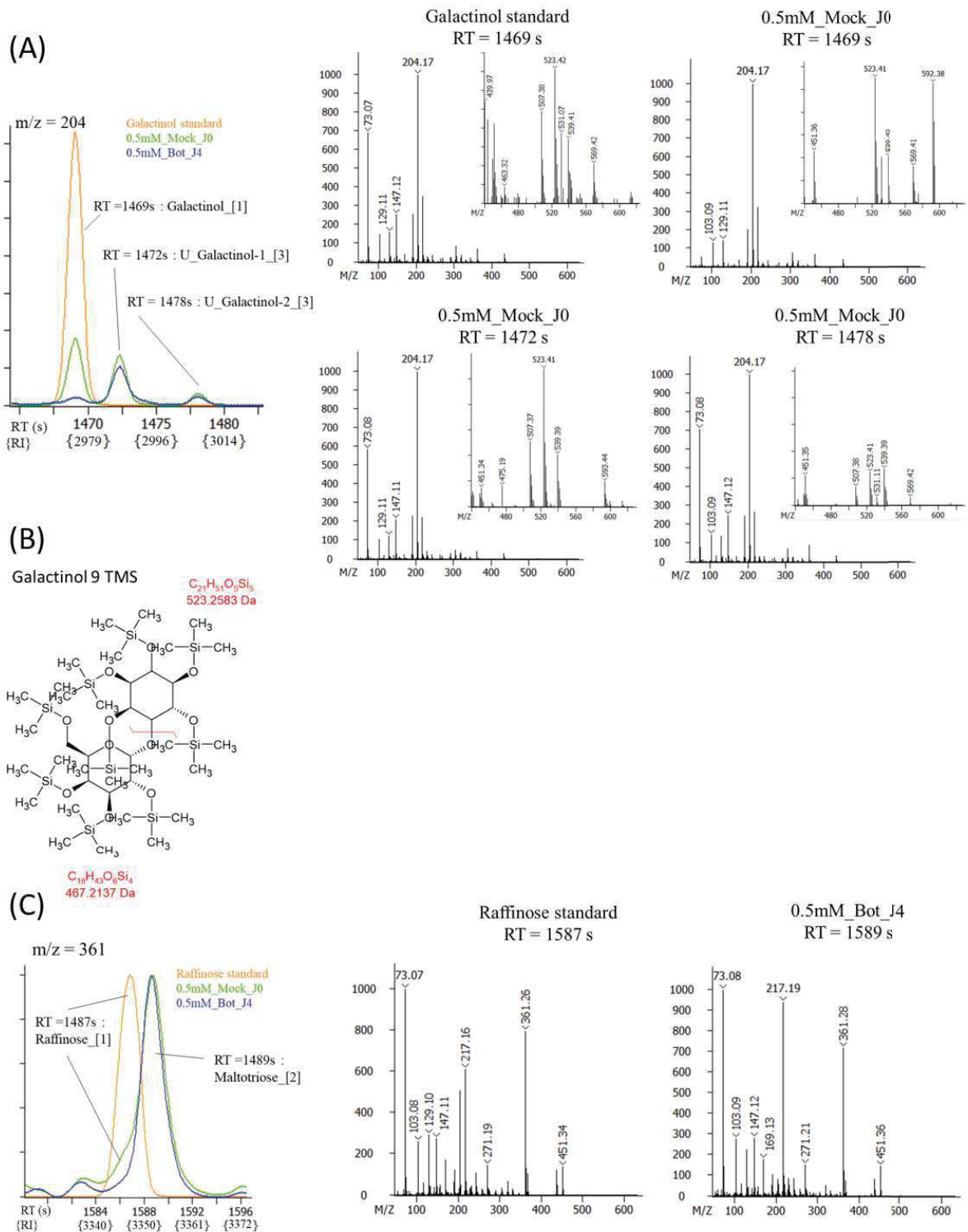


Figure IV.18 : GC-MS identification of galactinol and raffinose.

The identification level of each molecule is indicated between brackets after its name. (A) Extracted ion chromatogram 204 and mass spectra from pure galactinol standard solution and tomato stem polar extracts; full spectra and zooms on high m/z are shown. (B) Tentative interpretation of the 523 ion in the galactinol mass spectrum as the myo-inositol-5TMS moiety. (C) Extracted ion chromatogram 361 and mass spectra from pure raffinose standard solution and tomato stem polar extracts.

5.9. Data processing

5.9.1. GC-MS

GC-MS data files were converted in order to be processed for automatic peak integration using TargetLynx XS module (Waters, Milford, MA, USA). Peak annotation was achieved using the Golm mass spectral and retention index library (Hummel *et al.* 2007). A specific extracted ion chromatogram was chosen for each molecule for integration; then peak areas were normalized against the sample dry weight, the internal standard (adonitol) and the extraction volume. Peak integration was performed using one iteration of mean smoothing and apex tracking. The relative amount (semi-quantification) of 102 metabolites was established in samples: 50 of them were identified at level 1 confidence, 37 at level 2 and 15 at level 3, according to Sumner *et al.* (2007) (Supplementary Table S1). The presence of galactinol in the sample extracts was confirmed by injection of a pure standard. Both retention time and mass spectrum of the peak eluted at 1469 s matched that of galactinol (Figure VI.18). Two putative galactinol isomers, U_galactinol_1 and U_galactinol_2 were also found in the sample extracts, displaying high spectrum similarity to galactinol (reverse match of 953 and 955 respectively) with the characteristic presence of the ion 523, tentatively identified as the myo-inositol-5TMS moiety. The presence of raffinose in sample extracts was confirmed by the injection of a reference standard, however the peak could not be integrated due to its partial co-elution with a more abundant compound putatively identified as the maltotriose, whose mass spectrum is very close to that of raffinose.

5.9.2. Statistics

Data plots of variables that are not discussed are shown in Supplementary Figure S1. Given the limited number of biological replicates data were extensively treated with multivariate statistics and non-parametric tests performed with R software. Multivariate analysis were performed using the ropls package (Thévenot *et al.* 2015). The heatmap was performed using the ComplexHeatmap package (Gu *et al.* 2016).

6. Acknowledgments

This study was conducted with the financial support of the European Regional Development Fund, the French government, the Sud Provence-Alpes-Côte d'Azur Region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon. N.L. was supported by a PhD fellowship of the Federative Research Structure Tersys Plateforme 3A. We thank F. De Bruyne, L. Touloumet, C. Le Bourvellec, C. Cassan and Y. Gibon for their expert technical assistance.

7. Author contributions

N.L., P.N. and F.L. performed the experiments ; N.L. did the metabolomic analysis and contributed to datamining ; F.L. and S.C. designed the research ; D.D. analyzed ascorbate, glutathione, asparagine, glutamine, glutamate and aspartate ; L.R. performed data mining and wrote the article.

References

- Allwood JW, Williams A, Uthe H, et al. 2021. Unravelling plant responses to stress—the importance of targeted and untargeted metabolomics. *Metabolites* **11**.
- Asad MAU, Zakari SA, Zhao Q, Zhou L, Ye Y, Cheng F. 2019. Abiotic stresses intervene with aba signaling to induce destructive metabolic pathways leading to death: Premature leaf senescence in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**.
- Asselbergh B, Curvers K, França SC, et al. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* **144**: 1863–1877.
- Aubert Y, Widemann E, Miesch L, Pinot F, Heitz T. 2015. CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Experimental Botany* **66**: 3879–3892.
- Van Baarlen P, Woltering EJ, Staats M, Van Kan JAL. 2007. Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: An important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology* **8**: 41–54.
- Bari R, Jones JDG. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473–488.
- Bauer S, Mekonnen DW, Geist B, et al. 2020. The isoleucic acid triad: Distinct impacts on plant defense, root growth, and formation of reactive oxygen species. *Journal of Experimental Botany* **71**: 4258–4270.
- Biais B, Bénard C, Beauvoit B, et al. 2014. Remarkable reproducibility of enzyme activity profiles in tomato fruits grown under contrasting environments provides a roadmap for studies of fruit metabolism. *Plant Physiology* **164**: 1204–1221.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**: 911–917.
- Brauc S, De Vooght E, Claeys M, Höfte M, Angenon G. 2011. Influence of over-expression of cytosolic aspartate aminotransferase on amino acid metabolism and defence responses against *Botrytis cinerea* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1813–1819.
- Bryant JP, Chapin FS, Klein DR. 1983. Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos* **40**: 357.
- Camañes G, Scalschi L, Vicedo B, González-Bosch C, García-Agustín P. 2015. An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum*, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas sy*. *Plant Journal* **84**: 125–139.
- Cárdenas-Navarro R, Adamowicz S, Robin P. 1999. Nitrate accumulation in plants: A role for water. *Journal of Experimental Botany* **50**: 613–624.
- Cárdenas PD, Sonawane PD, Heinig U, et al. 2019. Pathways to defense metabolites and evading fruit bitterness in genus *Solanum* evolved through 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. *Nature Communications* **10**: 1–13.
- Chaouch S, Noctor G. 2010. Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide. *New Phytologist* **188**: 711–718.
- Chen D, Shao Q, Yin L, Younis A, Zheng B. 2019. Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–13.
- Cho SM, Kang EY, Kim MS, et al. 2010. Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Botany* **88**: 452–461.
- Corredor-Moreno P, Minter F, Davey PE, et al. 2021. The branched-chain amino acid aminotransferase TaBCAT1 modulates amino acid metabolism and positively regulates wheat rust susceptibility. *Plant Cell* **33**: 1728–1747.
- Cramer MD, Hawkins HJ, Verboom GA. 2009. The importance of nutritional regulation of plant water flux. *Oecologia* **161**: 15–24.
- Diab H, Limami AM. 2016. Reconfiguration of N metabolism upon hypoxia stress and recovery: Roles

- of alanine aminotransferase (AlaAt) and glutamate dehydrogenase (GDH). *Plants* **5**: 345–367.
- Dietrich R, Ploß K, Heil M. 2004.** Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* **27**: 896–906.
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010.** Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548.
- Donahue JL, Alford SR, Torabinejad J, et al. 2010.** The *Arabidopsis thaliana* myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *Plant Cell* **22**: 888–903.
- Dulermo T, Rasclé C, Chinnici G, Gout E, Bligny R, Cotton P. 2009.** Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: From plant hexoses to mannitol. *New Phytologist* **183**: 1149–1162.
- Elsayed AI, Rafudeen MS, Gollack D. 2014.** Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress. *Plant Biology* **16**: 1–8.
- Friedman M. 2002.** Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 5751–5780.
- Garcia A, Martinez M, Diaz I, Santamaria ME. 2021.** The Price of the Induced Defense Against Pests: A Meta-Analysis. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–15.
- Gaufichon L, Reisdorf-Cren M, Rothstein SJ, Chardon F, Suzuki A. 2010.** Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science* **179**: 141–153.
- Govrin EM, Levine A. 2000.** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**: 751–757.
- Griebel T, Zeier J. 2010.** A role for β -sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant Journal* **63**: 254–268.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M. 2016.** Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**: 2847–2849.
- Guiboileau A, Avila-Ospina L, Yoshimoto K, et al. 2013.** Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability. *New Phytologist* **199**: 683–694.
- Hannah MA, Zuther E, Buchel K, Heyer AG. 2006.** Transport and metabolism of raffinose family oligosaccharides in transgenic potato. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3801–3811.
- Hatmi S, Trotel-Aziz P, Villaume S, Couderchet M, Clément C, Aziz A. 2014.** Osmotic stress-induced polyamine oxidation mediates defence responses and reduces stress-enhanced grapevine susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* **65**: 75–88.
- Hermes DA, Mattson WJ. 1992.** The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**: 283–335.
- Hoffland E, Van Beusichem ML, Jeger MJ. 1999.** Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil* **210**: 263–272.
- Hu L, Zhou K, Ren G, et al. 2020.** Myo-inositol mediates reactive oxygen species-induced programmed cell death via salicylic acid-dependent and ethylene-dependent pathways in apple. *Horticulture Research* **7**: 1–13.
- Huang T, Jander G. 2017.** Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **246**: 737–747.
- Hummel J, Selbig J, Walther D, Kopka J. 2007.** The Golm Metabolome Database: a database for GC-MS based metabolite profiling. *Current* **75**: 95.
- Itkin M, Heinig U, Tzfadia O, et al. 2013.** Biosynthesis of antinutritional alkaloids in solanaceous crops is mediated by clustered genes. *Science* **341**: 175–179.
- Ito SI, Eto T, Tanaka S, Yamauchi N, Takahara H, Ikeda T. 2004.** Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Letters* **571**: 31–34.
- Ito S ichi, Ihara T, Tamura H, et al. 2007.** α -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters* **581**: 3217–3222.
- Ivanov Kavkova E, Blöchl C, Tenhaken R. 2019.** The Myo-inositol pathway does not contribute to ascorbic acid synthesis. *Plant Biology* **21**: 95–102.
- Joubert DA, Slaughter AR, Kemp G, et al. 2006.** The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Research* **15**: 687–702.
- Kim MS, Cho SM, Kang EY, et al. 2008.** Galactinol Is a Signaling Component of the Induced Systemic Resistance Caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6

- Root Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **21**: 1643–1653.
- Kim NH, Kim BS, Hwang BK. 2013.** Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and γ -aminobutyric acid signaling in cell death and defense response. *Plant Physiology* **162**: 2067–2083.
- Kim DS, Na H, Kwack Y, Chun C. 2014.** Secondary metabolite profiling in various parts of tomato plants. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* **32**: 252–260.
- Kunz C, Vandelle E, Rolland S, et al. 2006.** Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytologist* **170**: 537–550.
- Kuźniak E, Skłodowska M. 2004.** The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany* **55**: 605–612.
- Kuźniak E, Skłodowska M. 1999.** The effect of *Botrytis cinerea* infection on ascorbate-glutathione cycle in tomato leaves. *Plant Science* **148**: 69–76.
- Kuźniak E, Skłodowska M. 2005.** Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**: 192–200.
- Lacrampe N, Lopez-Lauri F, Lugan R, et al. 2021.** Regulation of sugar metabolism genes in the nitrogen-dependent susceptibility of tomato stems to *Botrytis cinerea*. *Annals of Botany* **127**: 143–154.
- Lai Z, Wang F, Zheng Z, Fan B, Chen Z. 2011.** A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant Journal* **66**: 953–968.
- Larbat R, Le Bot J, Bourgaud F, Robin C, Adamowicz S. 2012.** Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. *Plant Biology* **14**: 760–769.
- Lecompte F, Abro MA, Nicot PC. 2010.** Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology* **59**: 891–899.
- Lecompte F, Abro MA, Nicot PC. 2013.** Can plant sugars mediate the effect of nitrogen fertilization on lettuce susceptibility to two necrotrophic pathogens: *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*? *Plant and Soil* **369**: 387–401.
- Lecompte F, Nicot PC, Ripoll J, et al. 2017.** Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Annals of Botany* **119**: 931–943.
- Lemonnier P, Gaillard C, Veillet F, et al. 2014.** Expression of Arabidopsis sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology* **85**: 473–484.
- Li L, Dou N, Zhang H, Wu C. 2021.** The versatile GABA in plants. *Plant Signaling and Behavior* **16**.
- Li X, Zhang Y, Huang L, et al. 2014.** Tomato SIMKK2 and SIMKK4 contribute to disease resistance against *Botrytis cinerea*. *BMC Plant Biology* **14**: 1–17.
- Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT. 2003.** Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes and Development* **17**: 2636–2641.
- Limami AM, Glévarec G, Ricoult C, Cliquet JB, Planchet E. 2008.** Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2325–2335.
- Lin CH, Pan YC, Ye NH, Shih YT, Liu FW, Chen CY. 2020.** LsGRP1, a class II glycine-rich protein of *Lilium*, confers plant resistance via mediating innate immune activation and inducing fungal programmed cell death. *Molecular Plant Pathology* **21**: 1149–1166.
- Lionetti V, Fabri E, De Caroli M, et al. 2017.** Three pectin methylesterase inhibitors protect cell wall integrity for arabidopsis immunity to *Botrytis*. *Plant Physiology* **173**: 1844–1863.
- Lionetti V, Raiola A, Camardella L, et al. 2007.** Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **143**: 1871–1880.
- Liu K, Sutter BM, Tu BP. 2021.** Autophagy sustains glutamate and aspartate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during nitrogen starvation. *Nature Communications* **12**.
- Liu Y, Xiong Y, Bassham DC. 2009.** Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* **5**: 954–963.
- Lloyd AJ, William Allwood J, Winder CL, et al. 2011.** Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Journal* **67**: 852–868.
- Løvdaal T, Olsen KM, Slimestad R, Verheul M, Lillo C. 2010.** Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic

- compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* **71**: 605–613.
- Lugan R, Niogret MF, Leport L, et al. 2010.** Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant Journal* **64**: 215–229.
- Marina M, Maiale SJ, Rossi FR, et al. 2008.** Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology* **147**: 2164–2178.
- Masclaux-Daubresse C, Clément G, Anne P, et al. 2014.** Stitching together the multiple dimensions of autophagy using metabolomics and transcriptomics reveals impacts on metabolism, development, and plant responses to the environment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 1857–1877.
- Massot C, Bancel D, Lauri FL, et al. 2013.** High temperature inhibits ascorbate recycling and light stimulation of the ascorbate pool in tomato despite increased expression of biosynthesis genes. *PLoS ONE* **8**: 1–13.
- Mendoza L, Yañez K, Vivanco M, Melo R, Cotoras M. 2013.** Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* **43**: 360–364.
- Meng PH, Raynaud C, Tcherkez G, et al. 2009.** Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **4**.
- Meyer RC, Steinfath M, Lisec J, et al. 2007.** The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4759–4764.
- Mhlongo MI, Piater LA, Steenkamp PA, Labuschagne N, Dubery IA. 2020.** Metabolic profiling of PGPR-treated tomato plants reveal priming-related adaptations of secondary metabolites and aromatic amino acids. *Metabolites* **10**.
- Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG. 2007.** Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **49**: 1108–1121.
- Moore JW, Herrera-Foessel S, Lan C, et al. 2015.** A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* **47**: 1494–1498.
- Mulema JMK, Denby KJ. 2012.** Spatial and temporal transcriptomic analysis of the *Arabidopsis thaliana*-*Botrytis cinerea* interaction. *Molecular Biology Reports* **39**: 4039–4049.
- Mur LAJ, Simpson C, Kumari A, Gupta AK, Gupta KJ. 2017.** Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of Botany* **119**: 703–709.
- Nambeesan S, AbuQamar S, Laluk K, et al. 2012.** Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiology* **158**: 1034–1045.
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring AC, Zeier J. 2013.** Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* **24**: 5123–5141.
- Nie P, Li X, Wang S, Guo J, Zhao H, Niu D. 2017.** Induced systemic resistance against *botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–12.
- Nishizawa-Yokoi A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2008.** The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant Signaling and Behavior* **3**: 1016–1018.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2008.** Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**: 1251–1263.
- Olea F, Pérez-García A, Cantón FR, et al. 2004.** Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant and Cell Physiology* **45**: 770–780.
- Oliva M, Hatan E, Kumar V, et al. 2020.** Increased phenylalanine levels in plant leaves reduces susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Plant Science* **290**: 110289.
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C. 2006.** The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and

- reactive oxygen species in Nicoti. *Journal of Experimental Botany* **57**: 547–557.
- Patzke H, Schieber A. 2018.** Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate - ferulic acid as a natural pesticide against *Botrytis cinerea*. *Food Research International* **113**: 18–23.
- Pérez-García A, Pereira S, Pissarra J, et al. 1998.** Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta* **206**: 426–434.
- Pitsili E, Phukan UJ, Coll NS. 2020.** Cell death in plant immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **12**.
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, et al. 2010.** Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant Journal* **62**: 785–795.
- Quidde T, Osbourn AE, Tudzynski P. 1998.** Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 151–165.
- Rabara RC, Tripathi P, Reese RN, et al. 2015.** Tobacco drought stress responses reveal new targets for Solanaceae crop improvement. *BMC Genomics* **16**.
- Radford JE, Vesik M, Overall RL. 1998.** Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma* **201**: 30–37.
- Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, et al. 2012.** Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **35**: 1483–1499.
- Reem NT, Pogorelko G, Lionetti V, et al. 2016.** Decreased polysaccharide feruloylation compromises plant cell wall integrity and increases susceptibility to necrotrophic fungal pathogens. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–15.
- Renard CMGC, Voragen AGJ, Thibault JF, Pilnik W. 1990.** Studies on apple protopectin: I. Extraction of insoluble pectin by chemical means. *Carbohydrate Polymers* **12**: 9–25.
- Renau-Morata B, Molina RV, Minguet EG, et al. 2021.** Integrative transcriptomic and metabolomic analysis at organ scale reveals gene modules involved in the responses to suboptimal nitrogen supply in tomato. *Agronomy* **11**.
- van Rensburg HCJ, Van den Ende W. 2020.** Priming with γ -aminobutyric acid against *botrytis cinerea* reshuffles metabolism and reactive oxygen species: Dissecting signalling and metabolism. *Antioxidants* **9**: 1–22.
- van Rensburg HCJ, Limami AM, Van den Ende W. 2021.** Spermine and spermidine priming against *botrytis cinerea* modulates ROS dynamics and metabolism in Arabidopsis. *Biomolecules* **11**: 1–25.
- Rossi FR, Gárriz A, Marina M, et al. 2011.** The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 888–896.
- Rossi FR, Krapp AR, Bisaro F, Maiale SJ, Pieckenstein FL, Carrillo N. 2017.** Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Journal* **92**: 761–773.
- Royer M, Larbat R, Le Bot J, Adamowicz S, Robin C. 2013.** Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato? *Phytochemistry* **88**: 25–33.
- von Saint Paul V, Zhang W, Kanawati B, et al. 2011.** The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell* **23**: 4124–4145.
- Sakhno LO, Yemets AI, Blume YB. 2019.** The role of ascorbate-glutathione pathway in reactive oxygen species balance under abiotic stresses. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms* **1**: 89–111.
- Sandrock RW, VanEtten HD. 1998.** Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin α -tomatine. *Phytopathology* **88**: 137–143.
- Scalschi L, Sanmartín M, Camaño G, et al. 2015.** Silencing of OPR3 in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *Plant Journal* **81**: 304–315.
- Scheible WR, Krapp A, Stitt M. 2000.** Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during

- nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1155–1167.
- Seifi HS, Curvers K, De Vleeschauwer D, Delaere I, Aziz A, Höfte M. 2013.** Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. *New Phytologist* **199**: 490–504.
- Seifi HS, De Vleeschauwer D, Aziz A, Höfte M. 2014.** Modulating plant primary amino acid metabolism as a necrotrophic virulence strategy. *Plant Signaling & Behavior* **9**: e27995.
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder AL. 2015.** Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–11.
- Sérino S, Costagliola G, Gomez L. 2019.** Lyophilized tomato plant material: Validation of a reliable extraction method for the analysis of vitamin C. *Journal of Food Composition and Analysis* **81**: 37–45.
- Sestari I, Campos ML. 2021.** Into a dilemma of plants: the antagonism between chemical defenses and growth. *Plant Molecular Biology*.
- Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, Zarei A, Deyman KL, Brikis CJ. 2012.** Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science* **193–194**: 130–135.
- Shlezinger N, Minz A, Gur Y, et al. 2011.** Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathogens* **7**.
- Simon UK, Polanschütz LM, Koffler BE, Zechmann B. 2013.** High Resolution Imaging of Temporal and Spatial Changes of Subcellular Ascorbate, Glutathione and H₂O₂ Distribution during *Botrytis cinerea* Infection in Arabidopsis (J-Y Liu, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e65811.
- Sonawane PD, Jozwiak A, Panda S, Aharoni A. 2020.** ‘Hijacking’ core metabolism: a new panache for the evolution of steroidal glycoalkaloids structural diversity. *Current Opinion in Plant Biology* **55**: 118–128.
- Sonawane PD, Pollier J, Panda S, et al. 2016.** Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nature Plants* **3**.
- Soulie MC, Koka SM, Floch K, et al. 2020.** Plant nitrogen supply affects the *Botrytis cinerea* infection process and modulates known and novel virulence factors. *Molecular Plant Pathology* **21**: 1436–1450.
- Steel CC, Drysdale RB. 1988.** Electrolyte leakage from plant and fungal tissues and disruption of liposome membranes by α -tomatine. *Phytochemistry* **27**: 1025–1030.
- Strack D, Gross W, Wray V, Grotjahn L. 1987.** Enzymic Synthesis of Caffeoylglucaric Acid from Chlorogenic Acid and Glucaric Acid by a Protein Preparation from Tomato Cotyledons. *Plant Physiology* **83**: 475–478.
- Sugimoto N, Engelgau P, Daniel Jones A, Song J, Beaudry R. 2021.** Citramalate synthase yields a biosynthetic pathway for isoleucine and straight- And branched-chain ester formation in ripening apple fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, et al. 2007.** Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* **3**: 211–221.
- Sung J, Lee S, Lee Y, et al. 2012.** Temporal Changes in N Assimilation and Metabolite Composition of Nitrate-Affected Tomato Plants. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* **45**: 910–919.
- Swartzberg D, Kirshner B, Rav-David D, Elad Y, Granot D. 2008.** *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *European Journal of Plant Pathology* **120**: 289–297.
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG. 2010.** Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* **15**: 462–470.
- Tam CC, Nguyen K, Nguyen D, et al. 2021.** Antimicrobial properties of tomato leaves, stems, and fruit and their relationship to chemical composition. *BMC Complementary Medicine and Therapies* **21**: 1–9.
- Tang H, Bi H, Liu B, et al. 2021.** WRKY33 interacts with WRKY12 protein to up-regulate RAP2.2 during submergence induced hypoxia response in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **229**: 106–125.
- Tarkowski ŁP, Signorelli S, Höfte M. 2020.** γ -Aminobutyric acid and related amino acids in plant immune responses: Emerging mechanisms of action. *Plant Cell and Environment* **43**: 1103–1116.
- Thévenot EA, Roux A, Xu Y, Ezan E, Junot C. 2015.** Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *Journal of Proteome Research* **14**: 3322–3335.
- Ton J, Mauch-Mani B. 2004.** β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is

- based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* **38**: 119–130.
- Tyerman SD, Wignes JA, Kaiser BN. 2017.** Root Hydraulic and Aquaporin Responses to N Availability In: 207–236.
- Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR. 2005.** Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Experimental Botany* **56**: 309–321.
- Valeri MC, Novi G, Weits DA, Mensuali A, Perata P, Loreti E. 2021.** Botrytis cinerea induces local hypoxia in Arabidopsis leaves. *New Phytologist* **229**: 173–185.
- Vega A, Canessa P, Hoppe G, et al. 2015.** Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to Botrytis cinerea in response to nitrogen availability in Solanum lycopersicum. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–17.
- De Vega D, Holden N, Hedley PE, Morris J, Luna E, Newton A. 2021.** Chitosan primes plant defence mechanisms against Botrytis cinerea, including expression of Avr9/Cf-9 rapidly elicited genes. *Plant Cell and Environment* **44**: 290–303.
- Veloso J, van Kan JAL. 2018.** Many Shades of Grey in Botrytis–Host Plant Interactions. *Trends in Plant Science* **23**: 613–622.
- Verhoeff K. 1965.** Studies on Botrytis cinerea in tomatoes mycelial development in plants growing in soil with various nutrient levels, as well as in internodes of different age. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **71**: 167–175.
- Wang K, Senthil-Kumar M, Ryu CM, Kang L, Mysore KS. 2012.** Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiology* **158**: 1789–1802.
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, et al. 2008.** An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 3163–3179.
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, et al. 2013.** Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* **162**: 1290–1310.
- Wheat L, Mitchell HJ, Barber MS. 1994.** Elicitor-Induced Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Activity in. *Plant Physiology* **104**: 551–556.
- Windram O, Madhou P, Mchattie S, et al. 2012.** Arabidopsis defense against Botrytis cinerea: Chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell* **24**: 3530–3557.
- Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. 2005.** AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **42**: 535–546.
- Yang C, Liang Y, Qiu D, Zeng H, Yuan J, Yang X. 2018.** Lignin metabolism involves Botrytis cinerea BcGs1-induced defense response in tomato. *BMC Plant Biology* **18**: 1–15.
- Yang J, Sun C, Zhang Y, Fu D, Zheng X, Yu T. 2017.** Induced resistance in tomato fruit by γ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by Alternaria alternata. *Food Chemistry* **221**: 1014–1020.
- Yermiyahu U, Halpern M, Shtienberg D. 2020.** NH₄ fertilization increases susceptibility of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) to grey mould (*Botrytis cinerea*) due to decrease in Ca uptake. *Phytoparasitica* **48**: 685–697.
- Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, et al. 2009.** Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2914–2927.
- Zhang Y, Li D, Zhang H, et al. 2015.** Tomato histone H2B monoubiquitination enzymes SIHUB1 and SIHUB2 contribute to disease resistance against Botrytis cinerea through modulating the balance between SA- and JA/ET-mediated signaling pathways. *BMC Plant Biology* **15**: 1–20.
- Zhang B, Shao L, Wang J, et al. 2021.** Phosphorylation of ATG18a by BAK1 suppresses autophagy and attenuates plant resistance against necrotrophic pathogens. *Autophagy* **17**: 2093–2110.
- Zhao Y, Wei T, Yin KQ, et al. 2012.** Arabidopsis RAP2.2 plays an important role in plant resistance to Botrytis cinerea and ethylene responses. *New Phytologist* **195**: 450–460.
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T. 2006.** Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant Journal* **48**: 592–605.
- Zhou Y, Liu Y, Wang S, et al. 2017.** Molecular Cloning and Characterization of Galactinol Synthases in Camellia sinensis with Different Responses to Biotic and Abiotic Stressors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**: 2751–2759.

Annexe IV – Supplementary data

Table S1: List of the 110 variables measured in tomato stems. ID Level: according to Sumner *et al.* (2007), RT: retention time, EIC: extracted ion chromatogram used for chromatographic integration, Reverse Match: similarity index (%) between experimental and database spectra, RI: retention index, Δ RI : percentage of the difference between measured and theoretical RI.

	GC-TOF (MeOX+TMS)	ID Level	Unit	RT (min)	EIC	Reverse Match	RI	Theoretical RI	Δ RI
1	2-methylmalic acid	[2]	Arbitrary	12.12	247.1	802	1469.2	1464	0.40%
2	2-oxoglutaric acid	[2]	Arbitrary	13.56	198.1	796	1578.2	1568	0.70%
3	3-cyanoalanine	[2]	Arbitrary	10.71	141.1	901	1372	1368	0.30%
4	Adipic acid	[2]	Arbitrary	12.65	275.1	769	1506.5	1497	0.60%
5	Arabinose	[1]	Arbitrary	14.53	307.2	-	1654.9	1654	0.10%
6	Azelaic acid	[2]	Arbitrary	16.35	317.2	688	1798.4	1806	0.40%
7	cis-5-Caffeoylquinic acid	[2]	Arbitrary	24.81	345.2	750	3003.5	2988	0.50%
8	cis-Aconitic acid	[2]	Arbitrary	15.74	229.1	790	1750.5	1740	0.60%
9	Citric acid	[1]	Arbitrary	16.55	273.1	-	1816	1805	0.60%
10	Fructose	[1]	Arbitrary	17.21	307.2	-	1857.5	1865.4	-0.42%
11	Fructose-6-phosphate	[1]	Arbitrary	21.01	387.1	-	2320.5	2293	1.20%
12	Fumaric acid	[1]	Arbitrary	10.42	245.1	-	1352.1	1346	0.50%
13	Galactinol	[2]	Arbitrary	24.71	204.1	919	2983.2	2973	0.30%
14	Galactose	[1]	Arbitrary	17.43	319.2	-	1876.4	1899.4	-1.21%
15	Glucaric acid-1,4-lactone	[2]	Arbitrary	18.03	217.1	907	1955.5	1938	0.90%
16	Glucose	[1]	Arbitrary	17.5	319.2	-	1882.5	1902.7	-1.06%
17	Glucose-6-phosphate	[1]	Arbitrary	21.22	387.1	-	2319.4	2293	1.20%
18	Glucuronic acid	[2]	Arbitrary	17.84	333.2	637	1935.2	1940	0.20%
19	Glycerate-3-phosphate	[1]	Arbitrary	16.39	299.1	-	1800	1790	0.60%
20	Glyceric acid	[1]	Arbitrary	10.07	292.2	-	1328.1	1321	0.50%
21	Glycerol	[1]	Arbitrary	9.24	205.1	-	1270.9	1265	0.50%
22	Glycerol-3-phosphate	[2]	Arbitrary	15.86	299.1	867	1759.7	1754	0.30%
23	Glycolic acid	[1]	Arbitrary	6.32	205.1	-	1064.7	1063	0.20%
24	Homocystine	[2]	Arbitrary	22.31	128.1	641	2539.4	2532	0.30%
25	Malic acid	[1]	Arbitrary	12.39	233.1	-	1487.8	1481	0.50%
26	Maltose	[2]	Arbitrary	23.65	361.2	889	2763	2753	0.40%
27	Maltotriose	[2]	Arbitrary	26.65	361.2	915	3356.5	3343	0.40%
28	Mannobiose	[3]	Arbitrary	23.59	361.2	907	2752.9	2746	0.30%
29	Mannose	[1]	Arbitrary	17.37	319.2	-	1871.8	1887.5	-0.83%
30	Mannose-6-phosphate	[2]	Arbitrary	21.13	387.2	958	2334.1	2329	0.20%
31	Myoinositol	[1]	Arbitrary	19.44	305.2	-	2093	2083.9	0.44%
32	Myoinositol-1-phosphate	[2]	Arbitrary	21.72	318.2	810	2440.4	2428	0.50%
33	Myristic acid amide	[2]	Arbitrary	19	284.3	820	2060.7	2037	1.20%
34	Oxalic acid	[1]	Arbitrary	7.13	147.1	-	1122.4	1117	0.50%
35	Phloroglucinic acid	[3]	Arbitrary	18.32	443.2	794	1987.5	1964	1.20%
36	Pyruvic acid	[1]	Arbitrary	6.49	217.1	-	1038	1038	0.00%
37	Quinic acid	[1]	Arbitrary	16.99	345.2	-	1853.9	1843	0.60%
38	Ribono-1,4-lactone	[2]	Arbitrary	14.9	307.2	684	1684.1	1677	0.40%
39	Ribose	[1]	Arbitrary	14.81	307.2	-	1676.7	1667	0.60%
40	Saccharic acid	[3]	Arbitrary	18.63	333.2	911	2020.5	2002	0.90%
41	Succinic acid	[1]	Arbitrary	9.89	247.1	-	1315.5	1310	0.40%
42	Sucrose	[1]	Arbitrary	23.04	361.2	-	2638.1	2629.6	0.32%
43	Threonic acid	[2]	Arbitrary	13.29	292.2	885	1557.3	1546	0.70%
44	Threonic acid-1,4-lactone	[2]	Arbitrary	10.76	247.1	881	1375.4	1371	0.30%
45	trans-4-Caffeoylquinic acid	[2]	Arbitrary	25.55	307.2	802	3168	3155	0.40%
46	trans-5-Caffeoylquinic acid	[2]	Arbitrary	25.68	345.2	843	3192.9	3177	0.50%
47	Trehalose	[2]	Arbitrary	23.55	361.2	851	2746.7	2740	0.20%
48	Tyramine	[2]	Arbitrary	14.42	102.08	891	1649.3	1640	0.40%
49	U_Erythritol	[3]	Arbitrary	22.09	446.2	848	2503.2	2501	0.10%
50	U_Galactinol 1	[3]	Arbitrary	24.75	204.12	953	2993	-	-
51	U_Galactinol 2	[3]	Arbitrary	24.84	204.12	953	3015	-	-
52	U_Galactose	[3]	Arbitrary	19.7	319.2	898	2136.7	2137	0.00%
53	U_Glucuronic acid-e-lactone	[3]	Arbitrary	15.17	204.1	749	1705.4	1889	9.70%
54	U_Inositol	[3]	Arbitrary	18.69	305.2	823	2027.7	2010	0.90%
55	U_Melibiose	[3]	Arbitrary	24.26	204.1	674	2884.7	2853	1.10%
56	U_Sorbofuranose	[3]	Arbitrary	15.94	217.1	777	1765.9	1762	0.20%
57	U_Sucrose	[3]	Arbitrary	22.32	361.2	917	2541	2533	0.30%
58	U_Threonic acid	[3]	Arbitrary	13.07	292.2	641	1539.4	1523	1.10%
59	U_Caffeoylquinic acid	[3]	Arbitrary	25.45	307.2	647	3143	-	-

	GC-TOF (TMS)	ID Level	Unit	RT (min)	EIC	Reverse Match	RI	Theoretical RI	Δ RI
60	alpha-Tocopherol	[2]	Arbitrary	25.54	502.4	897	3142.7	3145	0.10%
61	beta-Sitosterol	[2]	Arbitrary	26.67	357.3	890	3341.4	3344	0.10%
62	beta-Tocopherol	[2]	Arbitrary	24.82	488.4	816	2987.7	2973	0.50%
63	Campesterol	[2]	Arbitrary	26.21	343.3	906	3264.8	3279	0.40%
64	Cycloartenol	[2]	Arbitrary	27.14	393.3	719	3417.7	3447	0.90%
65	Fucosterol	[2]	Arbitrary	26.76	386.3	851	3354.8	3344	0.30%
66	gamma-Tocopherol	[2]	Arbitrary	24.87	488.4	789	2987.7	2985	0.10%
67	Lupeol	[2]	Arbitrary	27.2	189.2	882	3427.1	3435	0.20%
68	Stigmastan-3,5-diene	[3]	Arbitrary	25.5	396.4	725	3133.5	-	-
69	Stigmasterol	[2]	Arbitrary	26.33	255.2	913	3284.9	3303	0.50%
70	Trans-sinapyl alcohol	[2]	Arbitrary	19.4	354.2	881	2091.9	2082	0.50%

	UPLC-TQMS	ID Level	Unit	ESI	RT (min)	MRM	CV (V)	CE (eV)
71	Chlorogenic acid	[1]	Arbitrary	negative	2.44	353>191	10	14
72	Dehydrotomatine	[2]	Arbitrary	positive	3.35	1032.5>84.7	70	80
73	Hydroxytomatine 1	[2]	Arbitrary	positive	1.98	1050.6>1032	55	40
74	Hydroxytomatine 2	[2]	Arbitrary	positive	2.14	1050.6>1032	55	40
75	Rutin	[1]	Arbitrary	negative	3.43	609>300	20	28
76	Tomatine	[1]	Arbitrary	positive	3.65	578.4>104.8	70	85

	UPLC-TQMS (AccQ Tag)	ID Level	Unit	ESI	RT (min)	MRM	CV (V)	CE (eV)
77	4-aminobutyric acid	[1]	Arbitrary	positive	4.43	274.0>171.0	21	24
78	Alanine	[1]	Arbitrary	positive	4.11	260.0>171.0	29	24
79	Amino adipic acid	[1]	Arbitrary	positive	5.07	332.1>171.0	21	24
80	Arginine	[1]	Arbitrary	positive	1.84	173.0>171.0	13	12
81	Beta-Alanine	[1]	Arbitrary	positive	2.87	260.0>171.0	29	24
82	Citrulline	[1]	Arbitrary	positive	3.14	346.1>171.0	29	24
83	Glycine	[1]	Arbitrary	positive	2.09	246.0>171.0	21	24
84	Histidine	[1]	Arbitrary	positive	1.13	163.5>171	21	12
85	Isoleucine	[1]	Arbitrary	positive	7.8	302.12>171.0	29	24
86	Leucine	[1]	Arbitrary	positive	7.87	302.12>171.0	29	24
87	Lysine	[1]	Arbitrary	positive	6.89	244.1>171.0	21	19
88	Methionine	[1]	Arbitrary	positive	6.98	320.1>171.0	21	24
89	Phenylalanine	[1]	Arbitrary	positive	7.95	336.14>171.0	13	24
90	Pipecolic acid	[1]	Arbitrary	positive	6.91	300.1>171.0	24	32
91	Putrescine	[1]	Arbitrary	positive	6.9	215.1>171.0	25	24
92	Serine	[1]	Arbitrary	positive	1.91	276.0>171.0	29	24
93	Spermidine	[1]	Arbitrary	positive	7.39	219.5>171.0	25	12
94	Threonine	[1]	Arbitrary	positive	3.56	290.1>171.0	21	29
95	Tryptophane	[1]	Arbitrary	positive	8.05	375.14>171.0	5	24
96	Tyrosine	[1]	Arbitrary	positive	6.92	352.1>171.0	13	24
97	Valine	[1]	Arbitrary	positive	7.12	288.1>171.0	29	24

	HPLC-FLR (AccQ Tag)	ID Level	Unit	RT (min)	λ _{em} (nm)	λ _{ex} (nm)
98	Asparagine	[1]	Arbitrary	21.825	250	395
99	Aspartic acid	[1]	Arbitrary	13.595	250	395
100	Glutamic acid	[1]	Arbitrary	17.132	250	395
101	Glutamine	[1]	Arbitrary	24.013	250	395
102	Proline	[1]	Arbitrary	30.322	250	395

	Non soluble fractions	Unit	Reference
103	Starch	μmol.eqGlc/gDW	146
104	Protein	mg/gDW	146
105	Cell wall	mg/gDW	147

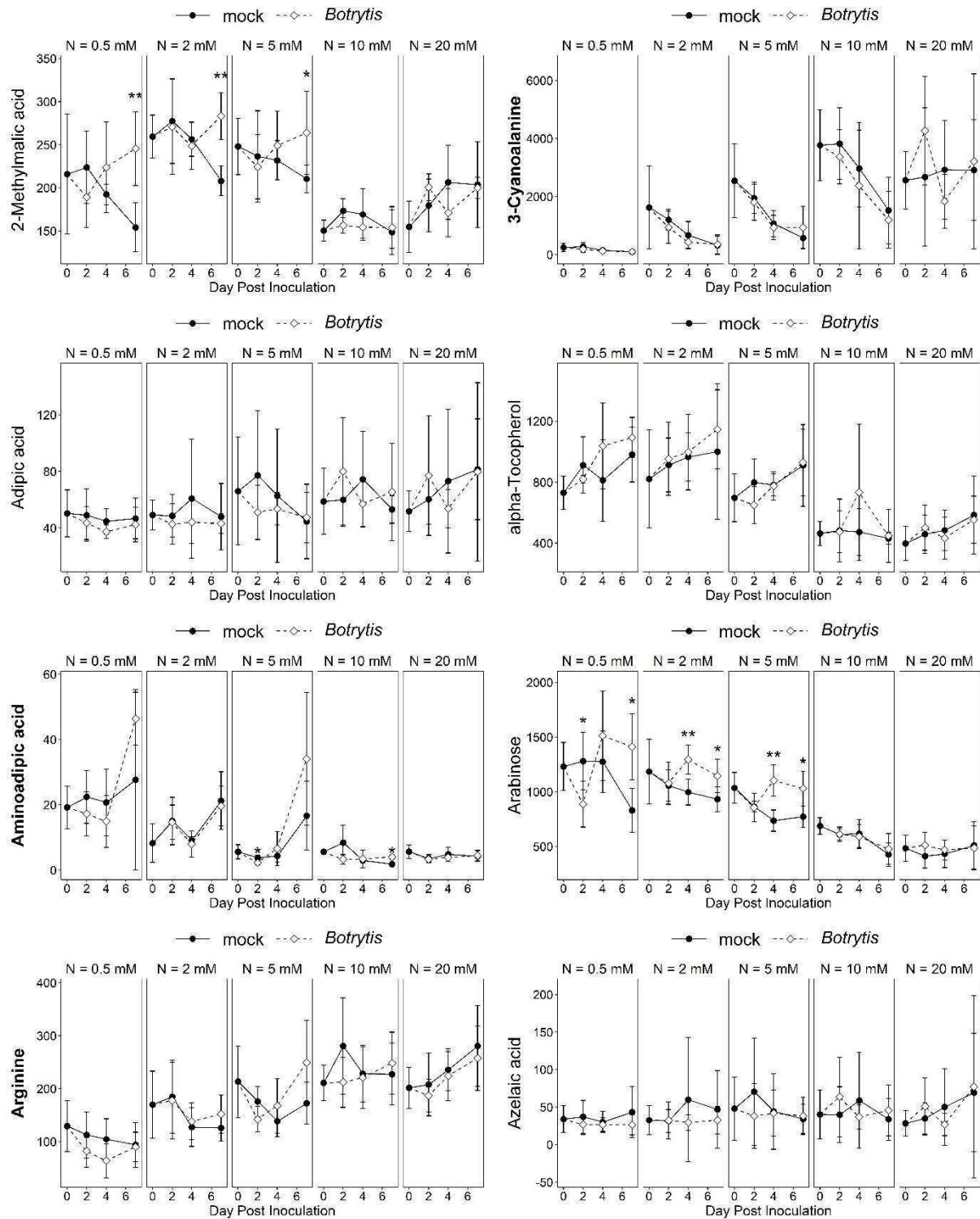
	Redox markers	Unit	Reference
106	Total Ascorbate	mg/100gDW	148
107	Total Glutathione	μmol/gDW eq. GSSG	149

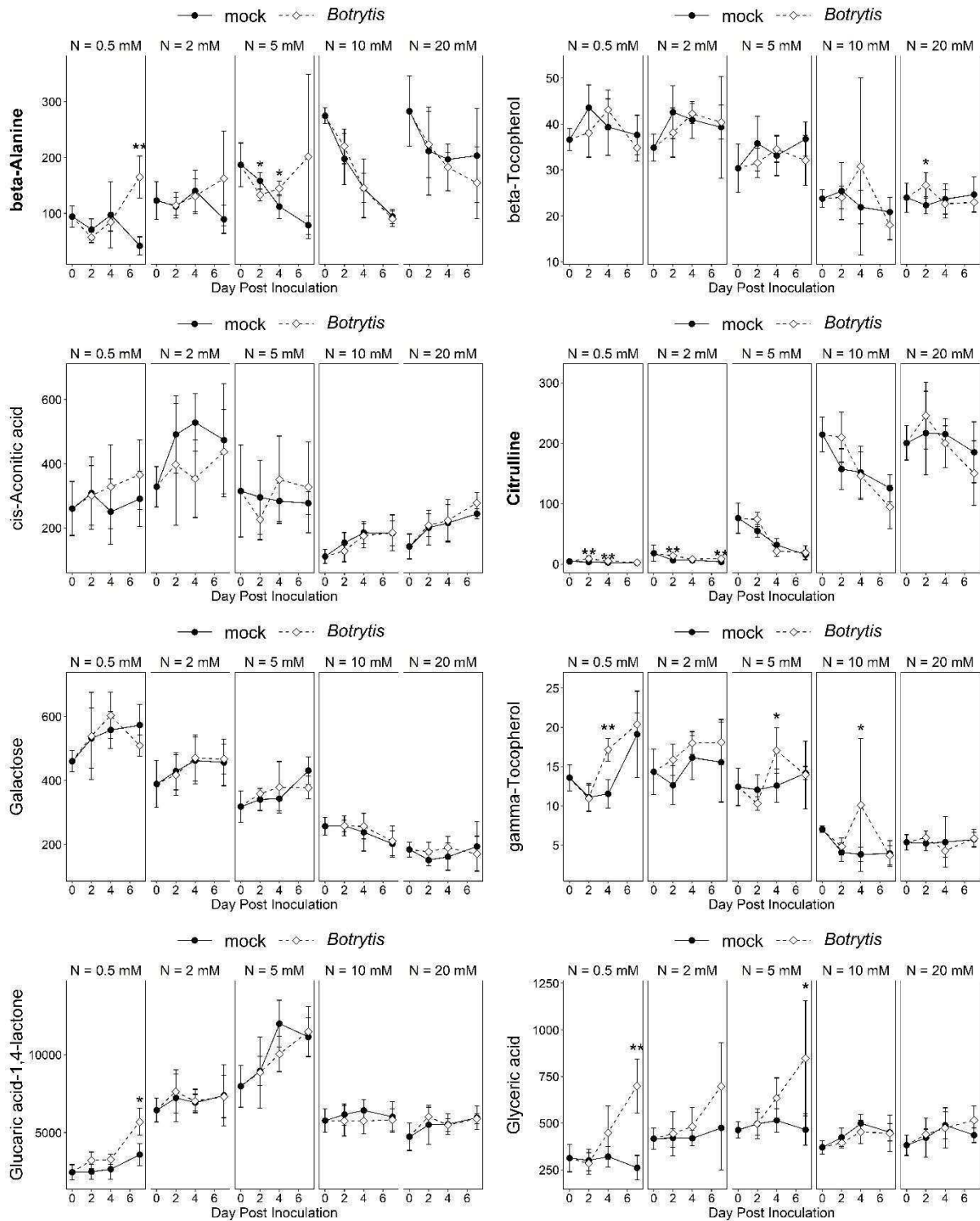
	Growth markers	Unit
108	Mass of 1cm stem cylinder	gDW
109	Water content	g/gDW
110	Plant height	cm

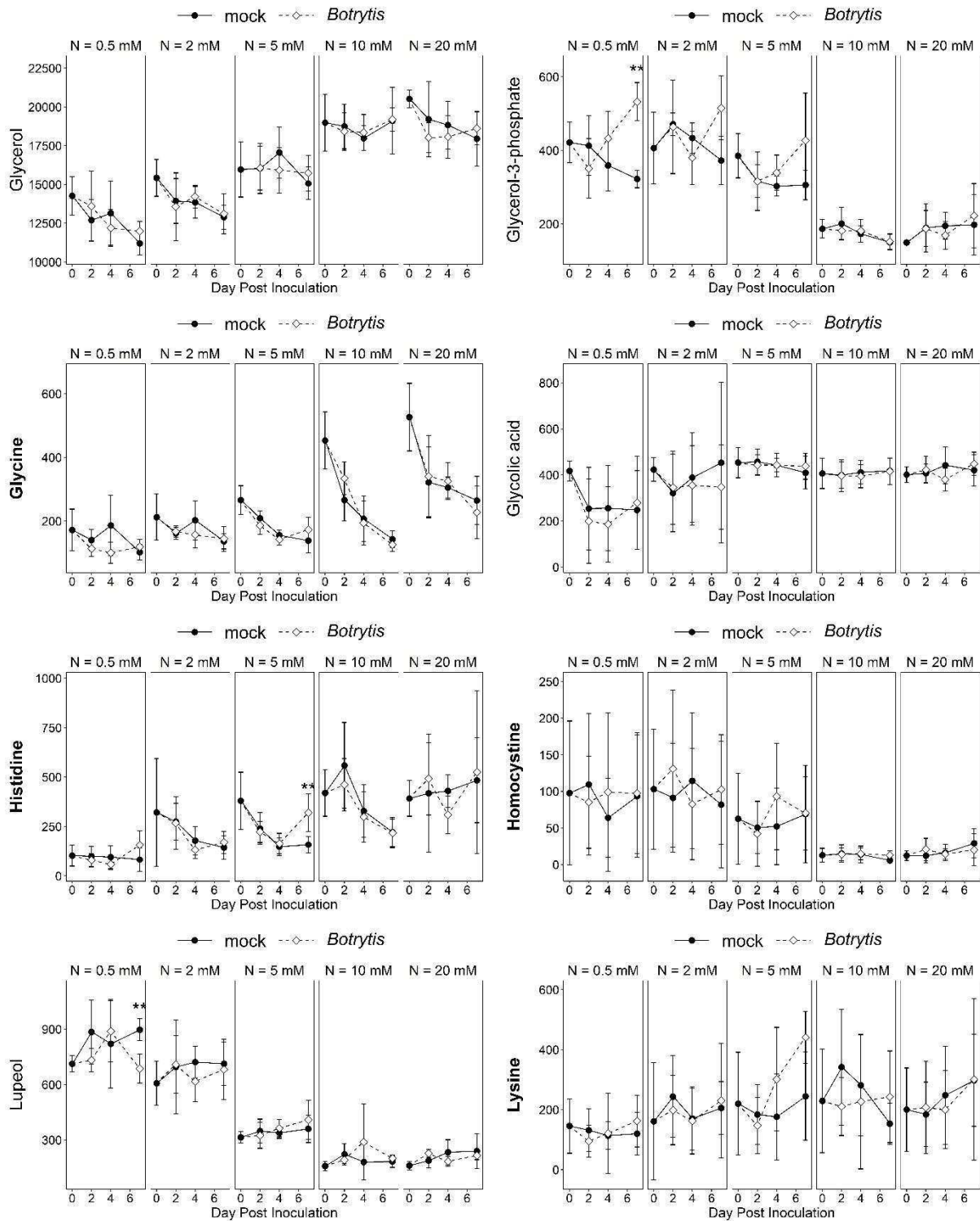
Tables S2: Every significant variable change in the dataset according to a Mann-Whitney test.

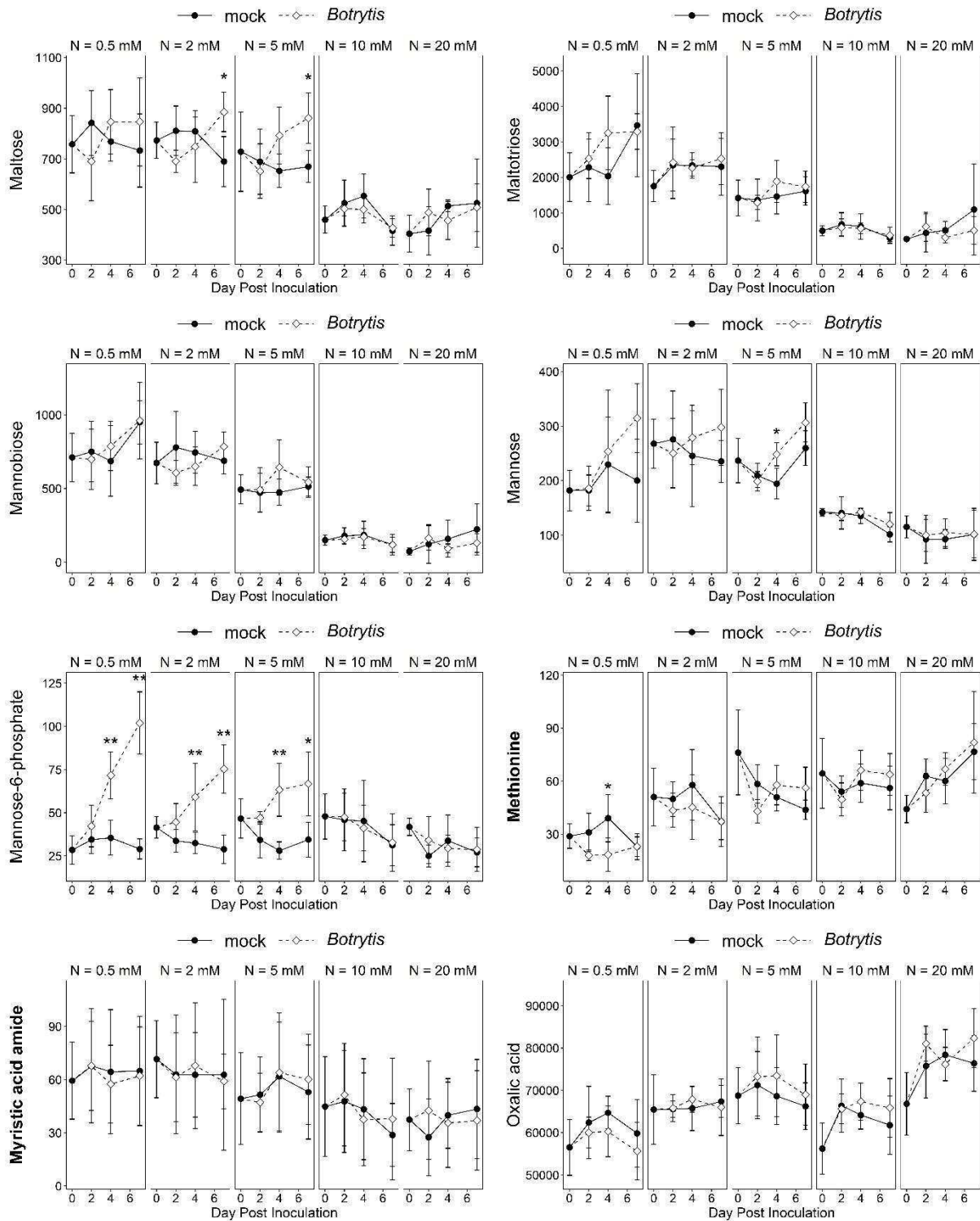
Nitrogen 0.5 mM			Nitrogen 2 mM			Nitrogen 5 mM			Nitrogen 10mM			Nitrogen 20mM		
51 Variables	dpi	Significance	32 Variables	dpi	Significance	43 Variables	dpi	Significance	11 Variables	dpi	Significance	8 Variables	dpi	Significance
Alanine	7	7.94E-03	Alanine	2	7.94E-03	Alanine	2	7.94E-03	Alanine	2	1.59E-02	Alanine	2	1.59E-02
Ascorbic acid	7	3.17E-02	Ascorbic acid	4	7.94E-03	Ascorbic acid	4	1.59E-02	Ascorbic acid	7	1.59E-02	Ascorbic acid	7	1.59E-02
Aspartic acid	4	1.59E-02	Aspartic acid	7	3.17E-02	Aspartic acid	7	3.17E-02	Aspartic acid	7	1.59E-02	Aspartic acid	4	7.94E-03
beta-Alanine	7	7.94E-03	Chlorogenic acid	7	1.59E-02	Chlorogenic acid	7	7.94E-03	beta-Alanine	7	7.94E-03	beta-Alanine	4	3.17E-02
beta-Sitosterol	7	7.94E-03	Citraline	2	7.94E-03	Chlorogenic acid	7	7.94E-03	beta-Alanine	2	3.17E-02	beta-Sitosterol	4	1.59E-02
Chlorogenic acid	7	7.94E-03	Fructose	7	7.94E-03	Fructose-6-phosphate	4	3.17E-02	Chlorogenic acid	7	7.94E-03	Chlorogenic acid	7	7.94E-03
Citraline	4	7.94E-03	Fructose-6-phosphate	4	3.17E-02	Fructose-6-phosphate	7	7.94E-03	Cycloartenol	2	1.59E-02	Cycloartenol	2	1.59E-02
Cycloartenol	4	7.94E-03	Gallocatechol	7	7.94E-03	Gallocatechol	4	7.94E-03	Cycloartenol	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Cyclohexanone	2	7.94E-03	Gallocatechol	7	7.94E-03	Gallocatechol	7	7.94E-03	Cyclohexanone	2	1.59E-02	U_Sucrose	7	7.21E-03
Dehydroxymatine	4	3.17E-02	Gallocatechol	7	7.94E-03	Dehydroxymatine	7	7.94E-03	Dehydroxymatine	7	7.94E-03	gamma-Tocopherol	4	7.94E-03
Dehydroxymatine	7	1.59E-02	Glucuronic acid	7	7.94E-03	Glucose-6-phosphate	4	7.94E-03	Fructose	7	7.94E-03	gamma-Tocopherol	7	1.59E-02
Fructose	4	3.17E-02	Glucuronic acid	7	7.94E-03	Glucose-6-phosphate	7	7.94E-03	Fructose	4	1.59E-02	Malic acid	4	3.17E-02
Fructose-6-phosphate	4	7.94E-03	Glutathione	4	7.94E-03	Glucuronic acid	7	7.94E-03	Fructose-6-phosphate	4	7.94E-03	myo-Inositol	4	1.59E-02
Fructose-6-phosphate	7	7.94E-03	Glutathione	7	7.94E-03	Glutathione	7	7.94E-03	Fructose-6-phosphate	7	7.94E-03	myo-Inositol	7	1.59E-02
Fumaric acid	7	7.94E-03	Glutathione	7	7.94E-03	Glutathione	7	7.94E-03	Fumaric acid	4	7.94E-03	Phenylalanine	4	1.59E-02
Fumaric acid	7	7.94E-03	Glycerate-3-phosphate	7	1.59E-02	Glycerate-3-phosphate	7	1.59E-02	Fumaric acid	7	3.17E-02	Phenylalanine	7	1.59E-02
Fumaric acid	7	7.94E-03	Maltose	7	3.17E-02	Glycerate-3-phosphate	7	1.59E-02	Fumaric acid	7	3.17E-02	Pyruvic acid	4	3.98E-03
Galactinol	4	7.94E-03	Mannose-6-phosphate	4	7.94E-03	Glyceric acid	7	7.94E-03	Galactinol	4	7.94E-03	Pyruvic acid	7	1.59E-02
Galactinol	7	7.94E-03	Mannose-6-phosphate	7	7.94E-03	Glyceric acid	7	7.94E-03	Galactinol	7	7.94E-03	Pyruvic acid	7	1.59E-02
gamma-Tocopherol	4	7.94E-03	Mannose-6-phosphate	7	7.94E-03	Histidine	7	7.94E-03	gamma-Tocopherol	4	3.17E-02	Tomatine	2	3.17E-02
Glucuronic acid-1,4-lactone	7	1.59E-02	myo-Inositol	4	1.59E-02	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	Glucuronic acid-1,4-lactone	4	7.94E-03	Tomatine	7	1.59E-02
Glucose-6-phosphate	4	7.94E-03	myo-Inositol	7	1.59E-02	Isoleucine	7	7.94E-03	Glucose-6-phosphate	7	3.17E-02	U_Sucrose	4	1.59E-02
Glucose-6-phosphate	7	7.94E-03	Plant height	4	1.59E-02	Isoleucine	7	7.94E-03	Glucose-6-phosphate	4	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Glutamic acid	7	7.94E-03	Plant height	7	7.94E-03	Isoleucine	7	7.94E-03	Glutamic acid	4	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Glutamic acid	7	7.94E-03	Putrescine	7	7.94E-03	Isoleucine	7	7.94E-03	Glutamic acid	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Glutathione	4	7.94E-03	Putrescine	2	3.17E-02	Leucine	7	1.59E-03	Glutathione	4	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Glutathione	7	7.94E-03	Pyruvic acid	7	7.94E-03	Leucine	7	1.59E-03	Glutathione	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Glycerate-3-phosphate	7	7.94E-03	Pyruvic acid	4	7.94E-03	Methionine	4	1.59E-02	Glycerate-3-phosphate	4	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Glyceric acid	7	7.94E-03	Quinic acid	4	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Glyceric acid	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Glyceric acid	7	7.94E-03	Quinic acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Glyceric acid	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Glycerol-3-phosphate	7	7.94E-03	Ribose	4	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Glycerol-3-phosphate	4	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Hydroxymatine_1	2	1.59E-02	Ribose	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_1	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Hydroxymatine_1	4	7.94E-03	Spermidine	7	3.17E-02	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Hydroxymatine_2	4	7.94E-03	Spermidine	7	3.17E-02	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	Succinic acid	7	3.17E-02	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Malic acid	4	3.17E-02	Succinic acid	4	3.17E-02	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Malic acid	7	7.94E-03	Succinic acid	7	3.17E-02	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Mannose-6-phosphate	4	7.94E-03	U_Galactinol_2	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Mannose-6-phosphate	7	7.94E-03	U_Galactinol_2	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Methionine	4	3.17E-02	U_Glucuronic acid-e-lactone	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Methionine	7	7.94E-03	U_Threonine acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Phenylalanine	4	3.17E-02	2-Methylmalic acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Pipelicolic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Plant height	4	3.17E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Plant height	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Putrescine	4	1.59E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Putrescine	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Pyruvic acid	4	3.17E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Pyruvic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Quinic acid	4	3.17E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Quinic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Quinic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Quinic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Ribose	4	1.59E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Ribose	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Stigmastanol	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Stigmastanol	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Succinic acid	4	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Succinic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Succinic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Threonine acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Threonine acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Threonine acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Threonine acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Tomatine	2	3.17E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Tomatine	7	1.59E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
trans-5-Caffeoylquinic acid	2	3.17E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
trans-Sinapyl alcohol	7	1.59E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
U_Galactinol_2	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
U_Galactinol_2	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
U_Threonine acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
Water content	2	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
Water content	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
2-Methylmalic acid	4	3.17E-02	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
2-Methylmalic acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
2-Oxoglutaric acid	4	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
4-Aminobutyric acid	4	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02
4-Aminobutyric acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	7	7.21E-03
4-Aminobutyric acid	7	7.94E-03	2-Oxoglutaric acid	7	7.94E-03	Methionine	7	7.94E-03	Hydroxymatine_2	7	7.94E-03	U_Sucrose	4	1.59E-02

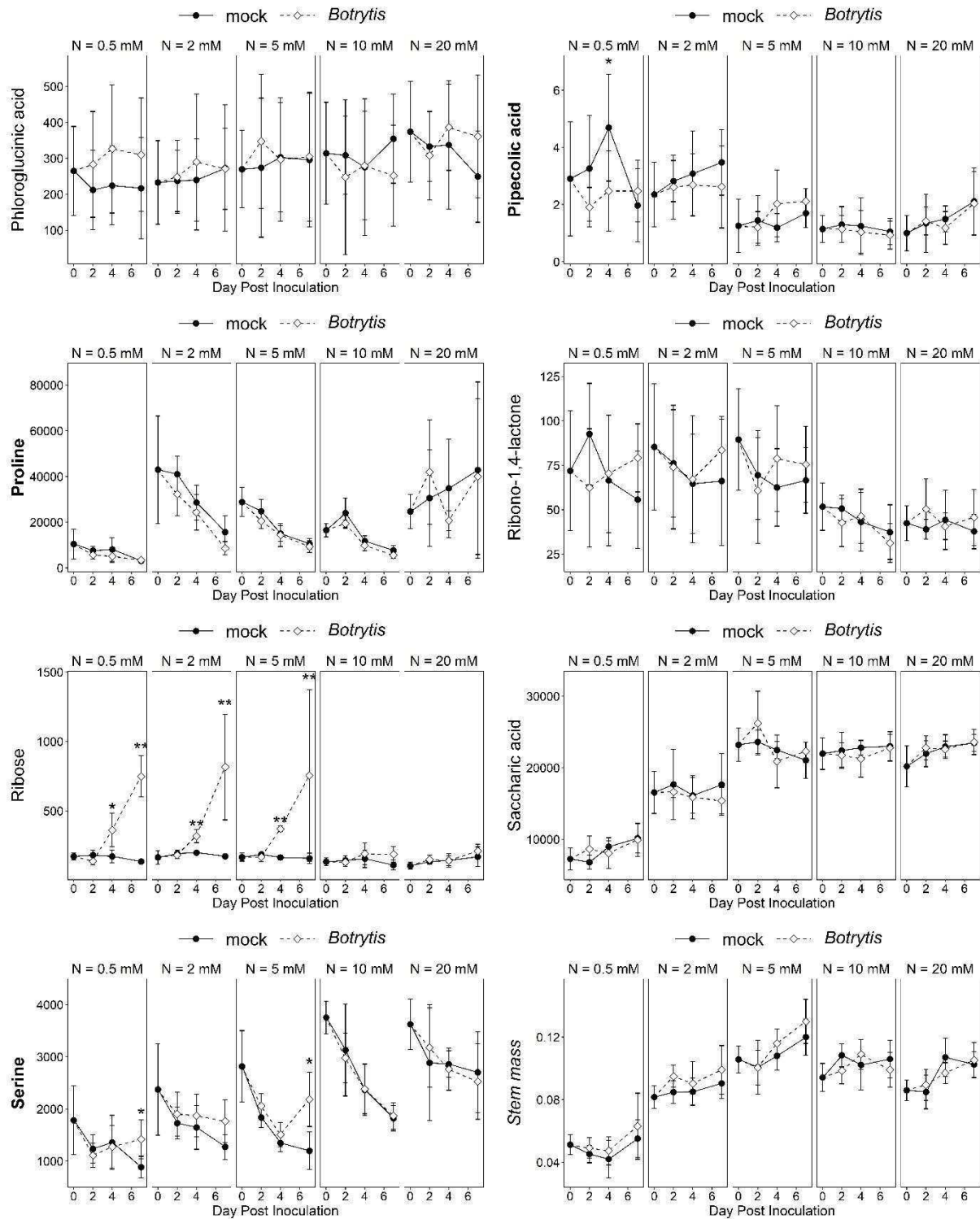
Figure S1: Other compounds variations upon infection. Growth and metabolic variables measured during 7 days on asymptomatic tomato stem sections, sampled from plant fertilized with 5 nitrate concentrations and inoculated by *B. cinerea* or mock solution. The differences between mock- and *Botrytis*-inoculated plants are tested at each time point with a Mann-Whitney test. Significant differences are indicated by * (p-value < 0.05) and ** (p-value < 0.01). Black dots and solid lines: mock-inoculated plants; white dots and dotted lines: *Botrytis*-inoculated plants.

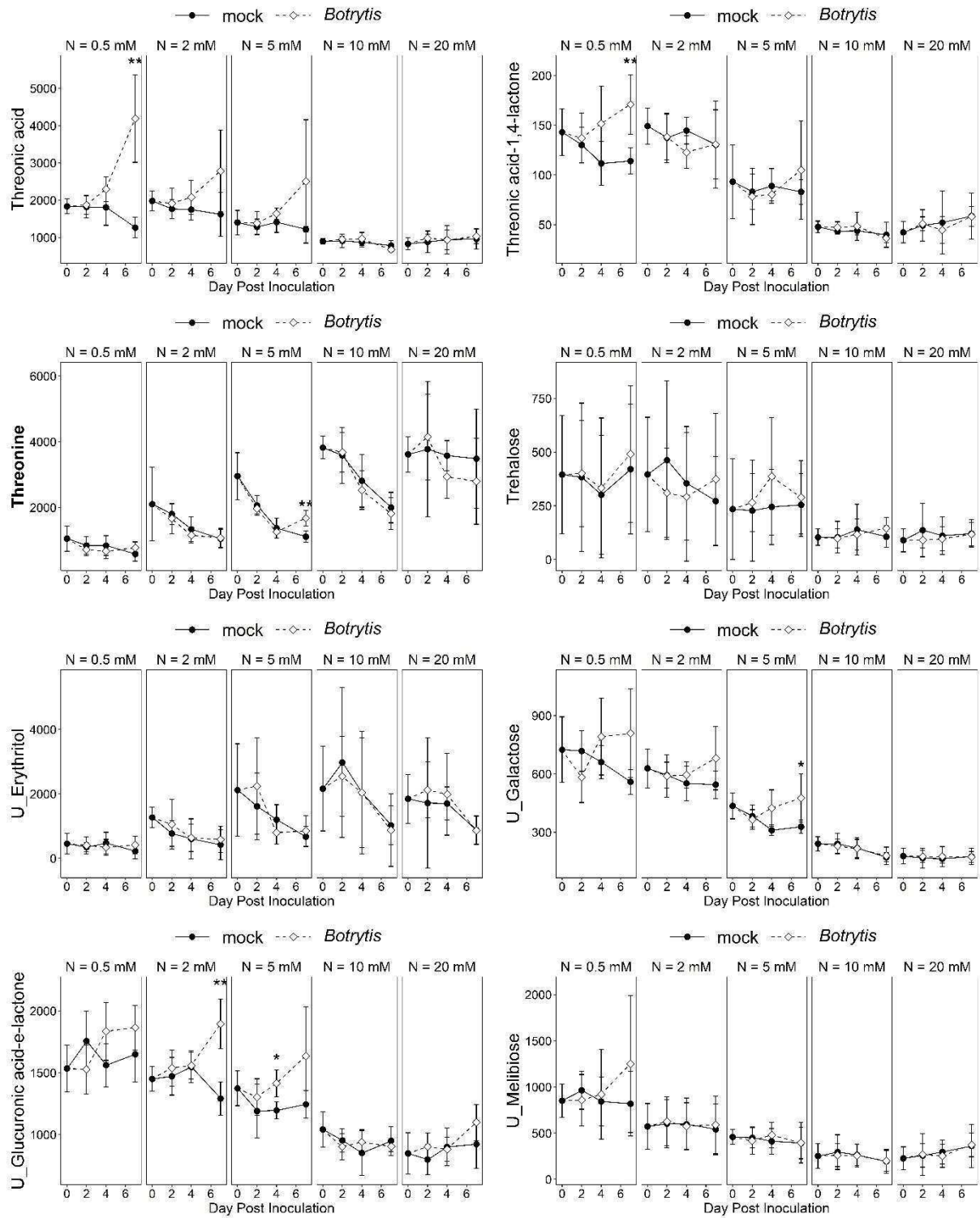


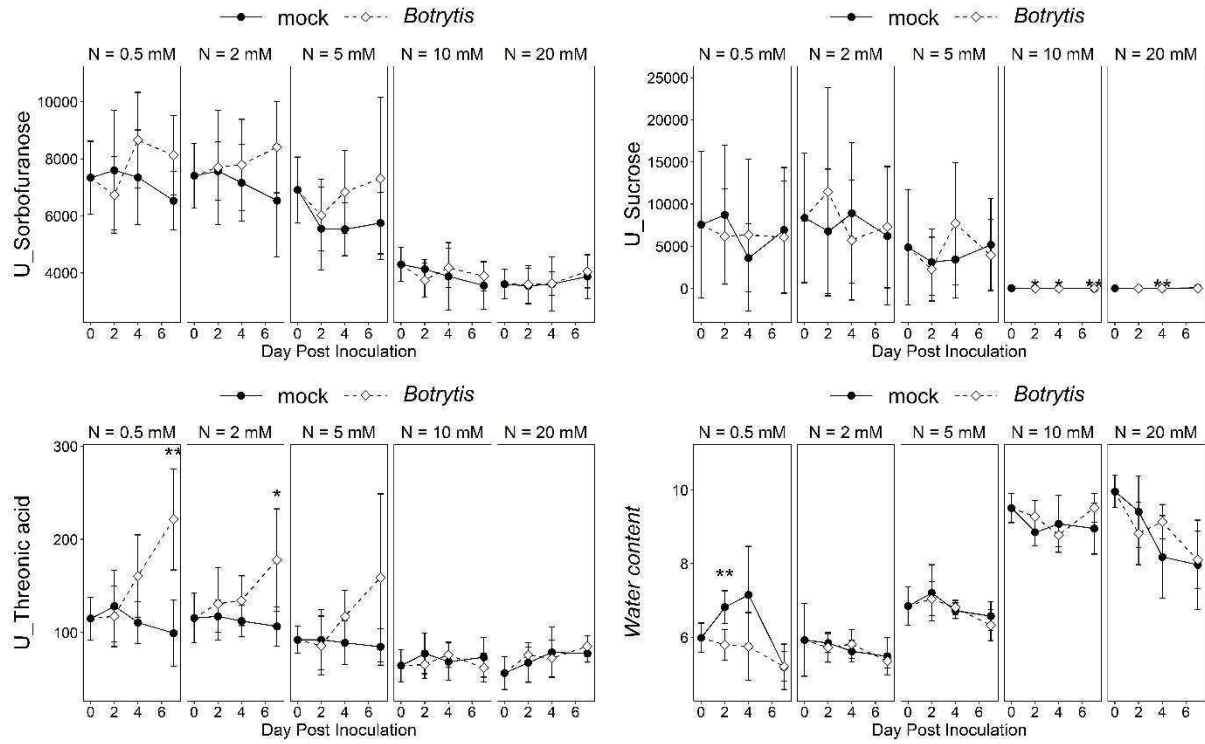












Chapitre V

Estimation des flux métaboliques
par modélisation sous contraintes

Nathalie Lacrampe, Sophie Colombié, Raphaël Lugan,

Doriane Dumont, Philippe Nicot et François Lecompte

1. Introduction

Lors d'une infection par des agents pathogènes, les plantes induisent une reprogrammation massive de leur métabolisme, via des modifications d'expression de leur génome, pour mettre en place une série de réactions de défense. Bien que certains mécanismes soient universellement activés en réponse aux stress biotiques, l'adaptation métabolique de l'hôte à l'infection par des champignons nécrotrophes n'a pas encore été entièrement élucidée. Plusieurs études montrent une réorganisation majeure des plantes infectées par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, tant au niveau de l'expression des gènes que de la composition métaboliques (Windram *et al.* 2012; De Cremer *et al.* 2013; Agudelo-Romero *et al.* 2015; Vega *et al.* 2015; Haile *et al.* 2020; Srivastava *et al.* 2020). Cependant, la réponse métabolique de défense des plantes implique de nombreux changements moléculaires et biochimiques en constante interaction et est soumise à une régulation fine.

Les flux métaboliques représentent le dernier niveau d'expression de l'ensemble des systèmes de régulation (Yurkovich and Palsson 2016). Ils donnent une bonne estimation de l'état du métabolisme d'un organisme, et ainsi permettent d'expliquer un phénotype donné. Cependant, les flux métaboliques ne peuvent pas être mesurés directement mais doivent être déduits d'autres observations expérimentales en combinaison avec l'utilisation de modèles mathématiques, qui peuvent être répartis entre les modèles cinétiques et les modèles stœchiométriques (Dersch *et al.* 2016; Clark *et al.* 2020). Les modèles cinétiques décrivent de façon détaillée les propriétés cinétiques de chaque enzyme constituant le réseau métabolique, afin d'en prédire les flux (Rohwer 2012). Ils nécessitent donc un grand nombre de données biologiques (paramètres cinétiques des enzymes et concentrations des métabolites du réseau étudié). À l'inverse, les modèles stœchiométriques requièrent uniquement d'identifier des réactions biochimiques mises en jeu et la stœchiométrie associée à chaque réaction. Ces modèles sont basés sur la loi fondamentale de conservation de la masse et peuvent être résolus par l'analyse par marquage isotopique ou une analyse sous contraintes. L'utilisation de marquage isotopique est assez rare chez des organismes complexes tel que les plantes car expérimentalement difficiles. Les marquages isotopiques ont été utilisés chez les plantes, principalement pour éclaircir divers mécanismes, tels que la production de grandes quantités de triacylglycerols dans les feuilles de tabac (Chu *et al.* 2022),

l'efficacité d'utilisation de l'azote chez différentes variétés de maïs (Fernandez *et al.* 2022), ou le devenir du carbone respiré (Xu *et al.* 2021). Les modèles sous contraintes permettent de prédire les flux métaboliques à partir de la topologie du réseau et de la mesure des taux d'absorption et taux de sécrétion de métabolites (Monk 2014). Les modèles sous contraintes de type FBA (*Flux Balance Analysis*) reposent sur l'optimisation d'une fonction objectif définie à partir d'une hypothèse d'optimalité du fonctionnement biologique (Jeffrey D. Orth *et al.* 2010).

Les réseaux métaboliques des plantes sont très complexes, principalement en raison de la diversité des métabolites et des voies métaboliques impliquées dans des organes, des cellules et des compartiments plus ou moins spécialisés. Le réseau métabolique étudié est donc souvent défini en fonction des objectifs de l'étude et des contraintes de mise en œuvre. Une façon exhaustive de reconstruire un réseau métabolique consiste à s'appuyer sur les données génomiques. En effet, l'annotation du génome est utilisée pour prédire une liste de réactions métaboliques hypothétiques existant au sein de l'organisme en question. Cependant ces réseaux *genome-scale* nécessitent une très bonne annotation et malgré les progrès dans ce domaine, il existe encore peu de reconstruction de modèles de plantes (Collakova *et al.* 2012). Dans le cas de la tomate, un premier modèle métabolique *genome-scale* a été reconstruit et utilisé pour simuler le métabolisme de la feuille (Yuan *et al.* 2016). Ce modèle, comprenant plus de 2000 réactions biochimiques et de transport distribuées à travers le cytosol, le plaste, la mitochondrie, le peroxyosome et la vacuole, décrit avec succès le comportement métabolique connu de la feuille de tomate. Très récemment, un modèle métabolique multi-organes d'une plante de tomate, combinant des modèles métaboliques *genome-scale* de la feuille, de la tige et de la racine, a été publié (Gerlin *et al.* 2021). Le modèle résultant prédit une distribution cohérente des flux et des échanges métaboliques de base. Il a été utilisé notamment pour prédire l'impact de la contribution photosynthétique de la tige sur les échanges entre les différents organes et estimer l'impact de la limitation des nutriments sur la croissance. Alors que les réseaux *genome-scale* rendent bien compte des capacités métaboliques d'un organisme, un réseau métabolique reconstruit manuellement à partir des données de la littérature peut être plus adapté pour étudier un comportement physiologique (Colombié *et al.* 2017). En général ces réseaux sont plus petits que les réseaux

genome-scale, avec une centaine de réactions parfaitement curées, et construits en fonction des intérêts de l'étude, permettant ainsi de maîtriser le niveau de complexité du réseau.

L'étude des interactions entre plantes et agents pathogènes nécessite, en plus des plantes, une bonne connaissance du fonctionnement métabolique des agents pathogènes. Des modèles ont été reconstruits pour quelques agents pathogènes de plantes tel que *Ralstonia solanacearum* (Peyraud *et al.* 2016), *Xanthomonas oryzae* (Koduru *et al.* 2020), *Pectobacterium parmentieri* (Zoledowska *et al.* 2019), et le champignon nécrotrophe *Sclerotinia sclerotiorum* (Peyraud *et al.* 2019). Ce dernier démontre une hétérogénéité métabolique entre les cellules hyphales du champignon soutenant une division du travail pour faciliter la colonisation des plantes hôtes.

Malgré l'abondance de données « omiques » pour de nombreuses interactions entre plantes et agents pathogènes, les études de pathosystèmes par des approches de modélisation sont encore peu nombreuses. Cela permettrait de comprendre l'effet d'un organisme sur l'autre et aiderait également à prédire comment limiter la prolifération d'un pathogène. Une première approche consiste à combiner les modèles de plante et de pathogène pour créer un modèle multi-organismes prenant en compte les mécanismes d'échanges entre les deux organismes. Jusqu'à présent, il n'existe que peu de modèles métaboliques plante-pathogène. Un modèle métabolique intégré de l'hémibiotrophe *Phytophthora infestans* et de la tomate a été reconstruit à partir des modèles de chaque espèce (Rodenburg *et al.* 2019). Cette modélisation a mis en évidence de profonds changements métaboliques au cours de l'infection, avec une diminution de synthèse *de novo* de métabolites par *P. infestans* associée à une augmentation de la récupération de métabolites de la tomate. Très récemment, le modèle multi-organes de tomate a été combiné au modèle de *Ralstonia solanacearum* mettant en évidence des comportements métaboliques différents au cours des différentes phases de la colonisation du xylème par la bactérie (Gerlin 2018). Une autre approche pour étudier les interactions plantes – pathogènes consiste à modéliser des tissus de plantes affectés par un agent pathogène. Par exemple, Botero *et al.* (2018) ont reconstruit un modèle *genome-scale* de feuilles de pomme de terre affectées par le pathogène *Phytophthora infestans*, montrant une suppression de la capacité photosynthétique chez la plante hôte au cours de l'infection.

La démarche de cette étude consiste à intégrer les données métaboliques observées précédemment (*cf.* Chapitre IV) dans un modèle métabolique de tige de tomate afin d'en calculer les flux par une approche de modélisation sous contraintes. L'originalité de cette approche consiste à étudier un tissu asymptomatique, la tige, chez des plantes infectées par *Botrytis cinerea* et dans des conditions variables de sensibilité.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

La production du matériel biologique est décrite dans le chapitre 2. Succinctement, des plantes de tomates ont été cultivées sous 5 niveaux de nutrition azotée (0.5, 2, 5, 10 et 20 mM de NO_3^-) puis inoculées avec une solution de conidies de *Botrytis cinerea* ou avec de l'eau pour les plantes témoins (*mocks*). Des morceaux de tiges asymptomatiques ont été récoltés, à proximité de la lésion avant inoculation et à 2, 4, et 7 jours après inoculation, puis analysés. Une série supplémentaire d'échantillons, situés à côté des échantillons analysés, a été récoltée et congelée à l'azote liquide et conservée à -80°C . Ces échantillons ont permis de déterminer, d'une part, la masse fraîche, et d'autre part, le diamètre et le volume estimé, à partir de photographies, en considérant ces portions de tige comme un cylindre. Ces mesures ont permis de calculer la masse volumique et la masse par unité de longueur.

2.2. Quantification des pools métaboliques et des constituants de la biomasse

Les méthodes d'extraction et de quantification des métabolites et des constituants de la biomasse sont décrits dans les chapitres précédents. Les métabolites majeurs ont été extraits à partir de 60 mg de tige finement broyée avec 3,4 mL d'un mélange MeOH / H_2O / CHCl_3 (1.2 / 0.9 / 1.3 ; v / v / v). Les principaux sucres solubles et acides organiques ont été quantifiés par Prep-GC-EI-TOF après dérivation au TMS. Les acides aminés libres et les polyamines, les trois composés phénoliques majeurs et la tomatine ont été quantifiés par UPLC-ESI-TQ. Les acides gras ont été extraits à partir de 20 mg de poudre fraîche finement broyée grâce à un mélange MeOH / H_2SO_4 / NaCl 2.5% / Hexane (0.95 / 0.05 / 1 / 1.3 ; v / v / v / v). Les dérivés méthylester d'acides gras ainsi obtenus ont été quantifiés individuellement par GS-EI-TOF et la quantité totale a été utilisée dans le modèle. Le glutathion total a été quantifié en équivalent

GSSG par dosage enzymatique (Massot et al. 2013). La quantité maximale de forme réduite (GSH) a été définie comme le double de la quantité maximale de forme oxydée (GSSG). Les formes réduite et oxydée de l'ascorbate ont été quantifiées par dosage enzymatique (Sérino et al. 2019). L'amidon a été mesuré par dosage enzymatique en équivalent glucose (Biais et al. 2014). Les protéines totales ont été quantifiées par dosage de Bradford (Biais et al. 2014). Les ARN totaux ont été quantifiés par spectrophotométrie (Lacrampe et al. 2021). La paroi cellulaire correspond au matériel insoluble obtenu après lavages successifs au MeOH et acétone et dosage de l'amidon (Renard et al. 1990). Un mélange de tous les échantillons a été analysé afin de déterminer les proportions entre les différents constituants élémentaires de la paroi (acides uroniques, sucres et lignine ; Annexe V.1). Les quantités de nitrate ont été estimées à partir de 5 expérimentations réalisées entre 2009 et 2011, sur des dispositifs expérimentaux équivalents, et plusieurs génotypes de tomate (Abro *et al.* 2014).

2.3. Reconstruction du réseau métabolique de tige de tomate

Cette étude modélise des « cellules moyennes » de tige de tomate, sur un cm de longueur, possédant des capacités de croissance en biomasse. Le réseau métabolique de ces « cellules moyennes » a été reconstruit manuellement en intégrant les connaissances biochimiques et physiologiques sur le métabolisme cellulaire primaire et secondaire de cellules végétales, en incluant la stœchiométrie des réactions et en définissant les conditions aux limites pour les composés externes. Ce réseau suppose une homogénéité des cellules au sein du tissu ainsi que l'absence de compartimentation subcellulaire. Le modèle a été complété à partir d'une version initiale portant sur le métabolisme central des plantes hétérotrophes (Colombié *et al.* 2015), qui comprend les voies d'assimilation des sucres et de stockage sous forme d'amidon, la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates, le cycle de Krebs, la synthèse des lipides ainsi que des principaux acides aminés. Ce modèle a été complété pour mieux décrire les voies impliquant les composés métaboliques de synthèse de la biomasse (protéines, paroi cellulaire, lipides, nucléotides, acides aminés) ainsi que certains métabolites secondaires quantitativement importants, tels que l' α -tomatine, la rutine et la spermidine, et leurs précurseurs. Les réactions ont été écrites en utilisant les bases de données KEGG, PlantCyc et BRENDA, regroupant les informations sur les enzymes et les réactions qu'elles catalysent.

2.3.1. Voies et réactions implémentées

La détermination expérimentale de la composition de la paroi cellulaire a permis de compléter la réaction de synthèse à partir des différents sucres (fucose, rhamnose, arabinose, xylose, galactose, mannose et glucose), acides uroniques (galacturonique et glucuronique) et de la lignine. Les différentes réactions permettant la synthèse de ces précurseurs ont donc été ajoutées au modèle. La réaction de synthèse de la lignine a été écrite à partir des monolignols S (syningyl), H (p-hydroxy-phenyl) et G (guaiacyl) (Boerjan *et al.* 2003). La proportion de ces trois précurseurs principaux a été établie chez la Solanacée *Nicotiana tabacum* (Baucher *et al.* 1998). En revanche, la dégradation de la paroi cellulaire a été simplifiée et écrite comme une simple hydrolyse formant du glucose.

Les réactions de synthèse et de dégradation de tous les acides aminés ont été détaillées dans le modèle. Les réactions de dégradation de l'histidine et du tryptophane sont basées sur les connaissances chez les animaux car elles sont encore inconnues chez les plantes (Hildebrandt *et al.* 2015). La voie anaplérotique de formation de l'isoleucine à partir du 2-méthyl-malate (ou citramalate, métabolites identifiés dans les échantillons) a été ajoutée au modèle (Sugimoto *et al.* 2021). Ainsi la synthèse des protéines a été écrite à partir des vingt acides aminés protéinogéniques dont la proportion a été déterminée dans les fruits de tomate (Sosulski and Imafidon 1990). La dégradation des protéines a été simplifiée comme la restitution de tous les acides aminés dans les mêmes proportions et avec un coût énergétique en ATP.

Les voies de synthèses et de dégradation des bases puriques et pyrimidiques ont été détaillées. Bien que ces réactions ne soient pas contraintes par le dosage des nucléotides individuels, celles-ci ont une importance majeure dans le fonctionnement du modèle pour leur interconnexion avec des précurseurs du métabolisme primaire (cofacteurs, aminoimidazole carboxamide ribonucléotide [AICAR], 5-phosphoribosyl-1-diphosphate [PRPP], β -alanine, homocystéine, *etc.*). La synthèse des acides nucléiques a été écrite à partir des différents nucléotides, avec les proportions décrites chez la tomate (Sato *et al.* 2012; Kotwal *et al.* 2016). Cette réaction a été fixée comme réversible, permettant ainsi la dégradation des acides nucléiques.

Les réactions du système de maintien du pouvoir réducteur (ascorbate et glutathion), de la voie du shikimate, des principales polyamines (putrescine et spermidine), du shunt du GABA et du précurseur des terpénoïdes (géranyl-diphosphate) ont également été ajoutées au modèle. La voie du shikimate permet la synthèse, à partir du précurseur acide quinique, des composés phénoliques, dont les métabolites majoritaires sont, d'après les mesures expérimentales, l'acide chlorogénique et la rutine. La synthèse d' α -tomatine a été écrite à partir du cholestérol, le GABA étant le donneur d'azote (Sonawane *et al.* 2016; Nakayasu *et al.* 2021). La dégradation d' α -tomatine a été simplifiée comme étant une hydrolyse libérant les différents sucres et la partie aglycone, la tomatidine.

2.3.2. Réactions d'échanges

Le modèle a également été implémenté avec les différentes réactions de synthèse et de dégradation des cofacteurs nécessaires au fonctionnement tel que le folate, le NAD(P), le FAD et le coenzyme A. A l'exception du coenzyme A, tous les cofacteurs sont définis comme des métabolites internes, ce qui signifie qu'ils sont équilibrés : le NADPH est utilisé pour les biosynthèses alors que la NADH est FADH₂ sont pris en charge dans la respiration mitochondriale. Ainsi le réseau métabolique est contraint non seulement par l'équilibre du carbone et de l'azote, mais aussi par le statut redox et énergétique.

Des réactions d'accumulation ont été ajoutées pour tous les métabolites quantifiés ainsi que pour certains métabolites permettant d'équilibrer le modèle : (1) une réaction d'accumulation d'acide chlorogénique a été ajoutée comme une réaction potentielle d'export vers d'autres tissus pour les processus de lignification (Mondolot *et al.* 2006) ; (2) une réaction d'accumulation de cystéine qui, bien que non quantifiée, peut s'accumuler faiblement dans les cellules (Hildebrandt *et al.* 2015) ; (3) une réaction d'accumulation de géranyl-diphosphate afin de rendre compte de son rôle de précurseur et son implication dans la synthèse des terpénoïdes ; (4) une réaction d'accumulation de tomatidine afin d'équilibrer la dégradation de l' α -tomatine ; (5) une réaction d'accumulation d'ammonium.

Les sources de carbone, d'azote et d'oxygène correspondent à l'import de saccharose (Vsuc_up), de glutamine (Vgln_up), de nitrate (Vno3_up) et de dioxygène (Vo2_up). Ces flux sont simulés par le modèle.

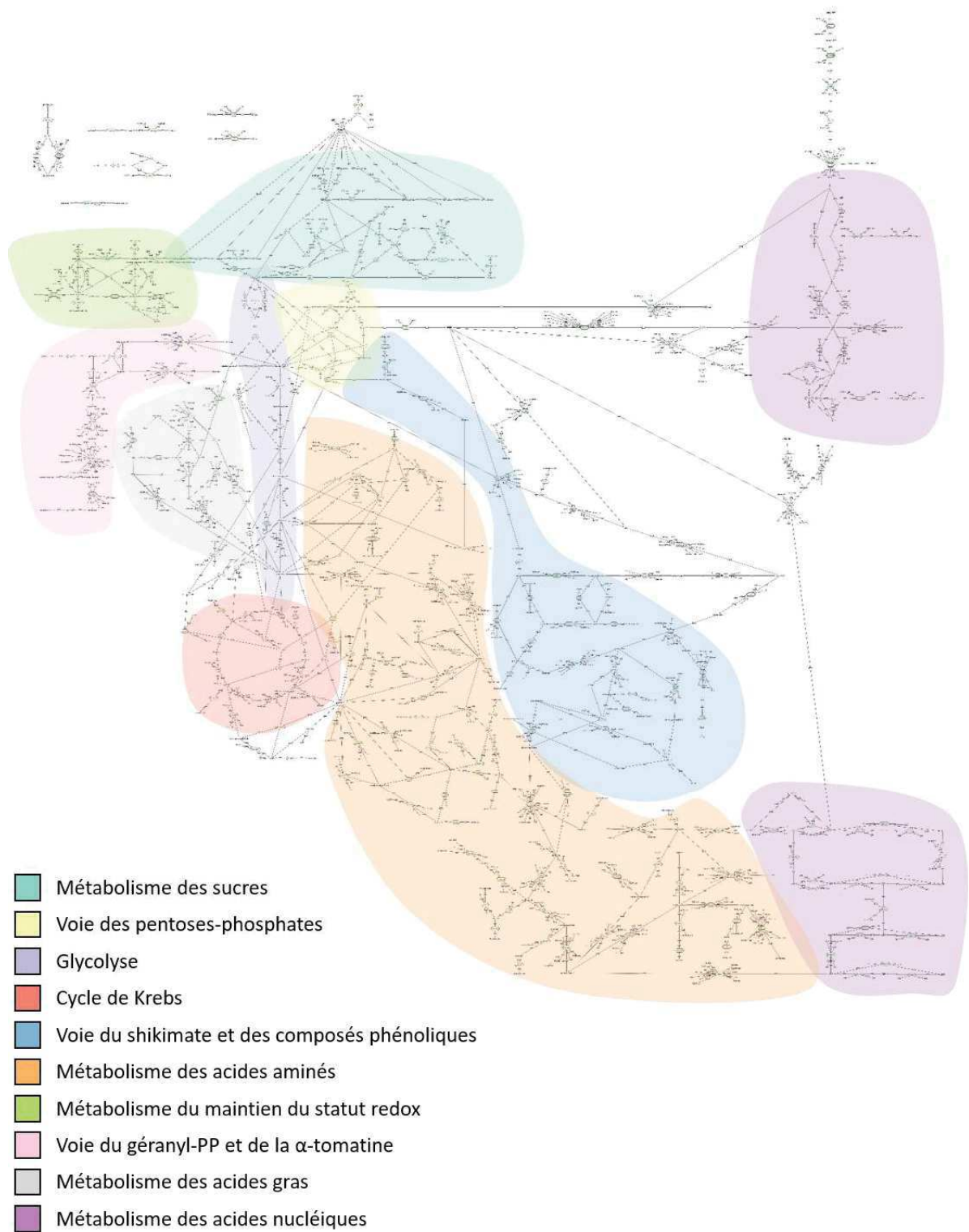


Figure V.1 : Vue d'ensemble du réseau métabolique reconstruit de la tige de tomate.

2.3.3. Matrice de stœchiométrie

Le réseau ainsi reconstruit, présenté en Figure V.1, comprend 298 réactions dont 56 réactions d'échanges (ou flux externes) et 236 métabolites dont 61 externes (les listes des réactions et des métabolites sont présentées en Annexe V.1 et V.2). Les réactions du modèle métabolique sont préférentiellement fixées comme irréversibles sauf si des données de la littérature prouvent le contraire comme par exemple les réactions catalysées par la sucrose synthase ou les transaminases. Une exception est faite pour les nucléotide-diphosphate réductases qui sont fixées comme réversibles pour équilibrer l'architecture du modèle. Ainsi, parmi les réactions internes du réseau métabolique, 167 réactions sont fixées irréversibles. Le réseau métabolique a été écrit sous forme de matrice stœchiométrique S de dimension $m \times r$ avec m , les métabolites en ligne et r , les réactions en colonne. La matrice contient les coefficients stœchiométriques des métabolites dans chaque réaction. Le coefficient est positif lorsque le métabolite est produit et négatif lorsqu'il est consommé. Parmi les réactions r décrites dans la matrice S , certaines permettent les échanges avec l'environnement (réactions externes). Elles mettent en jeu des métabolites externes au réseau métabolique qui n'entrent pas dans la matrice S , et représentent les constituant de la biomasse. Par opposition, les métabolites internes apparaissent dans la matrice et sont donc recyclés.

2.4. Résolution des flux

L'objectif de la modélisation consiste à résoudre les flux des 242 réactions internes. Pour réduire l'espace des solutions possibles, initialement très vaste, le modèle est contraint par plusieurs hypothèses et des données expérimentales.

2.4.1. Loi de conservation de la masse

L'état métabolique d'une cellule et sa variation dans le temps peuvent être décrits par les concentrations de métabolites et les vitesses de réactions. Leurs valeurs sont liées par la loi de conservation de la matière qui stipule que, lors d'une transformation de substrats en produits, le nombre d'atomes d'un type donné et la charge nette doivent s'équilibrer de chaque côté de l'équation. Ainsi, l'évolution de la quantité d'un métabolite m au cours du temps est égale à la somme des vitesses des réactions qui le consomment ou le produisent,

pondérée par les coefficients stœchiométriques. À l'intérieur d'un système contenant plusieurs réactions, on peut écrire :

$$\frac{dm}{dt} = \sum_{p=1}^n k_p \cdot v_p$$

avec

m , la quantité du métabolite (mmol) qui équivaut à la concentration à volume constant

t , le temps (jour)

n , le nombre de réactions dans le lequel le métabolite est impliqué

k_p , le coefficient stœchiométrique du métabolite dans la réaction p (avec $1 \leq p \leq n$)

v_p , le flux de la réaction p (mmol.jour⁻¹)

Cette équation, que l'on cherche à résoudre, peut être généralisée à l'ensemble du réseau métabolique :

$$\frac{dM}{dt} = S \cdot r = a$$

avec

M , le vecteur concentration des n_m métabolites internes au sein du réseau métabolique

t , le temps

r , le vecteur vitesse des n_r réactions au sein du réseau métaboliques

S , la matrice de stœchiométrie de taille (n_m, n_r)

a , le vecteur accumulation. Lorsque a est différent de 0 le système est dans un état dynamique et lorsque a est nul le système est dans un état stationnaire.

2.4.2. État pseudo-stationnaire

Pour réduire l'espace des solutions, une approximation de l'état pseudo-stationnaire est formulée (Song and Ramkrishna 2009). Cette hypothèse stipule que l'accumulation de

métabolites internes est négligeable par rapport au flux passant par ces métabolites et que, par conséquent, la somme des flux vers un métabolite est égale à la somme des flux en provenance de ce même métabolite. Ainsi, seuls les métabolites externes peuvent être consommés ou accumulés.

L'approximation de l'état pseudo-stationnaire permet de simplifier le système d'équations différentielles en un système d'équations linaires. En effet, la quantité des métabolites internes restant constante, la dérivée temporelle est nulle :

$$\frac{dM}{dt} = S \cdot r = 0$$

Connaissant la matrice stœchiométrique S , cette simplification permet donc de déterminer le vecteur vitesse r .

2.4.3. Fonction objectif

Une solution de flux est obtenue après optimisation, donnée par une fonction objectif, reposant sur une hypothèse d'optimalité du fonctionnement biologique (Jeffrey D Orth *et al.* 2010). Par exemple, une hypothèse peut être que l'évolution dirige la sélection des espèces vers un rendement maximal de biomasse. Dans ce cas, l'objectif du métabolisme est une croissance maximale de l'organisme (Feist and Palsson 2010). D'autres hypothèses peuvent être émises, comme la maximisation du rendement énergétique, la maximisation de la production d'un composé sécrété ou encore la minimisation des flux. Cette dernière repose sur l'hypothèse d'économie stipulant que les réactions ne se produisent pas inutilement (Holzhütter 2006). La minimisation du carré des flux permet de saisir les tendances générales des données et d'éviter la présence de cycle ayant des flux importants. Un modèle de cellule végétale hétérotrophes en culture utilisant cette fonction objectif permet de prédire à la fois la direction et l'ampleur des changements de flux dans le métabolisme central du carbone dans des conditions de stress (Williams *et al.* 2010). La minimisation du carré des flux présente également un intérêt mathématique majeur car elle conduit à une solution de flux unique (Holzhütter 2006). La minimisation du carré des flux a été utilisée comme fonction objectif pour résoudre le système et calculer des valeurs de flux dans chacune des conditions d'inoculation et de nutrition azotée.

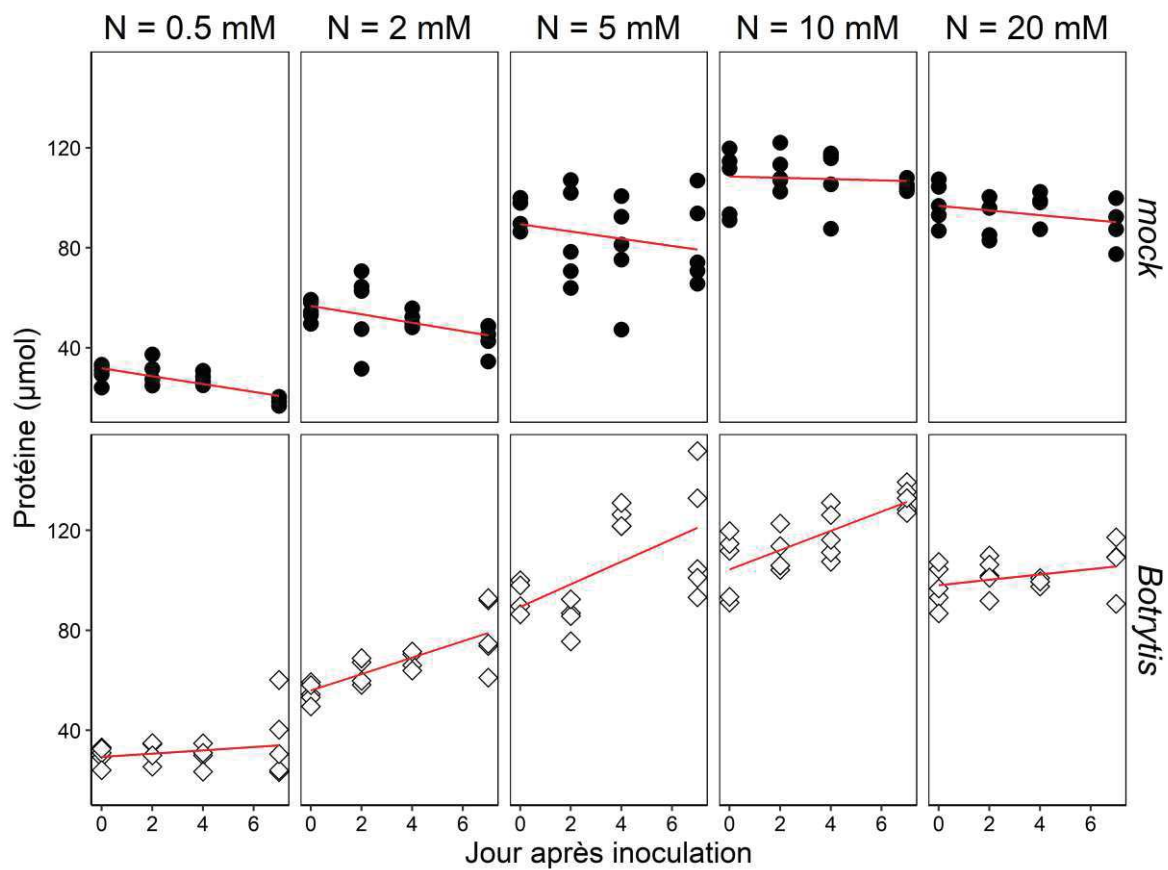


Figure V.2 : Exemple de régression appliquée aux quantités de protéines

Chaque point correspond à une mesure expérimentale. La ligne rouge correspond à la droite de régression.

2.4.4. Application des contraintes expérimentales

La capacité d'un modèle à prédire ou à expliquer le comportement phénotypique observé repose sur l'imposition de contraintes basées sur des données expérimentales ou la littérature. Les réactions connues pour être thermodynamiquement irréversibles *in vivo* sont contraintes d'avoir des vitesses supérieures ou égales à 0. De même, les limites supérieures des vitesses de réactions peuvent être contraintes par la capacité enzymatique (v_{\max}). Enfin, les flux externes d'échange avec l'environnement (absorption, accumulation ou dégradation) peuvent être déterminés expérimentalement par la quantification au cours du temps des métabolites externes.

2.4.4.1. Flux externes

Dans le modèle, un flux externe correspond à une vitesse d'accumulation (ou de consommation) du métabolite quantifié correspondant.

Afin de tenir compte de l'accroissement en biomasse observée, les quantités de métabolites externes et composants de la biomasse sont exprimés (en μmol) pour une tige de 1 cm de long, en utilisant la masse sèche de tige par unité de longueur mesurée pour chaque échantillon. Ainsi, une fonction de régression ajustée aux données expérimentales permet de décrire l'évolution temporelle de chaque métabolite quantifié. Un exemple de régression réalisée sur la quantité de protéines dans chaque condition, est illustré en Figure V.2. La dérivée temporelle de la fonction de régression permet de calculer, pour chaque pas de temps considéré, une valeur de flux externe. Dans un premier temps, pour cette étude, des régressions linéaires ont été systématiquement ajustées aux données expérimentales. Cela revient à considérer un flux constant sur les 7 jours d'observation ne tenant pas compte d'éventuelles variations temporelles et permet de limiter à 10 le nombre de conditions à comparer (5 conditions de nutrition azotée, avec ou sans infection par *Botrytis cinerea*). En effet, l'utilisation de fonctions de régression non linéaires était rarement justifiée d'un point de vue statistique.

Par conséquent, parmi les 56 flux externes présents dans le modèle, 46 sont déterminés dans toutes les conditions (Annexe V.3). Les dix autres flux externes ne sont pas contraints et correspondent aux réactions d'assimilation ($V_{\text{no3_up}}$, $V_{\text{suc_up}}$, $V_{\text{gln_up}}$), aux réactions d'échange gazeux ($V_{\text{o2_up}}$ et $V_{\text{co2_dis}}$) et aux réactions d'accumulations nécessaires à

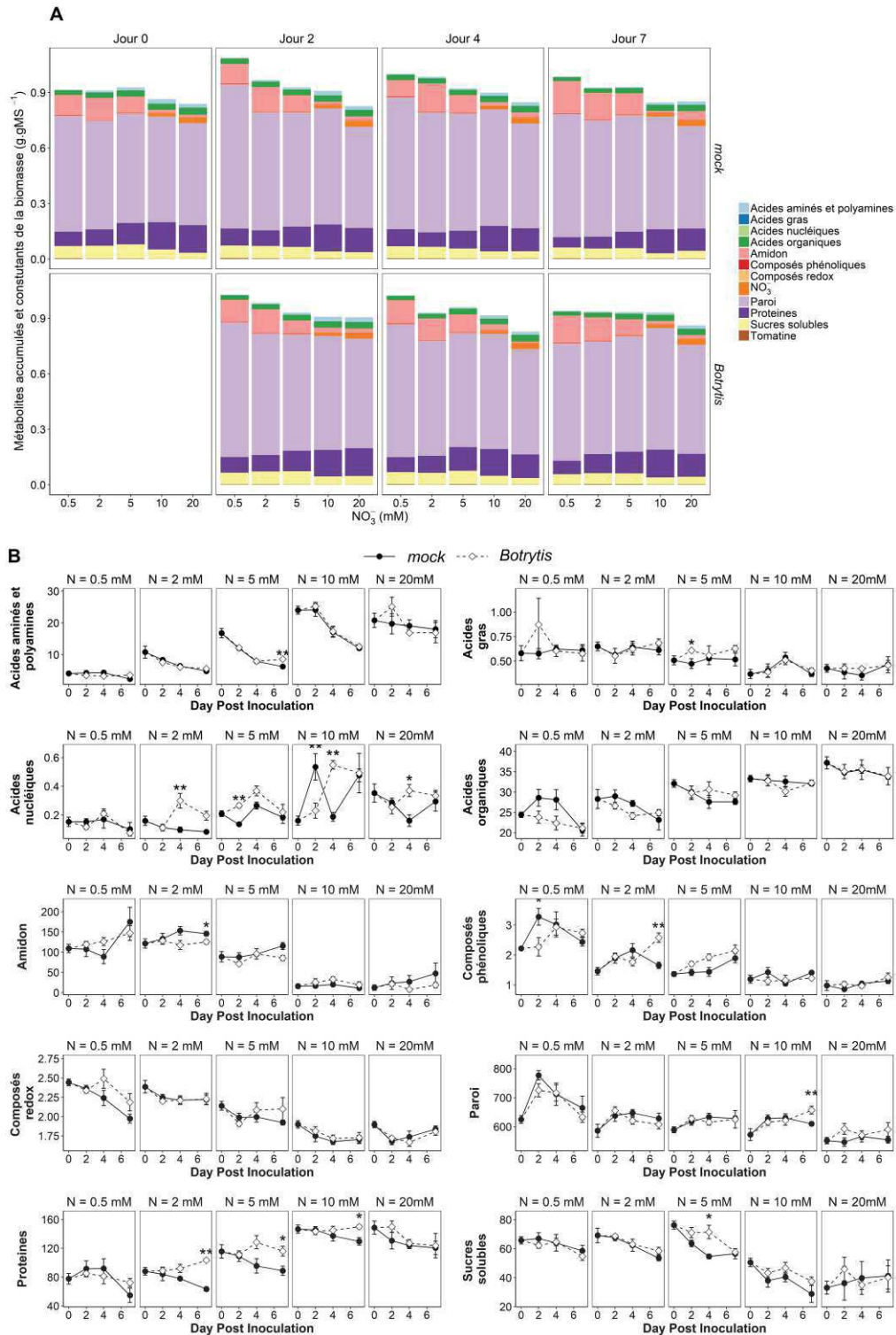


Figure V.3 : Bilan de biomasse de la tige de tomate.

(A) Composition de la biomasse dans 35 conditions étudiées. Toutes les données sont exprimées en g.gMS^{-1} . Chaque valeur correspond à la moyenne de 5 répétitions biologiques. (B) Evolution des constituants de la biomasse exprimés en mg.gMS^{-1} . Les différences significative (test de Mann-Whitney) entre les plantes *mocks* et inoculées sont indiquées par * (p-valeur < 0,05) et ** (p-valeur < 0.01). Chaque point correspond à la moyenne de 5 répétitions biologiques et les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre ces répétitions.

l'équilibre du modèle (V_{ac_cys} , V_{cqa_ph} , V_{ac_gpp} , V_{ac_tomd} , V_{ac_nh3}). Le flux externe d'accumulation d'acides nucléiques (V_{nucleo}) a été déterminé à partir des dosages des ARN totaux uniquement. Les quantités d'ADN ne sont pas prises en compte car considérées constantes entre les différentes conditions. Le flux d'accumulation d'acide chlorogénique (V_{ac_cqa}) a été déterminé à partir de la somme des quantités d'acide chlorogénique (acide 3-O-caffeoylquinique) et de son isomère l'acide néochlorogénique (acide trans-5-O-caffeoylquinique). Le flux d'accumulation de diacyl-glycerol (V_{ac_dag}) a été déterminé à partir de la somme des quantités des différents acides gras quantifiés.

2.4.4.2. Contrainte appliquée à un flux interne

Aucune contrainte n'est mise sur les flux internes. Les premières simulations ont produit des flux à travers la phosphoenolpyruvate carboxykinase (V_{pepck}) très importants, ce qui n'est pas cohérent avec les processus physiologiques connus dans les tiges. En effet, la PEPC est une enzyme clé de la régulation du flux vers la néoglucogenèse et dont l'activité est essentielle lors de la germination (Rylott *et al.* 2003). Comme, les quantités de transcrits de la PEPC sont très faibles dans les tiges de tomate et indétectables dans les feuilles mature (Bahrami *et al.* 2001), le flux à travers la PEPC (uniquement) a été limité (maximum de $0.0001 \mu\text{mol}\cdot\text{j}^{-1}$).

2.4.4.3. Expression des flux

Comme indiqué précédemment, les flux sont calculés par unité de longueur de tige (en $\mu\text{mol}\cdot\text{j}^{-1}\cdot\text{cm}$ de tige⁻¹). Puis pour faciliter la comparaison entre les différentes conditions et mettre en évidence une éventuelle reprogrammation métabolique, les flux sont ensuite exprimés sur la base d'un gramme de matière sèche (en $\mu\text{mol}\cdot\text{gMS}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$).

3. Résultats et discussion

3.1. Biomasse expliquée

Afin de vérifier l'hypothèse de la conservation de la masse dans le système, un bilan de masse, c'est-à-dire la somme des constituants qui composent la biomasse, a été effectué. La composition de la biomasse sèche a été déterminée dans les différentes conditions

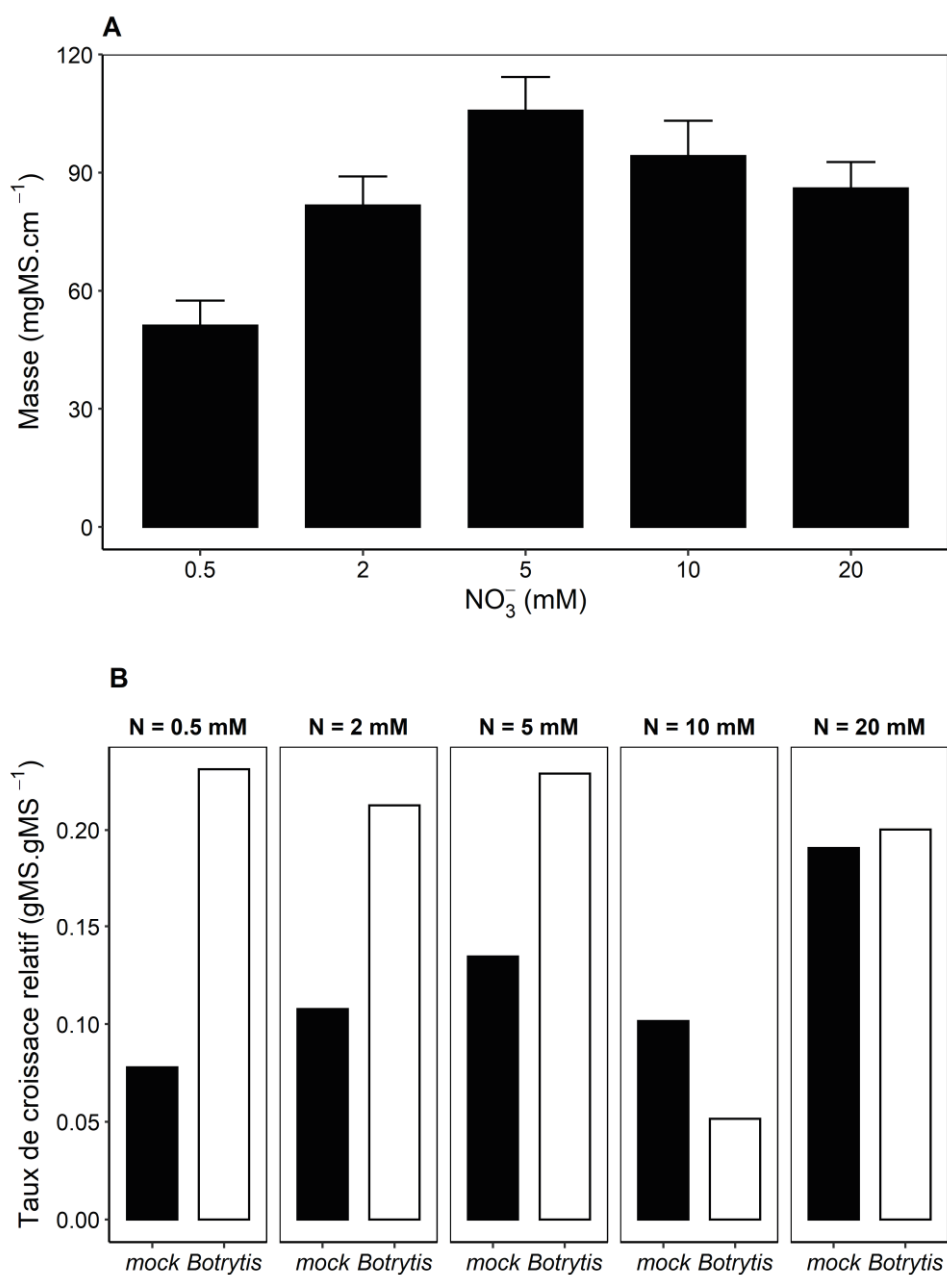


Figure V.4 : Croissance en masse sur la durée de l'expérimentation.

(A) Masse sèche d'une section de 1 cm de tige avant inoculation, exprimé en mg. Chaque valeur correspond à la moyenne de 5 répétitions biologiques et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre ces répétitions. (B) Taux de croissance relatif de la masse sèche de sections de 1 cm de tige, au cours des 7 jours de l'expérimentation, calculé à partir des valeurs moyennes de 5 répétitions biologiques.

(Figure V.3). Le bilan massique des métabolites accumulés et des macromolécules couvre en moyenne 90% de la biomasse sèche en considérant toutes les conditions. Le bilan de biomasse atteint 100% dans les conditions de faibles nutriments azotés et diminue quand la nutrition azotée augmente. Cette légère déviation à fort niveau d'azote peut s'expliquer par exemple par une accumulation d'ions (potassium ou autre) non prise en compte dans le calcul.

L'analyse de la composition de la biomasse permet d'approximer l'état constitutif des plantes avant infection, aux différents niveaux de nutrition azotée (Figure V.3B). Une analyse de variance sur chaque composant a été faite en testant l'effet azote, l'effet temps, et l'effet inoculation, et les interactions deux-à-deux. Ces analyses montrent que l'azote a un effet significatif sur la totalité des composants de la biomasse. Le temps a également un effet significatif, sauf sur la quantité d'acides gras, et l'analyse des moyennes montre une augmentation entre 0 et 7 jours des composés phénoliques, des acides nucléiques, et de l'amidon, et une diminution des acides organiques, des sucres solubles, des acides aminés, des protéines et des composés redox. L'inoculation induit une augmentation significative des nucléotides et des protéines, ainsi qu'une augmentation des composés phénoliques mais uniquement à 7 jours après inoculation, plus importante à bas niveaux d'azote.

3.2. Croissance

La région échantillonnée, située autour de la 6^e feuille, ne subit plus de croissance en longueur mais croît en masse sur la durée de l'expérience (Figure V.4). La masse sèche par unité de longueur d'une section de tige a été calculée pour chaque échantillon. La nutrition azotée influence la masse par unité de longueur des tiges avant inoculation, avec une augmentation d'un facteur 2 entre 0.5 et 5 mM de NO_3^- suivie d'une faible diminution entre 5 et 20 mM de NO_3^- . De plus, le taux de croissance relatif augmente d'un facteur 4 avec la nutrition azotée chez les plantes *mocks* alors qu'il est plus élevé et relativement constant chez les plantes inoculées, à l'exception des plantes à 10 mM de NO_3^- où le taux de croissance relatif chute brusquement de manière inexpliquée. Le faible taux de croissance observée dans cette condition n'est pas consistant avec le taux de croissance relatif aux autres niveaux de nutrition azotée, ni avec la masse par unité de longueur avant inoculation. Ainsi, le taux de croissance en biomasse a été corrigé par la moyenne des taux de croissance entre les niveaux 5 et 20 mM de NO_3^- pour les deux niveaux d'inoculation.

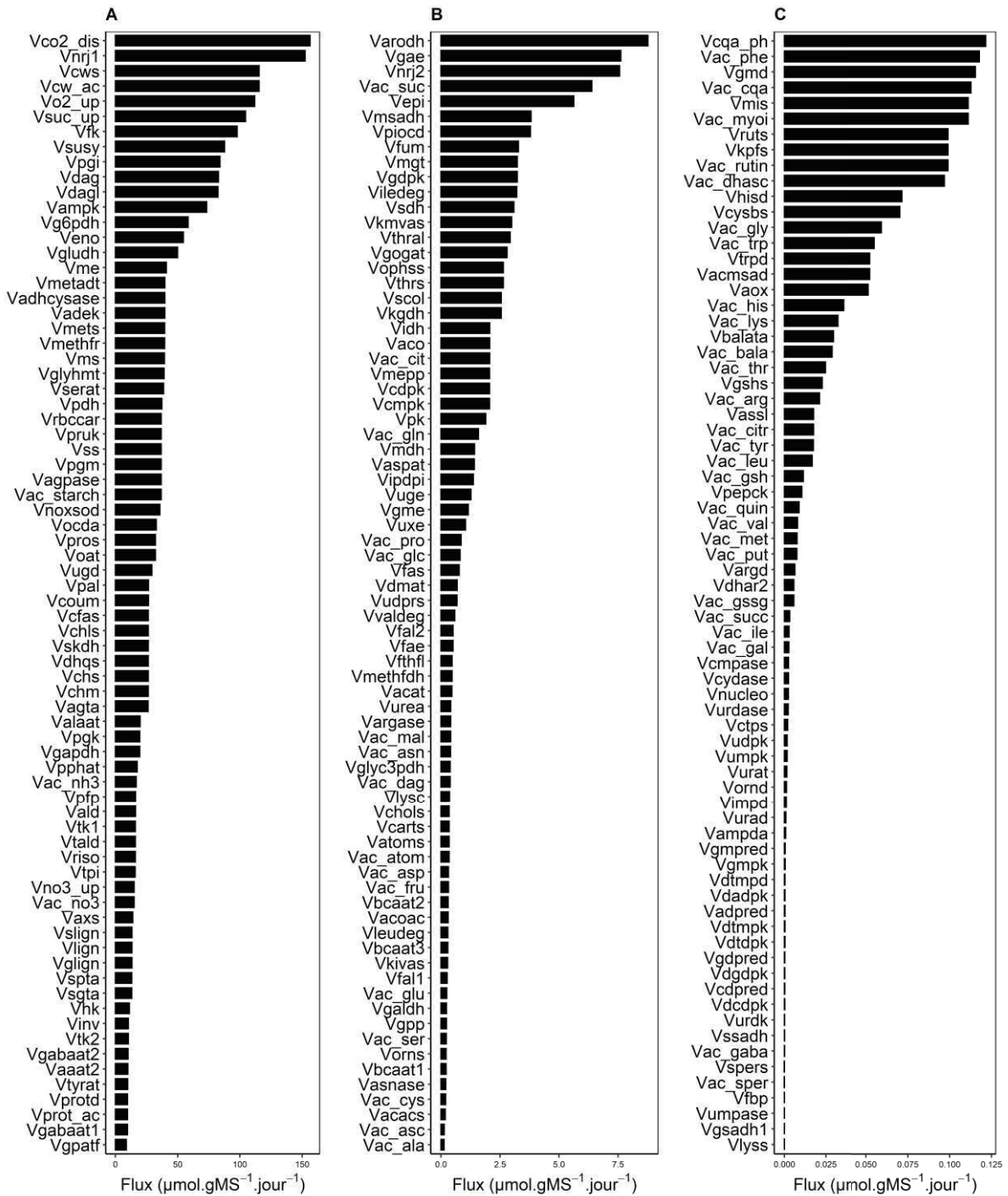


Figure V.5 : Répartition des flux calculés chez les plantes *mocks* en condition de forte nutrition azotée optimale (N = 20 mM de NO_3^-).

Les flux sont exprimés en valeur absolue. (A) Flux importants, échelle entre 0 et 150 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{j}^{-1}$. (B) Flux moyens, échelle ajustée entre 0 et 6 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{j}^{-1}$. (C) Flux faibles, échelle ajustée entre 0 et 0,15 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Les flux nuls (inférieur à 10^{-5}) ne sont pas représentés.

3.3. Flux en condition optimale de croissance

Une première analyse de la distribution des flux peut être faite chez les plantes *mocks* en condition de forte nutrition azotée ($N = 20 \text{ mM}$), condition dans laquelle le taux de croissance relatif est le plus important.

Sur la totalité des flux (internes et externes), 78 flux ont une valeur inférieure à 10^{-5} et sont considérés comme nuls. Parmi les 220 flux restant, en accord avec les données obtenues avec le précédent modèle sur fruit (Colombié *et al.* 2015), les flux les plus importants sont principalement associés au métabolisme central carboné, à la régénération d'ATP et de pouvoir réducteur, et aux échanges gazeux (Figure V.5). En accord avec le fonctionnement des tissus de tige, les flux de la saccharose synthase (V_{susy}), et dans une moindre mesure de l'invertase (V_{inv}), sont parmi les plus importants. En effet, ces deux enzymes présentes dans les tissus puits permettent l'utilisation du saccharose en provenance du phloème (Lunn 2016). Par ailleurs une forte activité enzymatique de ces enzymes a été mesurée dans les tiges de tomate (Wang *et al.* 1993). De plus, les données expérimentales montrent une importante accumulation de composés pariétaux ($V_{\text{cw_ac}}$) qui se traduit par un flux important vers le métabolisme des composés phénoliques à partir de l'érythrose-4-phosphate et du phosphoenolpyruvate (V_{dhqs} et V_{chs}) afin de soutenir la synthèse de lignine (V_{lign}), et vers l'UDP-glucose (V_{susy} et V_{ugpase}). En revanche, un flux très faible est observé vers les composés secondaires et leurs précurseurs (geranyl-PP, α -tomatine, rutine). Les données expérimentales montrent également une consommation de la majorité des pools d'acides aminés libres et autres composés azotés (citrulline, putrescine, spermidine) ce qui engendre un fort flux vers le stockage d'azote sous forme d'ammonium ($V_{\text{nh3_ac}}$).

Outre une organisation générale du métabolisme plutôt cohérente, le modèle prédit quelques comportements plus surprenants. Par exemple, le modèle prédit un flux faible à travers la pyruvate kinase (V_{pk}). La formation de pyruvate, nécessaire au fonctionnement de la pyruvate déshydrogénase (V_{pdh}), est alors assurée par des amino-transférases (V_{alaat} , V_{tyrat} et V_{gabaat2}) et de l'enzyme malique (V_{me}). Un flux nul est prédit à travers la citrate synthase (V_{cs}) entraînant un fonctionnement non cyclique du cycle de Krebs entre, d'une part, l' α -cetoglutarate et le citrate, et d'autre part, entre l' α -cetoglutarate et l'oxaloacétate, avec une alimentation en malate provenant du glyoxylate et de l'acétyl-coenzyme A via la malate

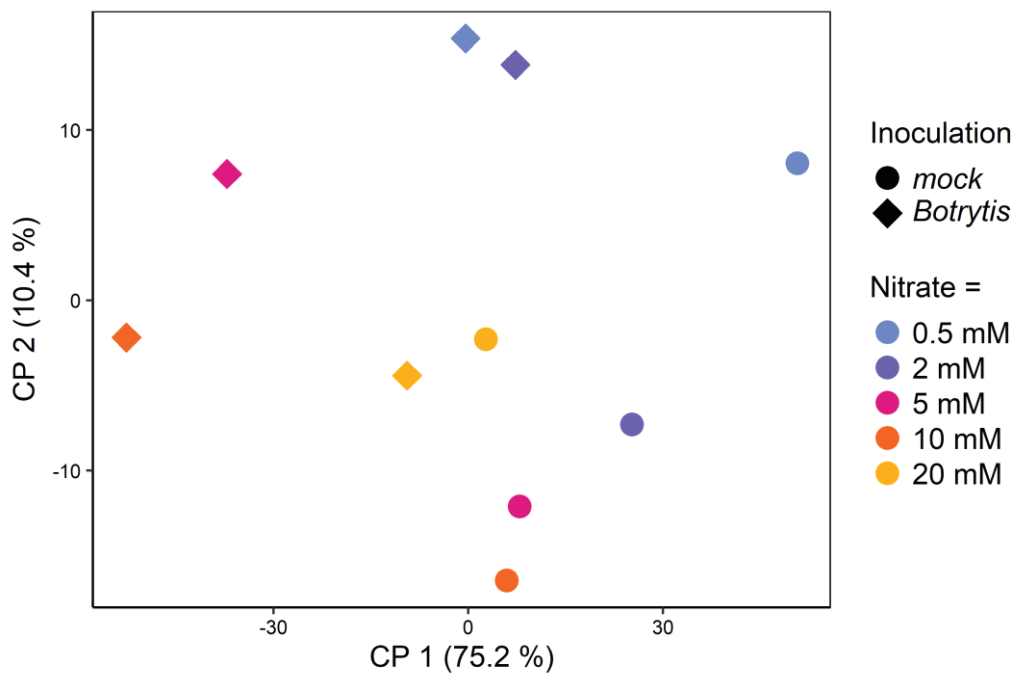


Figure V.6 : Analyse multivariée des résultats de modélisation

Scores plot d'une ACP réalisée sur les valeurs de flux internes supérieures à $10^{-5} \mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{j}^{-1}$ dans au moins une condition. Les données ont été centrées-réduites. Chaque point représente une condition modélisée avec une couleur différentes selon le niveau de nutrition azotée et une forme différentes selon l'inoculation.

synthase (V_{ms}). Cette prédiction du modèle n'est pas en accord avec les différents modèles de fonctionnement du cycle de Krebs chez les plantes (Sweetlove *et al.* 2010). Finalement, bien que la fonction objectif utilisée minimise les cycles, deux cycles avec un flux significatifs sont simulés. Le premier se situe au niveau du métabolisme des lipides, avec un flux prédit parmi les plus élevés à travers la synthèse (V_{dag}) et la dégradation (V_{dagl}) de diacylglycerol. Le deuxième cycle se situe entre la proline, la glutamate-semialdehyde et l'ornithine avec un flux élevé à travers l'ornithine amino-trasférase (V_{oat}), l'ornithine cyclodeaminase (V_{ocda}) et la réaction de synthèse de proline (V_{pros}). Ces deux cycles sont possiblement impliqués dans la régénération de NADPH.

Pour conclure, malgré quelques flux dont les valeurs peuvent conduire à interrogation, le modèle prédit un fonctionnement du métabolisme cohérent pour une tige avec un flux important dédié à la synthèse des parois nécessaire pour assurer le rôle de tissus de soutien ainsi qu'un flux élevé à travers la saccharose synthase (V_{susy}), enzyme spécifique des tissus puits.

3.4. Contraste des flux pour les 10 conditions

Le modèle a été résolu pour les 10 conditions, soit 5 modalités de nutrition azotée et 2 modalités d'inoculation. Une analyse descriptive non supervisée permet d'avoir une vision globale des différences observées entre les 10 conditions, aussi une analyse en composante principale (APC) a été réalisée sur les flux internes non nuls (valeur absolue supérieure à 10^{-5} , Figure V.6). La première composante principale (CP 1), représentant 75.2 % de la variance totale, permet de séparer les flux selon l'inoculation alors que les modalités de nutrition azotée sont séparées par l'association de la première et de la deuxième composante (CP 2 représentant 10.4 % de la variance totale). Cependant les conditions N0.5mM-*Botrytis* et N2mM-*Botrytis*, N5mM-*mock* et N10mM-*mock*, et N20mM-*mock* et N20mM-*Botrytis* sont peu différentes deux-à-deux. En effet, pour ces dernières conditions (N20mM-*mock* et N20mM-*Botrytis*), malgré l'infection des plantes, peu de différences des pools métaboliques ont été observées (*cf.* Chapitre IV). En revanche, cela est plus surprenant pour les conditions N0.5mM-*Botrytis* et N2mM-*Botrytis* où le niveau de nutrition azotée est multiplié par 10, ce qui se traduit par des intensités de symptômes et des pools métaboliques significativement

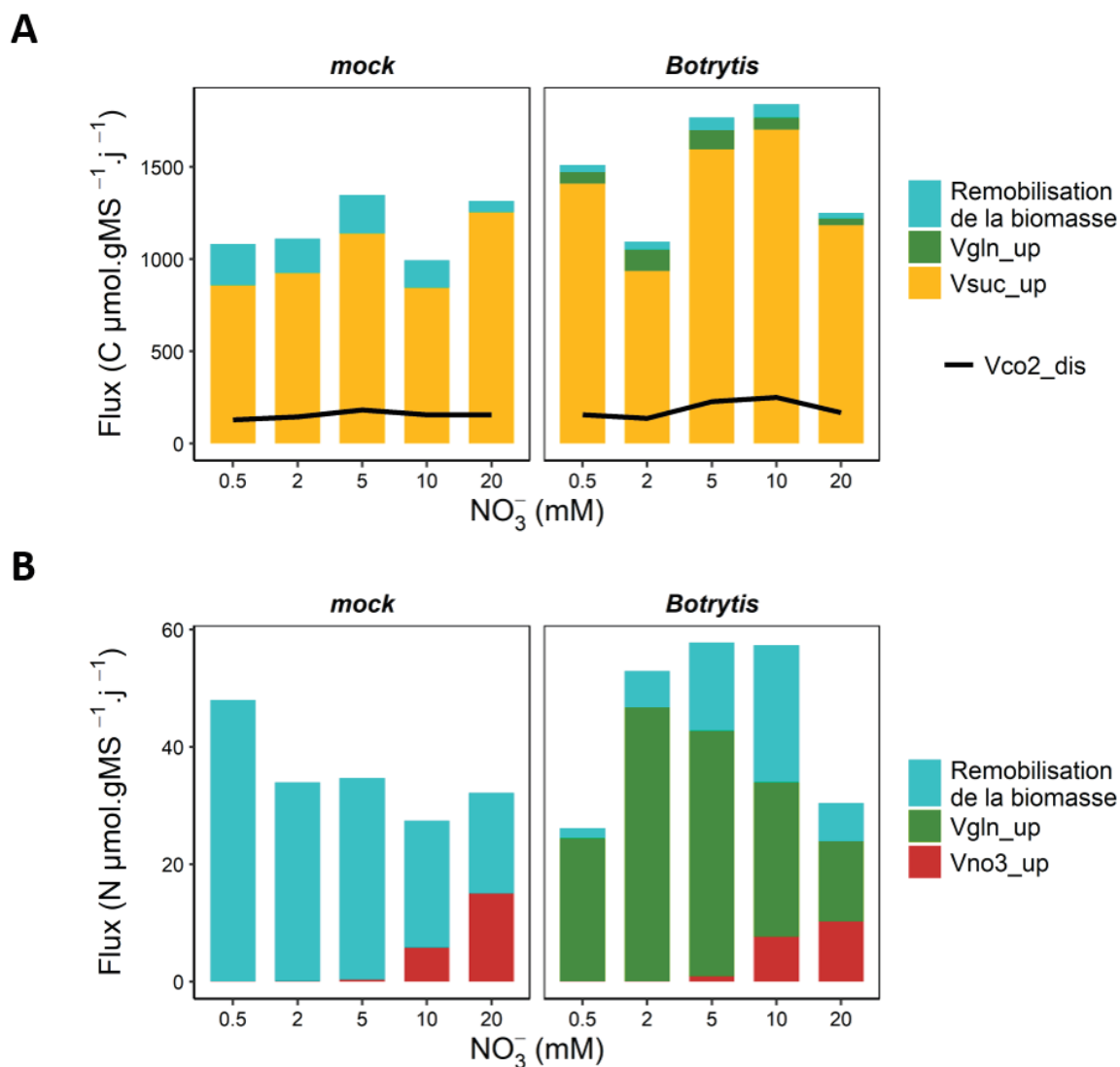


Figure V.7 : Carbone et azote métabolisé dans les différentes conditions de nutrition azotée et d'inoculation.

(A) Carbone total métabolisé et carbone relargué sous forme de CO₂. (B) Azote total métabolisé. Les flux sont rapportés au nombre d'atomes de carbone et d'azote présent dans chaque composé métabolisé.

différents. Il en est de même pour les conditions N5mM-*mock* et N10mM-*mock* où le niveau de nutrition azotée double et les variations de pool métaboliques sont significatives.

Cette analyse non supervisée montre qu'il existe des flux variables selon les conditions de nutrition azotée et d'inoculation.

3.5. Assimilation différentielle de carbone et d'azote

Les flux d'import simulés par le modèle, qui tiennent compte de l'accumulation des métabolites externes et de l'augmentation de biomasse, permettent d'estimer les besoins en carbone et en azote nécessaires au fonctionnement du métabolisme (Figure V.7). La demande en carbone, c'est-à-dire le carbone total métabolisé, a été exprimée comme la somme du flux entrant de saccharose (V_{suc_up}) et glutamine (V_{gln_up}), pondérée du nombre d'atomes de carbone de chaque molécule. De même, la demande en azote a été exprimée comme la somme des importations en glutamine (V_{gln_up}) et nitrate (V_{no3_up}). En parallèle, la diminution au cours du temps des pools de certains métabolites accumulés et des constituants de la biomasse, illustrée par un flux externe négatif, traduit une remobilisation du carbone et de l'azote à partir de ces molécules.

Le CO_2 est interne au modèle et donc recyclé avec une réaction irréversible non contrainte de dissipation de l'excès de CO_2 (V_{co2_dis}). Ainsi, les réactions de fixation du CO_2 telles que la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (V_{rbccar}) ou la phosphoenolpyruvate carboxylase (V_{pepc}) ne font que réassimiler le CO_2 respiré, conformément au comportement de ces enzymes dans les tiges (Kocurek *et al.* 2020). Cependant, cette ré-assimilation ne concerne pas la totalité du carbone respiré et une partie du carbone est dissipé. L'efflux de CO_2 prédit par le modèle est globalement constant entre les différentes conditions et du même ordre de grandeur que ceux mesurés expérimentalement sur des tiges de jeune bouleau (Wittmann *et al.* 2006) et de jeune chêne (De Roo *et al.* 2019) et sur fruit détaché de tomate (Calegario *et al.* 2001). La dissipation de carbone, représentant entre 10 et 15% du carbone métabolisé, est supérieure, de 20 % à 0.5 et 5 mM de NO_3^- et de 60 % à 10 mM de NO_3^- , chez les plantes inoculées par rapport aux plantes *mocks*. Cette augmentation de respiration est cohérente avec l'augmentation de masse pour les tiges inoculées.

De manière générale, l'infection par *B. cinerea* engendre un surcroît d'influx de carbone et d'azote. Cela suppose une augmentation de l'assimilation du saccharose (V_{suc_up}), qui est

la source principale de carbone quelle que soit la condition observée, et de glutamine (VgIn_up). De plus, une remobilisation de la biomasse plus importante est observée chez les plantes *mocks*, provenant en majorité de la dégradation des protéines et de la diminution des pools d'acides aminés libres tel que la glutamine ou l'aspartate. Le maintien de ces pools de composés azotés, chez les plantes inoculées, suppose une entrée d'azote supplémentaire ; en conséquence, le modèle simule un flux d'import de glutamine significatif avec un flux d'import de nitrate qui n'est possible qu'aux niveaux élevés de nutrition azotée. Les flux totaux de carbone et d'azote métabolisés soustraits de l'efflux de CO₂ permettent d'estimer un rapport C / N simulé du même ordre de grandeur que ceux mesurés expérimentalement dans les tiges de tomates (Hoffland *et al.* 1999; Royer *et al.* 2013). De plus, les influx de carbone et d'azote sont du même ordre de grandeur que ceux nécessaire à la formation de la biomasse mesurée (Figure V.4).

Finalement, pour faire face à l'inoculation par *B. cinerea*, le modèle prédit une augmentation de l'import en carbone et en azote avec, principalement, un apport exogène de glutamine, représentant une portion négligeable de carbone mais une source importante d'azote.

3.6. Voies métaboliques qui diffèrent selon les traitements

Malgré des variations de flux externes entre les différentes conditions, la robustesse du modèle entraîne la conservation de l'importance relative des différents flux à l'exception de quelques réactions impliquées dans le métabolisme des sucres et la glycolyse. Une première approche pour identifier les divergences liées aux traitements consiste à regarder le flux moyen passant par les grandes voies métaboliques. Ainsi, le réseau métabolique a été découpé en 20 groupes représentant des fonctions particulières (Annexe V.1) : l'assimilation des sucres et le stockage sous forme d'amidon, la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates, le cycle de Krebs et ses voies anapérotyques, le shunt du GABA, l'assimilation de l'azote, la voie des acides aminés branchés (valine, leucine et isoleucine), le métabolisme de l'histidine, le métabolisme de la proline, le métabolisme des autres acides aminés (glycine, serine, alanine, cystéine, méthionine et thréonine), la voie du shikimate et des composés phénoliques, la voie des polyamines, la voie du géranyl-diphosphate et de l' α -tomatine, les réactions de synthèse et dégradation des protéines, les voies des synthèse et de dégradation

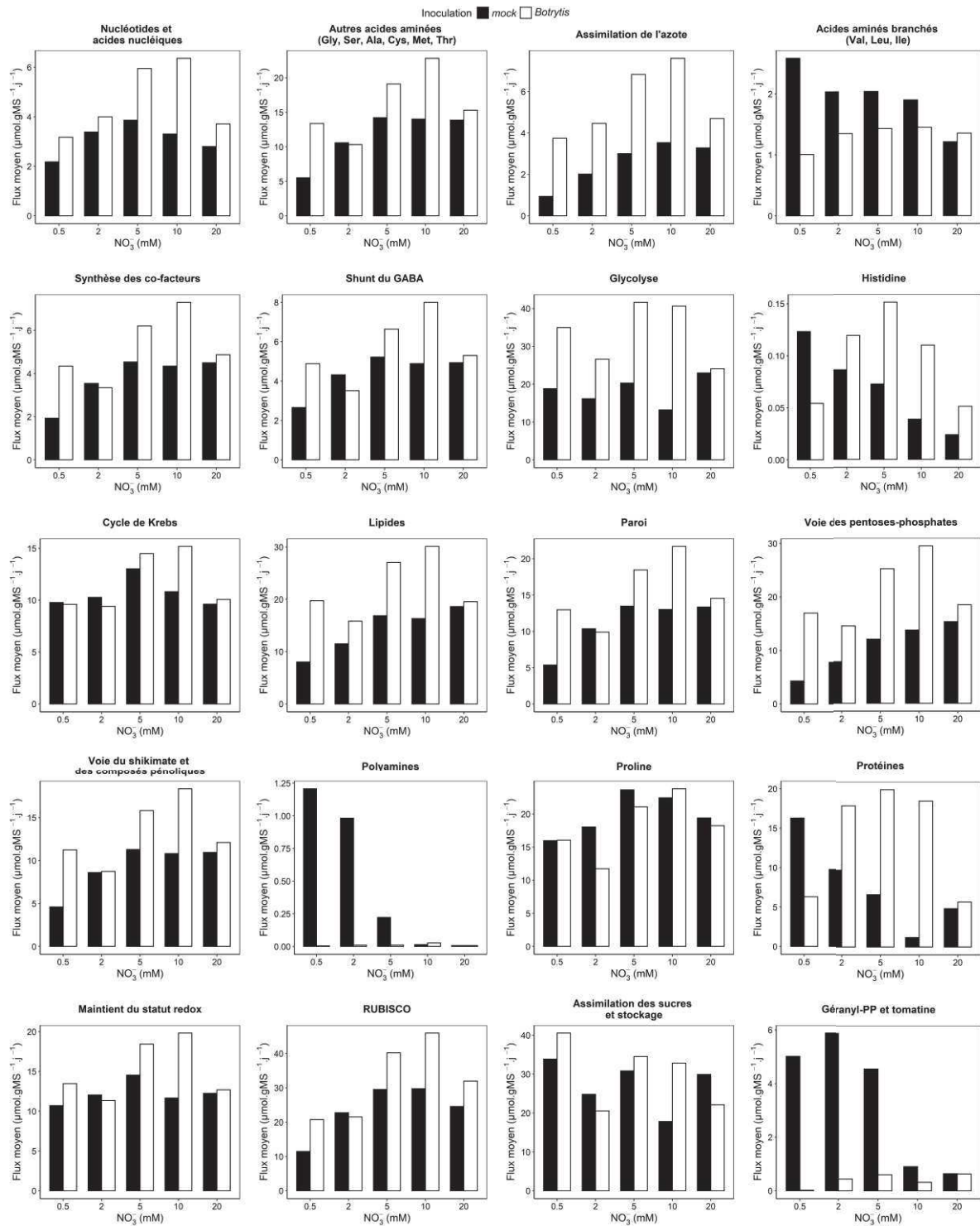


Figure V.8 : Intensité du flux moyen à travers les différentes voies métaboliques dans les différentes conditions de nutrition azotée et d'inoculation.

Les flux moyens sont exprimés en $\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

des parois, le métabolisme des acides nucléiques, le métabolisme des lipides, le métabolisme de maintien du statut redox, les réactions de la RUBISCO, et enfin les réactions de synthèse des co-facteurs (coenzyme A, FAD, NAD(P) et dérivés du folate). Le flux moyen à travers chaque voie métabolique est obtenu par la moyenne des valeurs absolues de tous les flux internes d'un même groupe. Bien que ce flux moyen n'a aucune interprétation biologique, il permet de hiérarchiser l'importance des différentes voies métaboliques en s'affranchissant du nombre de réaction qu'elles contiennent, et de mettre en évidence les effets des traitements sur l'intensité des flux. Cependant, le flux moyen peut cacher des modifications métaboliques majeures comme le changement de sens d'une réaction dont l'intensité serait identique.

Conformément avec l'augmentation du taux de croissance, l'inoculation avec *B. cinerea* entraîne, de façon générale, une augmentation du flux moyen par rapport aux plantes *mocks*, à l'exception du métabolisme des acides aminés branchés, des polyamines, du géranyl-diphosphate et de la proline (Figure V.8). Les différences de flux moyens liées à l'infection sont plus importantes à niveau de nutrition azotée intermédiaire ou optimal (5 ou 10 mM de NO_3^-) et presque nulle à fort niveau de nutrition azotée (20 mM de NO_3^-). En effet, il n'y a pas de différences de croissance à fort niveau de nutrition azotée (20 mM de NO_3^-) entre les plantes *mocks* et inoculées. Chez les plantes *mocks*, l'augmentation de la nutrition azotée entraîne une augmentation du flux moyen à travers la majorité des voies métaboliques avec un plateau à partir des niveaux de nutrition azotée intermédiaire ou optimal (5 ou 10 mM de NO_3^-). Pour ces voies métaboliques, le flux moyen est corrélé positivement au taux de croissance des plantes. Ceci indique que les flux chez les plantes *mocks* sont largement influencés par la croissance alors que ce n'est pas le cas chez les plantes inoculées. En revanche, le flux moyen à travers la glycolyse, le cycle de Krebs et le métabolisme du maintien du statut redox est globalement constant avec l'augmentation du niveau de nutrition azotée, alors que le flux moyen à travers le métabolisme des protéines, des acides aminés branchés, de l'histidine, des polyamines et du géranyl-diphosphate, diminue.

Afin de s'affranchir des effets de la croissance sur les flux, les valeurs de flux ont été normalisés par rapport à l'entrée de carbone simulée (Figure V.9). Ainsi, l'inoculation induit une diminution des flux relatifs à travers le cycle de Krebs, le métabolisme de la proline, le métabolisme d'assimilation des sucres, le métabolisme du maintien de statut redox, et une

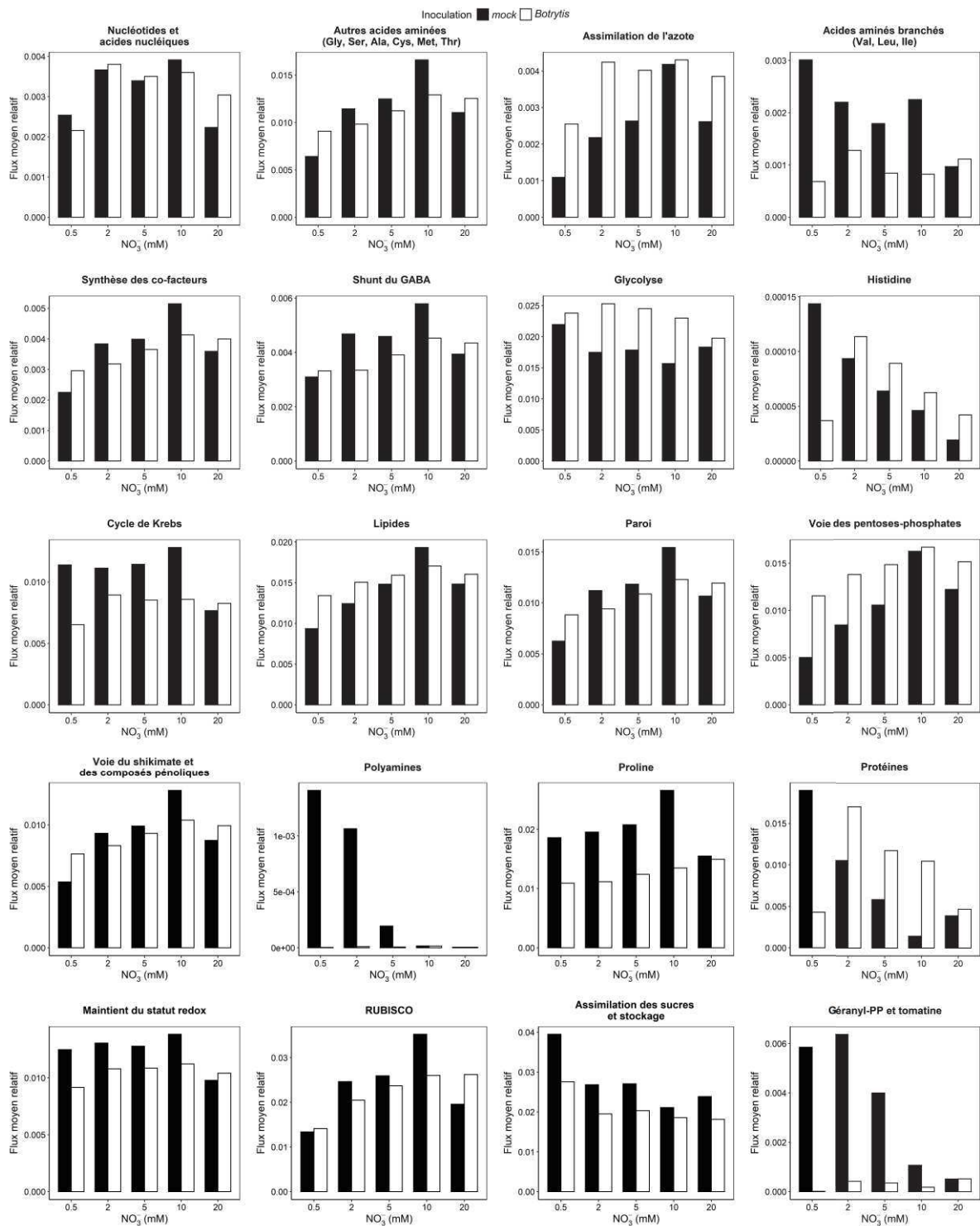


Figure V.9 : Flux moyens rapportés aux flux entrant de carbone simulée, à travers les différentes voies métaboliques dans les différentes conditions de nutrition azotée et d'inoculation.

augmentation des flux relatif à travers le métabolisme de l'assimilation de l'azote, la glycolyse et la voie des pentoses-phosphates. Ces modifications sont plus importantes à faibles niveaux de nutrition azotée. De plus, chez les plantes inoculées, l'azote induit une augmentation du flux relatif à travers le métabolisme de l'assimilation de l'azote et la voie des pentoses-phosphates à faible niveau de nutrition azotée alors qu'il a tendance à diminuer pour le métabolisme d'assimilation des sucres. Ces observations ne concordent pas totalement avec les différentes études transcriptomiques qui montrent une surexpression, chez de nombreuses espèces suite à l'infection par *B. cinerea*, de gènes associées au métabolisme des phénylpropanoïdes, de l'assimilation de l'azote, de la plupart des acides aminés du maintien du statut redox et de biosynthèse des parois (De Cremer *et al.* 2013; Agudelo-Romero *et al.* 2015; Vega *et al.* 2015; Haile *et al.* 2020; Reboledo *et al.* 2021).

Le flux à travers le métabolisme des protéines est associé chez les plantes *mocks* au catabolisme des protéines alors qu'il est associé à la synthèse de protéines chez les plantes inoculées. Les études protéomiques montrent une augmentation des protéines après infection par *B. cinerea* chez la tomate (Shah *et al.* 2012), le kiwi (Liu *et al.* 2018) et des cultures cellulaires de vigne (Dadakova *et al.* 2015). Les protéines enrichies par l'infection sont associées aux interactions plantes-pathogènes mais également à des fonctions enzymatiques associées par exemple au pyruvate, aux sucres et à l'amidon, à la fixation du carbone et à la glycolyse. En revanche, la dégradation des protéines chez les plantes *mocks* pourrait être liée au changement d'intensité lumineuse lié au passage en chambre de culture au moment de l'inoculation. En effet, Liu *et al.* (2020) ont montré une sous-expression des protéines en condition de faible intensité lumineuse.

De façon surprenante, les flux moyens à travers des métabolites secondaires, comme le géranyl-diphosphate, l' α -tomatine et les polyamines, sont plus élevés chez les plantes *mocks* aux niveaux faibles et intermédiaire de nutrition azotée (0.5, 2 et 5 mM de NO_3^-) comparé à toutes les autres conditions, alors qu'ils sont généralement associés à la défense (Gershenson and Dudareva 2007; Marco *et al.* 2014).

3.7. Modification du métabolisme central carboné

Les modifications des flux liées aux traitements ont été analysées plus en détails au niveau du métabolisme central carboné (Figures V.10 et V.11).

En accord avec nos précédents résultats d'expression de gènes (Lacrampe *et al.* 2021), le modèle prédit des flux de dégradation du saccharose légèrement plus élevés chez les plantes *mocks*, avec une répartition différente selon la nutrition azotée. Le flux à travers la sucrose synthase (V_{susy}) augmente légèrement avec la nutrition azotée, alors que le flux à travers l'invertase (V_{inv}) diminue. Le fructose étant produit par ces deux réactions et le glucose uniquement par l'invertase, il en résulte un flux à travers la fructokinase (V_{fk}) constant avec la nutrition azotée alors que le flux à travers l'hexokinase (V_{hk}) diminue. Cependant, une partie du fructose-6-phosphate formé est transformée en glucose-6-phosphate qui alimente, d'une part, la phosphoglucomutase (V_{pgm}) pour la formation de glucose-1-phosphate qui est un précurseur de formation de différents sucres de la paroi et de l'amidon, et d'autre part, la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphates (V_{g6pdh}). Le flux à travers la phosphoglucomutase est plus faible chez les plantes inoculées et diminue avec la nutrition azotée. Le modèle simule donc une diminution chez les plantes infectées du stockage sous forme d'amidon, en accord avec les données de métabolomique. De plus, chez les plantes inoculées, les flux à travers l'invertase et l'hexokinase sont fortement corrélés avec l'intensité de la maladie, contrairement au flux à travers la phosphoglucomutase.

La diminution d'utilisation du glucose-6-phosphate pour former de l'amidon chez les plantes inoculées induit une augmentation des flux à travers la voie des pentoses-phosphates, principalement à faible niveau de nutrition azotée. En revanche, le flux à travers la transketolase (V_{tk2}), catalysant la formation d'érythrose-4-phosphate et xylulose-5-phosphate à partir de fructose-6-phosphate et glyceraldehyde-3-phosphate, est plus élevé chez les plantes *mocks*, induisant ainsi un flux à travers l'épimérase (V_{epi}) vers la formation de ribulose-5-phosphate, précurseur nécessaire au fonctionnement de la RUBISCO. De plus, chez les plantes *mocks*, au plus faible niveau de nutrition azotée (0.5 mM de NO_3^-), la partie oxydative de la voie ne fonctionne pas (V_{g6pdh}), et le ribulose-5-phosphate est formé par la partie non oxydative de la voie des pentose-phosphates.

Le surplus de flux chez les plantes inoculées est principalement dirigé vers la glycolyse, représentée par la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (V_{gapdh}) et pas vers la formation des composés phénoliques (V_{dqhs}). Chez les plantes inoculées, l'augmentation de flux calculés à travers la glycolyse engendre une augmentation de pouvoir réducteur (NADH) par la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (V_{gapdh}). De même, le coup énergétique

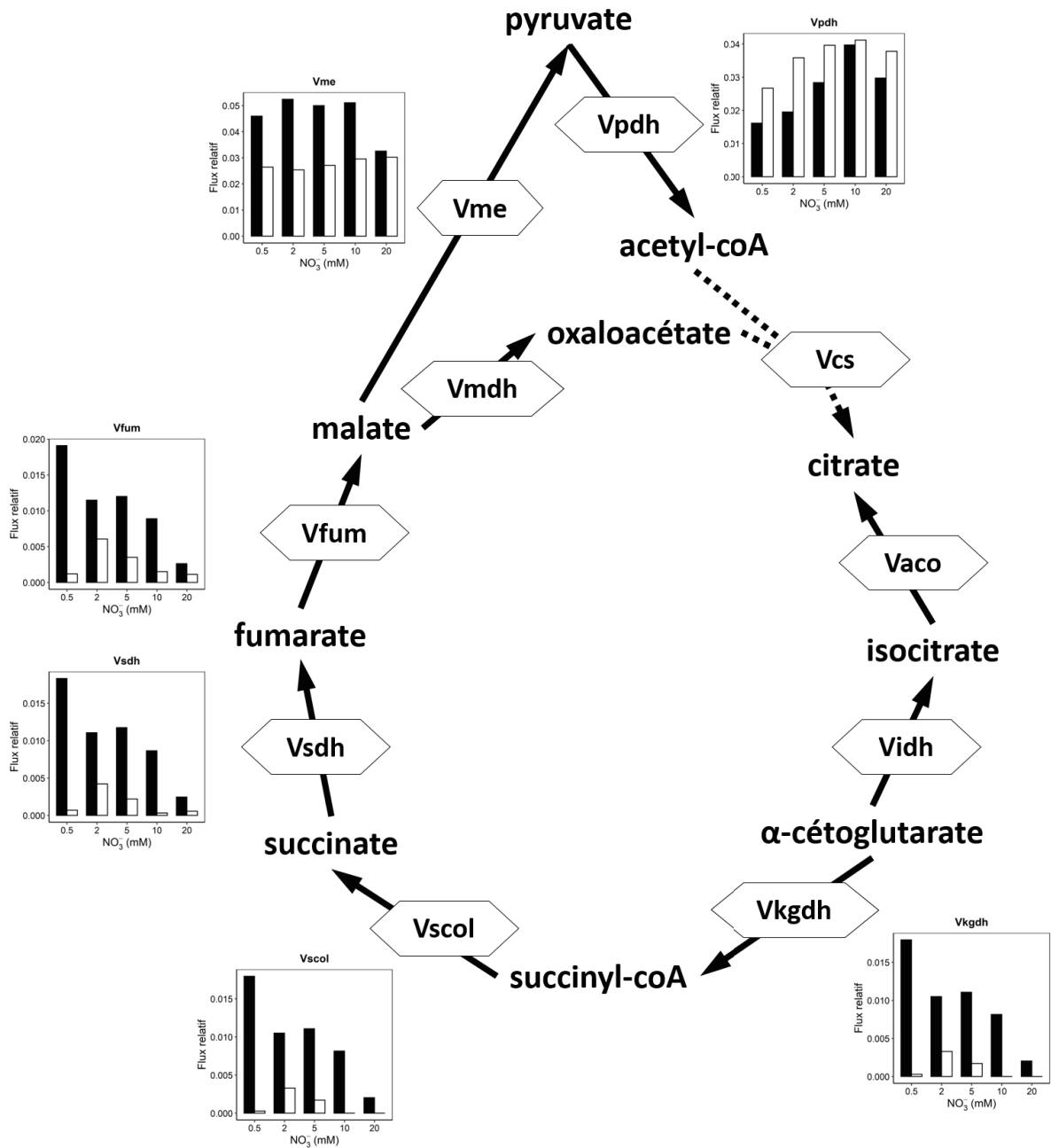


Figure V.11 : Représentation schématique du cycle de Krebs.

Les flux métaboliques, normalisés par le flux simulé de carbone entrant, sont représentés, dans chaque condition, par les diagrammes en bâtons, avec en noir les plantes *mocks* et en blanc les plantes inoculées. Les pointillés représentent des flux nuls.

de la fructokinase, et dans une moindre mesure de l'hexokinase, est en partie compensé par l'activation de la phosphoglycerate kinase (Vpgk) et de la pyruvate kinase (Vpk).

Au niveau du cycle de Krebs, comme montré précédemment, le flux à travers la citrate synthase (Vcs) est nul dans toutes les conditions, impliquant un fonctionnement non cyclique entre l' α -cetoglutarate et le malate. Le flux à travers ces réactions est très faible chez les plantes inoculées par rapport aux plantes *mocks* où le flux diminue avec l'augmentation de la nutrition azotée. En revanche, le flux à travers l'enzyme malique (Vme) est constant quel que soit le niveau de nutrition azotée. Ces observations tendent à montrer une utilisation différentielle du pyruvate entre les plantes *mocks* et inoculées.

4. Conclusion

Les changements de flux métaboliques de la tige de tomate, liés à la nutrition azotée et à l'inoculation avec *Botrytis cinerea*, ont été calculés à partir d'un modèle sous contraintes. La combinaison d'un réseau métabolique d'échelle moyenne (près de 300 réactions biochimiques), contraint par un jeu de dizaines de données expérimentales, a permis de calculer environ 250 flux internes au sein du réseau. Ainsi, les flux calculés par le modèle permettent de mettre en évidence des différences métaboliques liées à la nutrition azotée et à la sensibilité à *B. cinerea*. Pilote d'une partie des contraintes de flux externes, la composition de la biomasse constitutive apparaît différente entre les conditions de nutrition azotée, évolue pendant la durée des observations, et montre des effets de l'inoculation sur les protéines, les acides nucléiques et les composés phénoliques. L'inoculation par *B. cinerea* entraîne un réajustement métabolique important avec une augmentation des flux à travers la glycolyse et la voie des pentoses-phosphates et une diminution des flux à travers le cycle de Krebs et le stockage d'amidon. En normalisant cet effet de la croissance accrue chez les plantes inoculées par le carbone importé, le modèle indique que l'azote modifie certains flux chez les plantes inoculées de manière différente à la façon dont il modifie les flux chez les plantes *mocks*. Cela indique une adaptation des flux suite à l'infection spécifique à la disponibilité en azote. C'est le cas par exemple de flux vers la synthèse des nucléotides, de l'assimilation de l'azote, de la voie des pentoses phosphates.

L'hypothèse d'état pseudo-stationnaire est indispensable pour résoudre le modèle. Cependant, l'analyse réalisée au chapitre 4, de sept métabolites internes appartenant au

métabolisme central carboné (glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, phosphoglycérate, glycerol-3-phosphate, pyruvate, α -cétoglutarate et fumarate), permet de constater que cette hypothèse n'est pas vérifiée dans toutes les conditions d'inoculation et de nutrition azotée (Annexe V.4). L'hypothèse d'état pseudo-stationnaire peut se justifier chez les plantes *mocks* et inoculées avec une nutrition azotée à 10 mM de NO_3^- , car ces métabolites internes ne montrent aucune variation significative sur la durée de l'expérience. En revanche, chez les plantes *mocks*, une accumulation significative d' α -cétoglutarate est observée à faible niveau de nutrition azotée (0.5 et 2 mM de NO_3^-) ainsi qu'une diminution du pool de fumarate et de glucose-6-phosphate à 5 mM de NO_3^- , et uniquement de glucose-6-phosphate à 20 mM de NO_3^- . Chez les plantes inoculées avec *B. cinerea*, en conditions de faible nutrition azotée, la plupart des métabolites s'accumulent de façon significative au cours du temps avec une variation temporelle parfois plus élevés que les variations liées à la nutrition azotée et à l'inoculation. Mais comme cela a été vu lors des chapitres précédents, les variations temporelles de composés concernent des molécules dont la concentration est faible. Ainsi on peut faire l'hypothèse que ces variations de concentration sont limitées par rapport à l'intensité du turn-over de ces molécules, en particulier celles du métabolisme central. Une solution consisterait à ajouter au modèle des flux externes d'accumulation contraints par des données expérimentales pour chaque métabolite accumulé.

Ces premiers résultats de modélisation ont été calculés à partir de contraintes constantes au cours du temps conduisant à des flux moyens sur 7 jours. En effet, les flux externes contraints dans le modèle ont été calculés à partir de régressions linéaires sur l'évolution temporelle des quantités de métabolites et constituants de la biomasse accumulée. Des régressions non linéaires, permettant de mieux décrire l'évolution des concentrations au cours du temps, pourraient être envisagées. Cela permettrait, d'une part, d'analyser les variations dynamiques de flux au cours des 7 jours de l'expérimentation, et d'autre part, de considérer un état pseudo-stationnaire à chaque jour. Mais, comme cela a été signalé, cela est rarement justifié d'un point de vue statistique avec les données récoltées, sauf pour les acides aminés dont plusieurs présentent des profils polynomiaux.

Le modèle, tel qu'il est écrit ici, repose sur l'hypothèse que les rapports entre les acides aminés participant à la formation des protéines, ainsi que les rapports entre les sucres et la lignine composant la paroi, sont identiques entre les différentes conditions. Or les flux

externes vers les protéines et les parois impactent fortement les flux internes. De plus, il a déjà été établi que, par exemple, l'infection par un agent pathogène modifie la composition de la paroi de la plante hôte (Bellincampi *et al.* 2014). Une composition de la paroi plus favorable à la défense pourrait expliquer en partie la faible sensibilité des plantes à fort niveau de nutrition azotée, mais il n'a pas été possible d'explorer cette voie lors de ce travail.

Un modèle de flux est utile pour expliciter le phénotype métabolique. Cependant, malgré la difficulté liée à la combinaison de différents modèles, il serait nécessaire de fournir des informations sur le type de cellule plutôt que de considérer la tige comme un assemblage de cellules homogènes. Cette distinction serait d'autant plus nécessaire dans un tissu comme la tige ou une partie du tissu est consacrée au transport à travers la plante. De plus, pour que le modèle reflète davantage la réalité biologique, la prise en compte de la compartimentation subcellulaire serait clairement souhaitable. Cependant, à l'heure actuelle, le manque d'informations sur le transport des métabolites et le coût énergétique associé est un problème important. L'ajout de la compartimentation, et en particulier l'ajout de voies parallèles dans plus d'un compartiment, augmente l'espace des solutions, et donc la compartimentation dans un modèle sous contraintes augmente le nombre de solutions alternatives (Sweetlove and Ratcliffe 2011). Ainsi, en raison d'un manque de connaissances sur les échanges de métabolites entre les compartiments subcellulaires, la compartimentation physique des enzymes n'a pas été prise en compte dans notre modèle.

La modélisation sous contraintes, associée à une fonction objectif de minimisation des flux, permet d'obtenir une solution unique de flux. Cependant, d'autres solutions peuvent être possibles. Une analyse de la variabilité des flux (FVA) permettrait par exemple d'établir la gamme des flux qui peuvent soutenir une solution optimale donnée. Cette analyse complémentaire permettrait de mettre en évidence les flux les plus contraints par le modèle et qui déterminent l'organisation des autres flux du réseau.

Dans le contexte récent de la modélisation des cellules végétales en interaction avec un agent pathogène, ce travail ouvre la voie à l'explication des réorganisations métaboliques soutenant des niveaux variables de sensibilité. Ce travail démontre que la modélisation des systèmes peut être un outil précieux, nécessitant un vaste ensemble de données expérimentales et d'une définition précise du système métabolique, pour comprendre l'interaction entre les plantes et leurs pathogènes.

Références

- Abro MA, Lecompte F, Bardin M, Nicot PC. 2014.** Nitrogen fertilization impacts biocontrol of tomato gray mold. *Agronomy for Sustainable Development* **34**: 641–648.
- Agudelo-Romero P, Erban A, Rego C, et al. 2015.** Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1769–1785.
- Bahrami AR, Chen ZH, Walker RP, Leegood RC, Gray JE. 2001.** Ripening-related occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase in tomato fruit. *Plant Molecular Biology* **47**: 499–506.
- Baucher M, Monties B, Montagu M Van, Boerjan W. 1998.** Critical Reviews in Plant Sciences Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**: 125–197.
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V. 2014.** Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–8.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003.** Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 519–546.
- Botero D, Valdés I, Rodríguez MJ, et al. 2018.** A genome-scale metabolic reconstruction of *Phytophthora infestans* with the integration of transcriptional data reveals the key metabolic patterns involved in the interaction of its host. *Frontiers in Genetics* **9**: 1–11.
- Calegario FF, Cosso RG, Almeida F V., Vercesi AE, Jardim WF. 2001.** Determination of the respiration rate of tomato fruit using flow analysis. *Postharvest Biology and Technology* **22**: 249–256.
- Chu KL, Koley S, Jenkins LM, et al. 2022.** Metabolic flux analysis of the non-transitory starch tradeoff for lipid production in mature tobacco leaves. *Metabolic Engineering* **69**: 231–248.
- Clark TJ, Guo L, Morgan J, Schwender J. 2020.** Modeling Plant Metabolism: From Network Reconstruction to Mechanistic Models. *Annual Review of Plant Biology* **71**: 303–326.
- Collakova E, Yen JY, Senger RS. 2012.** Are we ready for genome-scale modeling in plants? *Plant Science* **191–192**: 53–70.
- Colombié S, Beauvoit B, Nazaret C, et al. 2017.** Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling. *New Phytologist* **213**: 1726–1739.
- Colombié S, Nazaret C, Bénard C, et al. 2015.** Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing *Solanum lycopersicum* (tomato) fruit. *Plant Journal* **81**: 24–39.
- De Cremer K, Mathys J, Vos C, et al. 2013.** RNAseq-based transcriptome analysis of *Lactuca sativa* infected by the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Plant, Cell and Environment* **36**: 1992–2007.
- Dadakova K, Havelkova M, Kurkova B, et al. 2015.** Proteome and transcript analysis of *Vitis vinifera* cell cultures subjected to *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Proteomics* **119**: 143–153.
- Dersch LM, Beckers V, Wittmann C. 2016.** Green pathways: Metabolic network analysis of plant systems. *Metabolic Engineering* **34**: 1–24.
- Feist AM, Palsson BO. 2010.** The biomass objective function. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 344–349.
- Fernandez JA, Nippert JB, Prasad PVV, Messina CD, Ciampitti IA. 2022.** Post-silking ¹⁵N labelling reveals an enhanced nitrogen allocation to leaves in modern maize (*Zea mays*) genotypes. *Journal of Plant Physiology* **268**: 153577.
- Gerlin L. 2018.** Study of metabolic interactions between plant and xylem-colonizing bacteria using constraint-based modeling.
- Gerlin L, Cottret L, Escourrou A, Genin S, Baroukh C. 2021.** A multi-organ metabolic model of tomato predicts plant responses to nutritional and genetic perturbations. *Plant Physiology*: 1–15.
- Gershenzon J, Dudareva N. 2007.** The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* **3**: 408–414.
- Haile ZM, Malacarne G, Pilati S, et al. 2020.** Dual Transcriptome and Metabolic Analysis of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir Berry and *Botrytis cinerea* During Quiescence and Egressed Infection. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1–19.
- Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun HP. 2015.** Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* **8**: 1563–1579.
- Hoffland E, Van Beusichem ML, Jeger MJ. 1999.** Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil* **210**: 263–272.
- Holzhütter HG. 2006.** The generalized flux-minimization method and its application to metabolic networks affected by enzyme deficiencies. *BioSystems* **83**: 98–107.
- Kocurek M, Kornas A, Wierchnicki R, Lüttge U,**

- Miszalski Z. 2020.** Importance of stem photosynthesis in plant carbon allocation of *Clusia minor*. *Trees - Structure and Function* **34**: 1009–1020.
- Koduru L, Kim HY, Lakshmanan M, et al. 2020.** Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of the rice leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae*. *Molecular Plant Pathology* **21**: 527–540.
- Kotwal S, Kaul S, Sharma P, et al. 2016.** De novo transcriptome analysis of medicinally important *Plantago ovata* using RNA-seq. *PLoS ONE* **11**: 1–23.
- Lacrampe N, Lopez-Lauri F, Lukan R, et al. 2021.** Regulation of sugar metabolism genes in the nitrogen-dependent susceptibility of tomato stems to *Botrytis cinerea*. *Annals of Botany* **127**: 143–154.
- Liu Y, Pan T, Tang Y, et al. 2020.** Proteomic Analysis of Rice Subjected to Low Light Stress and Overexpression of OsGAPB Increases the Stress Tolerance. *Rice* **13**.
- Liu J, Sui Y, Chen H, Liu Yiqing, Liu Yongsheng. 2018.** Proteomic analysis of kiwifruit in response to the postharvest pathogen, *botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–18.
- Lunn JE. 2016.** Sucrose Metabolism In: *eLS*. Wiley, 1–9.
- Marco F, Busó E, Carrasco P. 2014.** Overexpression of SAMDC1 gene in *Arabidopsis thaliana* increases expression of defense-related genes as well as resistance to *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–9.
- Mondolot L, La Fisca P, Buatois B, Talansier E, De Kochko A, Campa C. 2006.** Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany* **98**: 33–40.
- Nakayasu M, Umemoto N, Akiyama R, et al. 2021.** Characterization of C-26 aminotransferase, indispensable for steroidal glycoalkaloid biosynthesis. *Plant Journal* **108**: 81–92.
- Orth Jeffrey D., Thiele I, Palsson BO. 2010.** What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology* **28**: 245–248.
- Orth Jeffrey D, Thiele I, Palsson BØ. 2010.** What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology* **28**: 245–248.
- Peyraud R, Cottret L, Marmiesse L, Gouzy J, Genin S. 2016.** A Resource Allocation Trade-Off between Virulence and Proliferation Drives Metabolic Versatility in the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* **12**: 1–25.
- Peyraud R, Mbengue M, Barbacci A, Raffaele S. 2019.** Intercellular cooperation in a fungal plant pathogen facilitates host colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201811267.
- Reboledo G, Agorio A d., Vignale L, Batista-García RA, Ponce De León I. 2021.** Transcriptional profiling reveals conserved and species-specific plant defense responses during the interaction of *Physcomitrium patens* with *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology* **107**: 365–385.
- Rodenburg SYA, Seidl MF, Judelson HS, Vu AL, Govers F, de Ridder D. 2019.** Metabolic Model of the *Phytophthora infestans* -Tomato Interaction Reveals Metabolic Switches during Host Colonization (J McDowell and B Gillian Turgeon, Eds.). *mBio* **10**: 1–15.
- Rohwer JM. 2012.** Kinetic modelling of plant metabolic pathways. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2275–2292.
- De Roo L, Bloemen J, Dupon Y, Salomón RL, Steppe K. 2019.** Axial diffusion of respired CO₂ confounds stem respiration estimates during the dormant season. *Annals of Forest Science* **76**.
- Royer M, Larbat R, Le Bot J, Adamowicz S, Robin C. 2013.** Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato? *Phytochemistry* **88**: 25–33.
- Rylott EL, Gilday AD, Graham IA. 2003.** Carboxykinase in *Arabidopsis* Is Essential for Seedling Establishment. *Society* **131**: 1834–1842.
- Sato S, Tabata S, Hirakawa H, et al. 2012.** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635–641.
- Shah P, Powell ALT, Orlando R, Bergmann C, Gutierrez-Sanchez G. 2012.** Proteomic Analysis of Ripening Tomato Fruit Infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Proteome Research* **11**: 2178–2192.
- Sonawane PD, Pollier J, Panda S, et al. 2016.** Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nature Plants* **3**.
- Song HS, Ramkrishna D. 2009.** When is the quasi-steady-state approximation admissible in metabolic modeling? When admissible, what models are desirable? *Industrial and Engineering Chemistry Research* **48**: 7976–7985.
- Sosulski FW, Imafidon GI. 1990.** Amino Acid Composition and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Animal and Plant Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**: 1351–1356.
- Srivastava DA, Arya GC, Pandaranayaka EPJ, et al. 2020.** Transcriptome profiling data of *botrytis cinerea* infection on whole plant *solanum lycopersicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **33**: 1103–1107.
- Sugimoto N, Engelgau P, Daniel Jones A, Song J, Beaudry R. 2021.** Citramalate synthase yields a biosynthetic pathway for isoleucine and straight- And branched-chain ester formation in ripening apple fruit. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America **118**.

Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG. 2010. Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* **15**: 462–470.

Sweetlove LJ, Ratcliffe RG. 2011. Flux-Balance Modeling of Plant Metabolism. *Frontiers in Plant Science* **2**: 1–10.

Vega A, Canessa P, Hoppe G, et al. 2015. Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–17.

Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A. 1993. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology* **101**: 321–327.

Williams TCR, Poolman MG, Howden AJM, et al. 2010. A Genome-scale metabolic model accurately predicts fluxes in central carbon metabolism under stress conditions. *Plant Physiology* **154**: 311–323.

Windram O, Madhou P, Mchattie S, et al. 2012. Arabidopsis defense against *Botrytis cinerea*: Chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant*

Cell **24**: 3530–3557.

Wittmann C, Pfanz H, Loreto F, Centritto M, Pietrini F, Alessio G. 2006. Stem CO₂ release under illumination: Corticular photosynthesis, photorespiration or inhibition of mitochondrial respiration? *Plant, Cell and Environment* **29**: 1149–1158.

Xu Y, Fu X, Sharkey TD, Shachar-Hill Y, Walker BJ. 2021. The metabolic origins of non-photorespiratory CO₂ release during photosynthesis: A metabolic flux analysis. *Plant Physiology* **186**: 297–314.

Yuan H, Cheung CYM, Poolman MG, Hilbers PAJ, Van Riel NAW. 2016. A genome-scale metabolic network reconstruction of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its application to photorespiratory metabolism. *Plant Journal* **85**: 289–304.

Yurkovich JT, Pálsson BO. 2016. Solving puzzles with missing pieces: The power of systems biology [Point of View]. *Proceedings of the IEEE* **104**: 2–7.

Zoledowska S, Presta L, Fondi M, et al. 2019. Metabolic modeling of *Pectobacterium parmentieri* scc3193 provides insights into metabolic pathways of plant pathogenic bacteria. *Microorganisms* **7**.

Annexe V.1 : Liste des réactions présentes dans le modèle

Nom	Identifiant	Rev.	Equation
Métabolisme d'assimilation et de stockage des sucres			
sucrose-phosphatase	spase	NON	1 SucP ==> 1 Suc
sucrose synthase	susy	OUI	1 Fru + 1 UDPglc <==> 1 Suc + 1 UDP
invertase	inv	NON	1 Suc ==> 1 Fru + 1 Glc
sucrose-phosphate synthase	sps	NON	1 F6P + 1 UDPglc ==> 1 SucP + 1 UDP
fructokinase	fk	NON	1 ATP + 1 Fru ==> 1 ADP + 1 F6P
glucose-1-phosphate adenylyltransferase	agpase	NON	1 G1P + 1 ATP ==> 1 PPi + 1 ADPglc
starch synthetase	ss	NON	1 ADPglc ==> 1 Starch + 1 ADP
starch degradation	sd	NON	1 Starch + 1 ATP ==> 1 G1P + 1 AMP
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	ugpase	NON	1 G1P + 1 UTP ==> 1 UDPglc + 1 PPi
fructose accumulation	ac_fru	OUI	1 Fru <==> 1 Fru_ac
glucose accumulation	ac_glc	OUI	1 Glc <==> 1 Glc_ac
sucrose accumulation	ac_suc	OUI	1 Suc <==> 1 Suc_ac
starch accumulation	ac_starch	OUI	1 Starch <==> 1 Starch_ac
sucrose uptake	suc_up	NON	1 Suc_in ==> 1 Suc
RUBISCO			
phosphoribulokinase	pruk	NON	1 Ru5P + 1 ATP ==> 1 RuPP + 1 ADP
ribulose-1,5-biphosphate carboxylase	rbccar	NON	1 RuPP + 1 CO2 + 1 H2O ==> 2 PG
ribulose-1,5-biphosphate oxygenase	rbcox	NON	1 RuPP + 2 O2 + 2 H2O ==> 1 PG + 1 Glyx + 1 H2O2
oxygen uptake	o2_up	NON	1 O2_in ==> 1 O2
Glycolyse			
hexokinase	hk	NON	1 ATP + 1 Glc ==> 1 ADP + 1 G6P
glucose-6-phosphate isomerase	pgi	OUI	1 G6P <==> 1 F6P + 1 Pi
fructose-bisphosphatase	fbp	NON	1 F16bp ==> 1 F6P
6-phosphofructokinase	pfk	NON	1 ATP + 1 F6P ==> 1 ADP + 1 F16bp
pyrophosphate fructose-6-phosphate phosphotransferase	pfp	NON	1 PPi + 1 F6P ==> 1 F16bp + 1 Pi
fructose-bisphosphate aldolase	ald	OUI	1 F16bp <==> 1 GAP + 1 DHAP
triosephosphate isomerase	tpi	OUI	1 DHAP <==> 1 GAP
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gapdh	OUI	1 GAP + 1 NAD <==> 1 dPG + 1 NADH
phosphoglycerate kinase	pgk	OUI	1 dPG + 1 ADP <==> 1 PG + 1 ATP
enolase	eno	OUI	1 PG <==> 1 PEP
pyruvate kinase	pk	NON	1 PEP + 1 ADP ==> 1 Pyr + 1 ATP
phosphoglucomutase	pgm	OUI	1 G1P <==> 1 G6P
Voie des pentoses-phosphates			
glucose-6-phosphate dehydrogenase	g6pdh	NON	1 G6P + 2 NADP ==> 1 CO2 + 1 Ru5P + 2 NADPH
ribulose 5-phosphate epimerase	epi	OUI	1 Ru5P <==> 1 X5P
ribose 5-phosphate isomerase	riso	OUI	1 Ru5P <==> 1 Ri5P
transketolase 1	tk1	OUI	1 S7P + 1 GAP <==> 1 Ri5P + 1 X5P
transketolase 2	tk2	OUI	1 F6P + 1 GAP <==> 1 E4P + 1 X5P
transaldolase	tald	OUI	1 S7P + 1 GAP <==> 1 E4P + 1 F6P
sedoheptulose-bisphosphatase and co	sedbp	NON	1 GAP + 1 E4P + 1 H2O ==> 1 S7P + 1 Pi
ribose-phosphate diphosphokinase	rpdk	NON	1 Ri5P + 1 ATP ==> 1 PRPP + 1 AMP
Cycle de Krebs et voies anapérotriques associées			
pyruvate dehydrogenase	pdh	NON	1 Pyr + 1 NAD + 1 CoA ==> 1 CO2 + 1 AcCoA + 1 NADH
phosphoenolpyruvate carboxykinase	pepc	NON	1 PEP + 1 CO2 ==> 1 OAA
phosphoenolpyruvate carboxykinase	pepck	NON	1 OAA + 1 PPi ==> 1 CO2 + 1 PEP
citrate synthase	cs	NON	1 OAA + 1 AcCoA + 1 H2O ==> 1 Cit + 1 CoA
aconitase	aco	OUI	1 Cit <==> 1 ICit
isocitrate dehydrogenase	idh	OUI	1 ICit + 1 NAD <==> 1 aKG + 1 CO2 + 1 NADH
alpha-ketoglutarate dehydrogenase	kgdh	OUI	1 aKG + 1 NAD + 1 CoA <==> 1 CO2 + 1 NADH + 1 SuccCoA
succinate--CoA ligase	scol	NON	1 SuccCoA + 1 ADP + 1 Pi ==> 1 Succ + 1 ATP + 1 CoA
succinate dehydrogenase	sdh	OUI	1 Succ + 1 FAD <==> 1 FADH2 + 1 Fum
fumarase	fum	OUI	1 Fum <==> 1 Mal
malate dehydrogenase	mdh	OUI	1 Mal + 1 NAD <==> 1 NADH + 1 OAA
malic enzyme	me	NON	1 Mal + 1 NAD ==> 1 CO2 + 1 NADH + 1 Pyr
isocitrate lyase	icl	NON	1 ICit ==> 1 Glyx + 1 Succ
malate synthase	ms	OUI	1 AcCoA + 1 Glyx + 1 H2O <==> 1 Mal + 1 CoA
succinate accumulation	ac_succ	OUI	1 Succ <==> 1 Succ_ac
malate accumulation	ac_mal	OUI	1 Mal <==> 1 Mal_ac
citrate accumulation	ac_cit	OUI	1 Cit <==> 1 Cit_ac
Shunt du GABA			
glutamate decarboxylase	gludc	NON	1 Glu ==> 1 GABA + 1 CO2
GABA--aKG aminotransferase	gabaat1	OUI	1 GABA + 1 aKG <==> 1 Glu + 1 Ssa
GABA--pyruvate aminotransferase	gabaat2	OUI	1 GABA + 1 Pyr <==> 1 Ala + 1 Ssa
succinatesemialdehyde dehydrogenase	ssadh	NON	1 Ssa + 1 NAD + 1 H2O ==> 1 Succ + 1 NADH
GABA accumulation	ac_gaba	OUI	1 GABA <==> 1 GABA_ac

Métabolisme d'assimilation de l'azote				
glutamine synthetase	gs	NON	1 Glu + 1 ATP + 1 NH3 ==> 1 Gln + 1 ADP	
nitrate reductase	nr	NON	1 NO3 + 1 NADH ==> 1 NH3 + 1 NAD	
glutamate dehydrogenase	gludh	OUI	1 NH3 + 1 aKG + 1 NADH <=> 1 Glu + 1 NAD	
Glutamine oxoglutarate aminotransferase	gogat	NON	1 Gln + 1 aKG + 1 NADPH ==> 2 Glu + 1 NADP	
ornithine synthesis	orns	NON	2 Glu + 1 ATP + 1 NADPH ==> 1 aKG + 1 Orn + 1 ADP + 1 NADP + 1 Pi	
carbamoyl-phosphate synthase 1	cps1	NON	1 Gln + 1 HCO3 + 1 H2O + 2 ATP ==> 1 Glu + 1 CarP + 2 ADP + 1 Pi	
ornithine--carbamoyl transferase	oct	NON	1 Orn + 1 CarP ==> 1 Citr + 1 Pi	
arginosuccinate synthase and lyase	assl	NON	1 Asp + 1 Citr + 1 ATP ==> 1 Arg + 1 Fum + 1 AMP + 1 PPI	
arginase	argase	NON	1 Arg + 1 H2O ==> 1 Orn + 1 Urea	
carbamoyl-phosphate synthase 2	cps2	NON	1 NH3 + 1 CO2 + 1 H2O + 2 ATP ==> 1 CarP + 2 ADP + 1 Pi	
asparagine synthase	asns	NON	1 Gln + 1 Asp + 1 ATP + 1 H2O ==> 1 Glu + 1 Asn + 1 AMP + 1 PPI	
asparaginase	asnase	NON	1 Asn + 1 H2O ==> 1 Asp + 1 NH3	
aspartate ammonia ligase	aspal	NON	1 Asp + 1 NH3 + 1 ATP ==> 1 Asn + 1 AMP + 1 PPI	
lysine synthesis	lyss	NON	1 Asp + 1 Pyr + 1 Glu + 1 ATP + 1 NADPH + 1 NADH ==> 1 Lys + 1 aKG + 1 ADP + 1 NADP + 1 NAD + 1 Pi + 1 CO2 + 1 H2O	
lysine catabolism	lysc	NON	1 Lys + 2 aKG + 3 NAD + 1 FAD + 2 CoA + 2 H2O ==> 2 AcCoA + 2 Glu + 3 NADH + 1 FADH2 + 2 CO2	
aspartate aminotransferase	aspat	OUI	1 OAA + 1 Glu <=> 1 Asp + 1 aKG	
urease	urea	NON	1 Urea + 1 H2O ==> 2 NH3 + 1 CO2	
arginine accumulation	ac_arg	OUI	1 Arg <=> 1 Arg_ac	
citrulline accumulation	ac_citr	OUI	1 Citr <=> 1 Citr_ac	
lysine accumulation	ac_lys	OUI	1 Lys <=> 1 Lys_ac	
aspartate accumulation	ac_asp	OUI	1 Asp <=> 1 Asp_ac	
glutamate accumulation	ac_glu	OUI	1 Glu <=> 1 Glu_ac	
asparagine accumulation	ac_asn	OUI	1 Asn <=> 1 Asn_ac	
glutamine accumulation	ac_gln	OUI	1 Gln <=> 1 Gln_ac	
nitrate accumulation	ac_no3	OUI	1 NO3 <=> 1 NO3_ac	
nitrate uptake	no3_up	NON	1 NO3_in ==> 1 NO3	
glutamine uptake	gln_up	NON	1 Gln_in ==> 1 Gln	
NH3 accumulation	ac_nh3	NON	1 NH3 ==> 1 NH3_ac	
Voie du shikimate et métabolisme des composés phénoliques				
3-dehydroquinate synthase	dhqs	NON	1 PEP + 1 E4P + 1 H2O ==> 1 dhQ + 2 Pi	
quinate dehydrogenase	qdh	NON	1 dhQ + 1 NADH ==> 1 Quin + 1 NAD	
shikimate dehydrogenase	skdh	NON	1 dhQ + 1 NADPH ==> 1 Shik + 1 NADP + 1 H2O	
chorismate synthase	chs	NON	1 Shik + 1 PEP + 1 ATP ==> 1 Chor + 2 Pi + 1 ADP	
chorismate mutase	chm	OUI	1 Chor <=> 1 Pph	
glutamate-prephenate aminotransferase	gpaf	OUI	1 Pph + 1 Glu <=> 1 Aro + 1 aKG	
arogenate dehydratase	arodh	NON	1 Aro ==> 1 Phe + 1 CO2 + 1 H2O	
prephenate dehydratase and aminotransferase	pphat	OUI	1 Pph + 1 Glu <=> 1 Phe + 1 aKG + 1 CO2 + 1 H2O	
tryptophan synthase	trps	NON	1 Chor + 1 Gln + 1 PRPP + 1 Ser ==> 1 Trp + 1 Glu + 1 Pyr + 1 GAP + 1 PPI + 1 CO2 + 2 H2O	
tryptophan degradation	trpd	NON	1 Trp + 3 O2 + 1 H2O + 1 NADPH ==> 1 acMsa + 1 HCO2 + 1 NADP + 1 Ala	
2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde degradation	acmsad	NON	1 acMsa + 2 NAD + 3 H2O + 2 CoA + 1 FAD ==> 2 AcCoA + 3 CO2 + 2 NADH + 1 FADH2 + 1 NH3	
prephenate dehydrogenase	pphdhg	NON	1 Pph + 1 NAD ==> 1 hpPyr + 1 CO2 + 1 NADH	
aromatic-amino-acid aminotransferase 2	aaat2	OUI	1 hpPyr + 1 Glu <=> 1 Tyr + 1 aKG	
arogenate dehydrogenase	arodhg	NON	1 Aro + 1 NADP ==> 1 Tyr + 1 CO2 + 1 NADPH	
tyrosine aminotransferase	tyrat	OUI	1 Tyr + 1 Pyr <=> 1 hpPyr + 1 Ala	
acetoacetate synthase	acacs	NON	1 hpPyr + 2 O2 + 1 H2O ==> 1 AcAc + 1 Fum + 1 CO2	
acetoacetate--CoA ligase and acetyl-CoA C- acetyltransferase	acac	NON	1 AcAc + 2 CoA + 1 ATP ==> 2 AcCoA + 1 AMP + 1 PPI	
phenylalanine ammonia-lyase	pal	NON	1 Phe ==> 1 NH3 + 1 Cinn	
4-coumaroyl-CoA synthetase	coum	NON	1 Cinn + 1 NADPH + 1 ATP + 1 O2 + 1 CoA ==> 1 CoumCoA + 1 NADP + 1 AMP + 1 PPI + 1 H2O	
chlorogenic acid synthesis	chls	NON	1 CoumCoA + 1 Quin + 1 NADPH + 1 O2 ==> 1 NADP + 1 CQA + 1 CoA + 1 H2O	
kaempferol synthesis	kpfs	NON	1 CoumCoA + 3 MaloCoA + 2 aKG + 2 O2 ==> 1 Kaemp + 2 Succ + 4 CoA + 5 CO2 + 1 H2O	
rutin synthesis	ruts	NON	1 Kaemp + 2 NADPH + 1 UDPglc + 1 UDPrha + 2 O2 ==> 2 NADP + 2 UDP + 1 Rutin + 2 H2O	
acetyl-CoA carboxylase	acoac	NON	1 AcCoA + 1 ATP + 1 HCO3 ==> 1 MaloCoA + 1 ADP + 1 Pi	
conyferaldehyde synthesis	cfas	NON	1 CQA + 1 adMet + 1 NADPH ==> 1 Conif + 1 Quin + 1 adhCys + 1 NADP	
H lignin synthesis	hlign	NON	1 CoumCoA + 2 NADPH + 0.5 H2O2 ==> 1 Hlignin + 1 CoA + 2 NADP + 1 H2O	
G lignin synthesis	glign	NON	1 Conif + 1 NADPH + 0.5 H2O2 ==> 1 Glignin + 1 NADP + 1 H2O	
S lignin synthesis	slign	NON	1 Conif + 2 NADPH + 1 adMet + 1 O2 + 0.5 H2O2 ==> 1 Slignin + 2 NADP + 1 adhCys + 2 H2O	
lignins synthesis	lign	NON	0 Hlignin + 1 Glignin + 1 Slignin + 2 H2O2 ==> 2 lignin + 2 H2O	
quinate accumulation	ac_quin	OUI	1 Quin <=> 1 Quin_ac	
tyrosine accumulation	ac_tyr	OUI	1 Tyr <=> 1 Tyr_ac	
phenylalanine accumulation	ac_phe	OUI	1 Phe <=> 1 Phe_ac	
tryptophane accumulation	ac_trp	OUI	1 Trp <=> 1 Trp_ac	
chlorogenic accumulation	ac_cqa	OUI	1 CQA <=> 1 CQA_ac	
chlorogenic acid in phloem	cqa_ph	OUI	1 CQA_ph <=> 1 CQA	
rutin accumulation	ac_rutin	OUI	1 Rutin <=> 1 Rutin_ac	

Métabolisme des acides aminés branchés			
citramalate synthase	citmals	NON	1 AcCoA + 1 Pyr + 1 H2O ==> 1 CoA + 1 CitMal
citramalate déshydratase	citmaladh	NON	1 CitMal + 1 NAD ==> 1 aKB + 1 CO2 + 1 NADH
2-keto-3-méthylvalérate synthase	kmvas	NON	1 aKB + 1 Pyr + 1 NADPH ==> 1 kmVa + 1 NADP + 1 NH3 + 1 CO2 + 1 H2O
branché-chain-amino-acid aminotransférase 1	bcaat1	OUI	1 kmVa + 1 Glu <==> 1 Ile + 1 aKG
alpha-kétoisovalérate synthase	kivas	NON	2 Pyr + 1 NADPH ==> 1 kiVa + 1 CO2 + 1 H2O + 1 NADP
branché-chain-amino-acid aminotransférase 2	bcaat2	OUI	1 kiVa + 1 Glu <==> 1 Val + 1 aKG
2-kéto-isocaproate synthase	kicas	NON	1 kiVa + 1 AcCoA + 1 NAD ==> 1 kiCa + 1 CoA + 1 NADH + 1 CO2
branché-chain-amino-acid aminotransférase 3	bcaat3	OUI	1 kiCa + 1 Glu <==> 1 Leu + 1 aKG
leucine dégradation	leudeg	NON	1 kiCa + 1 CoA + 1 NAD + 1 FAD + 1 ATP + 1 HCO3 + 1 H2O ==> 1 AcAc + 1 AcCoA + 1 CO2 + 1 NADH + 1 FADH2 + 1 ADP + 1 Pi
valine dégradation	valdeg	NON	1 kiVa + 1 CoA + 3 NAD + 1 FAD + 3 H2O ==> 1 PioCoA + 1 HCO3 + 3 NADH + 1 FADH2 + 1 CO2
isoleucine dégradation	iledeg	NON	1 kmVa + 2 CoA + 2 NAD + 1 FAD + 1 H2O ==> 1 PioCoA + 1 AcCoA + 1 CO2 + 2 NADH + 1 FADH2
propionyl-coenzyme A dégradation	piocd	OUI	1 PioCoA + 1 O2 + 1 NAD + 2 H2O <==> 1 Malosa + 1 CoA + 1 H2O2 + 1 NADH
malonate-semialdéhyde déshydrogénase	msadh	OUI	1 Malosa + 1 CoA + 1 NADP <==> 1 AcCoA + 1 CO2 + 1 NADPH
valine accumulation	ac_val	OUI	1 Val <==> 1 Val_ac
isoleucine accumulation	ac_ile	OUI	1 Ile <==> 1 Ile_ac
leucine accumulation	ac_leu	OUI	1 Leu <==> 1 Leu_ac
Métabolisme de l'histidine			
histidine formation	his	NON	1 PRPP + 1 Gln + 1 ATP + 3 H2O + 2 NAD ==> 1 His + 1 aKG + 1 AICAR + 2 PPI + 1 Pi + 2 NADH
histidine dégradation	hisd	NON	1 His + 4 H2O ==> 1 Glu + 1 HCO2 + 2 NH3
histidine décarboxylase and co	hisdx	NON	1 His + 4 H2O + 2 O2 ==> 1 Asp + 1 HCO2 + 1 CO2 + 2 NH3 + 1 H2O2
histidine accumulation	ac_his	OUI	1 His <==> 1 His_ac
Métabolisme de la proline			
ornithine cyclodéaminase	ocda	NON	1 Orn ==> 1 Pro + 1 NH3
glutamate-semialdéhyde déshydrogénase 1	gsadh1	NON	1 Glu + 1 ATP + 1 NADPH ==> 1 Glusa + 1 ADP + 1 NADP + 1 Pi
proline synthase	pros	OUI	1 Glusa + 1 NADPH <==> 1 Pro + 1 NADP + 1 H2O
ornithine aminotransférase	oat	OUI	1 Orn + 1 aKG <==> 1 Glu + 1 Glusa
glutamate semialdéhyde déshydrogénase 2	gsadh2	NON	1 Glusa + 1 NAD + 1 H2O ==> 1 Glu + 1 NADH
proline accumulation	ac_pro	OUI	1 Pro <==> 1 Pro_ac
Métabolismes des autres acides aminés			
serine-glyoxylate transaminase	sgta	OUI	1 Ser + 1 Glyx <==> 1 hPyr + 1 Gly
glycérate déshydrogénase	glycdh	NON	1 hPyr + 1 NADH + 1 ATP ==> 1 PG + 1 NAD + 1 ADP
serine-pyruvate transaminase	spta	OUI	1 Ser + 1 Pyr <==> 1 hPyr + 1 Ala
serine aminotransférase	serat	OUI	1 PG + 1 Glu + 1 NAD + 1 H2O <==> 1 Ser + 1 aKG + 1 NADH + 1 Pi
serine ammonia-lyase	seral	NON	1 Ser ==> 1 Pyr + 1 NH3
alanine aminotransférase	alaat	OUI	1 aKG + 1 Ala <==> 1 Glu + 1 Pyr
O-phospho-homoserine synthase	ophss	NON	1 Asp + 2 ATP + 1 NADPH + 1 NADH ==> 1 OphSer + 2 ADP + 1 NADP + 1 NAD + 1 Pi
cysteine-S-conjugate beta-lyase	cysbl	NON	1 Cys + 1 OphSer + 1 H2O ==> 1 hCys + 1 Pyr + 1 NH3 + 1 Pi
cystathionine beta-synthase	cysbs	NON	1 Ser + 1 hCys ==> 1 Cys + 1 aKB + 1 NH3
methionine synthase	mets	OUI	1 hCys + 1 mTHF <==> 1 Met + 1 THF
methionine dégradation	metd	NON	1 Met + 3 H2O + 1 O2 + 1 NAD ==> 1 aKB + 1 HCO2 + 1 NH3 + 1 H2S + 1 H2O2 + 1 NADH
cysteine synthase	cyss	NON	1 Ser + 1 AcCoA + 1 H2S ==> 1 Cys + 1 Ac + 1 CoA
cystathionine gamma-lyase	cysgl	NON	1 Cys + 1 H2O ==> 1 Pyr + 1 NH3 + 1 H2S
acétate--CoA ligase	acoal	OUI	1 Ac + 1 ATP + 1 CoA <==> 1 AcCoA + 1 AMP + 1 PPI
glycine hydroxyméthyltransférase	glyhmt	OUI	1 Ser + 1 THF <==> 1 Gly + 1 meTHF + 1 H2O
alanine--glyoxylate transaminase	agta	OUI	1 Glyx + 1 Ala <==> 1 Gly + 1 Pyr
threonine synthase	thrs	NON	1 OphSer + 1 H2O ==> 1 Thr + 1 Pi
threonine ammonia lyase	thral	NON	1 Thr ==> 1 aKB + 1 NH3
methionine adenosyltransférase	metadt	NON	1 ATP + 1 Met + 1 H2O ==> 1 adMet + 1 Pi + 1 PPI
adenosylhomocystéinase	adhcsase	OUI	1 adhCys + 1 H2O <==> 1 hCys + 1 Ade
serine accumulation	ac_ser	OUI	1 Ser <==> 1 Ser_ac
glycine accumulation	ac_gly	OUI	1 Gly <==> 1 Gly_ac
threonine accumulation	ac_thr	OUI	1 Thr <==> 1 Thr_ac
alanine accumulation	ac_ala	OUI	1 Ala <==> 1 Ala_ac
methionine accumulation	ac_met	OUI	1 Met <==> 1 Met_ac
cysteine accumulation	ac_cys	OUI	1 Cys <==> 1 Cys_ac
Métabolisme des polyamines			
ornithine décarboxylase	ornd	NON	1 Orn ==> 1 Put + 1 CO2
arginine décarboxylase	argd	NON	1 Arg + 2 H2O ==> 1 Put + 2 CO2 + 2 NH3
spermidine synthase	spers	NON	1 Put + 1 adMet + 1 Gln + 1 PRPP + 2 H2O + 1 ATP + 1 O2 ==> 1 Sper + 1 CO2 + 1 aKG + 1 HCO2 + 1 Met + 1 NH3 + 1 AMP + 1 ADP + 1 PPI + 1 Pi
polyamine oxydase	polox	NON	1 Sper + 1 O2 + 4 H2O + 2 NAD ==> 1 bAla + 1 GABA + 2 H2O2 + 1 NH3 + 2 NADH
beta-alanine--pyruvate transaminase	balata	OUI	1 Malosa + 1 Ala <==> 1 bAla + 1 Pyr
uracil dégradation	urad	OUI	1 Ura + 1 NADPH + 2 H2O <==> 1 bAla + 1 NADP + 1 CO2 + 1 NH3
beta-alanine accumulation	ac_bala	OUI	1 bAla <==> 1 bAla_ac
spermidine accumulation	ac_sper	OUI	1 Sper ==> 1 Sper_ac
putrescine accumulation	ac_put	OUI	1 Put ==> 1 Put_ac

Métabolisme du géranyl-PP et de l'alpha-tomatine			
mevalonate pathway	mevp	NON	3 AcCoA + 2 NADPH + 3 ATP + 1 H2O ==> 1 ipdP + 3 CoA + 2 NADP + 3 ADP + 1 CO2 + 1 Pi
isopentenyl-diphosphate-delta-isomerase	ipdpi	OUI	1 ipdP <==> 1 dmadP
MEP pathway	mepp	NON	1 Pyr + 1 GAP + 1 CTP + 1 ATP + 2 NADP ==> 1 dmadP + 1 CMP + 1 ADP + 2 NADPH + 1 CO2 + 2 H2O + 1 PPi
dimethylallyl transferase	dmat	NON	1 dmadP + 1 ipdP ==> 1 gPP + 1 PPi
cycloartenol synthesis	carts	NON	2 gPP + 2 ipdP + 2 NADPH + 1 O2 ==> 1 CArt + 4 Ppi + 2 NADP + 1 H2O
cholesterol synthesis	chols	NON	1 CArt + 2 NADPH + 10 O2 + 1 NAD ==> 1 Chol + 2 NADP + 14 H2O + 1 NADH + 1 CO2 + 1 HCO2
alpha-tomatine synthesis	atoms	NON	1 Chol + 3 NADPH + 4 O2 + 1 aKG + 1 GABA + 1 UDPgal + 2 UDPglc + 1 UDPxyl ==> 1 aTom + 4 UDP + 3 NADP + 5 H2O + 1 CO2 + 1 Succ + 1 Ssa
tomatinase	tomase	NON	1 aTom + 4 H2O + 1 UTP ==> 1 Tomd + 2 Glc + 1 Gal + 1 UDPxyl + 1 Pi
geranyl-diphosphate accumulation	ac_gpp	NON	1 gPP <==> 1 gPP_ac
alpha-tomatine accumulation	ac_atom	OUI	1 aTom <==> 1 aTom_ac
tomatidine accumulation	ac_tomd	NON	1 Tomd <==> 1 Tomd_ac
Métabolismes des parois			
mannose-1-phosphate guanyltransferase and co	mgt	NON	1 F6P + 1 GTP ==> 1 GDPman + 1 PPi
GDP-mannose-3,5-epimerase	gme	OUI	1 GDPman <==> 1 GDPgal
myo-inositol synthesis	mis	NON	1 G6P + 1 H2O ==> 1 Myol + 1 Pi
UDP-rhamnose synthase	udprs	NON	1 UDPglc + 1 NADPH ==> 1 UDPrha + 1 NADP
UDP-glucose dehydrogenase	ugd	NON	1 UDPglc + 2 NAD ==> 1 UDPglua + 2 NADH
inositol oxygenase and co	inoglua	NON	1 Myol + 1 O2 + 1 ATP + 1 UTP ==> 1 UDPglua + 1 H2O + 1 ADP + 1 PPi
GDP-D-mannose-4,6-dehydratase	gmd	NON	1 GDPman + 1 NADPH ==> 1 GDPfuc + 1 NADP
UDPglucuronic acid 4-epimerase	gae	OUI	1 UDPglua <==> 1 UDPgala
UDP-xylose synthase	axs	NON	1 UDPglua ==> 1 UDPxyl + 1 CO2
UDP-xylose 4-epimerase	uxe	OUI	1 UDPxyl <==> 1 UDPpara
UDP-D-glucose 4-epimerase	uge	OUI	1 UDPglc <==> 1 UDPgal
cell wal synthesis	cws	NON	0.001 GDPfuc + 0.005 UDPrha + 0.009 UDPpara + 0.109 UDPxyl + 0.008 UDPgal + 0.008 GDPgal + 0.017 GDPman + 0.483 UDPglc + 0.066 UDPgala + 0.066 UDPglua + 0.229 lignin ==> 1 CW + 0.746 UDP + 0.026 GDP
cell wall partial dégradation	cwd	NON	1 CW + 1 H2O ==> 1 Glc
myo-inositol accumulation	ac_myoi	OUI	1 Myol <==> 1 Myol_ac
cell wall accumulation	ac_cw	OUI	1 CW <==> 1 CW_ac
Synthèse et dégradation des protéines			
proteins synthesis	prots	NON	0.043 Arg + 0.011 His + 0.062 Asn + 0.125 Gln + 0.04 Lys + 0.025 Gly + 0.024 Ala + 0.011 Trp + 0.027 Ser + 0.023 Pro + 0.03 Val + 0.027 Thr + 0.015 Cys + 0.022 Ile + 0.031 Leu + 0.14 Asp + 0.284 Glu + 0.008 Met + 0.033 Phe + 0.02 Tyr + 1 ATP + 2 GTP ==> 1 PROTEIN + 2 GDP + 1 ADP + 3 Pi
proteins degradation	protld	NON	1 PROTEIN + 0.5 ATP ==> 0.043 Arg + 0.011 His + 0.062 Asn + 0.125 Gln + 0.04 Lys + 0.025 Gly + 0.024 Ala + 0.011 Trp + 0.027 Ser + 0.023 Pro + 0.03 Val + 0.027 Thr + 0.015 Cys + 0.022 Ile + 0.031 Leu + 0.14 Asp + 0.284 Glu + 0.008 Met + 0.033 Phe + 0.02 Tyr + 0.5 ADP + 0.5 Pi
proteins accumulation	ac_prot	OUI	1 PROTEIN <==> 1 PROTEIN_ac
Métabolismes des lipides			
fatty acid synthase	fas	NON	8 AcCoA + 7 ATP + 7 NADH + 7 NADPH ==> 1 FA16 + 7 AMP + 7 PPi + 7 NADP + 7 NAD + 8 CoA
fatty acid elongase	fae	NON	1 AcCoA + 1 FA16 + 1 ATP + 1 NADPH ==> 1 FA18 + 1 AMP + 1 PPi + 1 NADP + 1 CoA
fatty acid coenzymeA ligase	fal1	NON	1 FA16 + 1 ATP + 1 CoA ==> 1 FA16CoA + 1 AMP + PPi
fatty acid coenzymeA ligase	fal2	NON	1 FA18 + 1 ATP + 1 CoA ==> 1 FA18CoA + 1 AMP + PPi
lipids synthesys	dag	NON	1 Glyc3P + 0.67 FA16CoA + 1.33 FA18CoA + 1 H2O ==> 1 DAG + 2 CoA + 1 Pi
diacylglycerol lipase	dagl	NON	1 DAG + 2 H2O + 1 NADP ==> 0.67 FA16 + 1.33 FA18 + 1 Glyc3P + 1 NADPH
beta-oxydation	box1	NON	1 FA18CoA + 1 FAD + 1 H2O + 1 NAD + 1 CoA ==> 1 FA16CoA + 1 AcCoA + 1 FADH2 + 1 NADH
beta-oxydation	box2	NON	1 FA16CoA + 7 FAD + 7 H2O + 7 NAD + 7 CoA ==> 8 AcCoA + 7 FADH2 + 7 NADH
glycerol-3-phosphate dehydrogenase	glyc3pdh	NON	1 DHAP + 1 NADH + 1 ATP ==> 1 Glyc3P + 1 NAD + 1 ADP
lipides accumulation	ac_dag	OUI	1 DAG <==> 1 DAG_ac
Métabolismes des acides nucléiques			
ATP maintenance	atpm	NON	1 ATP ==> 1 ADP + 1 Pi
UMP synthesis	umps	NON	1 CarP + 1 Asp + 1 NAD + 1 PRPP ==> 1 UMP + 1 CO2 + 1 PPi + 1 NADH + 1 Pi + 1 H2O
thymidine degradation	dtmpd	NON	1 dTMP + 4 H2O + 1 Pyr + 1 NADPH + 1 NAD + 1 CoA ==> 1 PtoCoA + 1 Ala + 1 PRPP + 1 HCO3 + 1 CO2 + 1 NH3 + 1 NADP + 1 NADH
UMP kinase	umpk	OUI	1 ATP + 1 UMP <==> 1 ADP + 1 UDP
UDP kinase	udpk	OUI	1 ATP + 1 UDP <==> 1 ADP + 1 UTP
UTP apyrase	utpase	NON	1 UTP + 2 H2O ==> 1 UMP + 2 Pi
CTP synthase	ctps	NON	1 UTP + 1 ATP + 1 Gln ==> 1 CTP + 1 ADP + 1 Glu + 1 Pi
CTP apyrase	ctpase	NON	1 CTP + 2 H2O ==> 1 CMP + 2 Pi
CMP kinase	cmpk	OUI	1 CMP + 1 ATP <==> 1 ADP + 1 CDP
CDP kinase	cdpk	OUI	1 ATP + 1 CDP <==> 1 ADP + 1 CTP
CMP nucleotidase	cmpase	NON	1 CMP + 1 H2O ==> 1 Cyd + 1 Pi
UMP nucleotidase	umpase	NON	1 UMP + 1 H2O ==> 1 Urd + 1 Pi
cytidine deaminase	cydase	NON	1 Cyd + 1 H2O ==> 1 Urd + 1 NH3
uridine kinase	urdk	NON	1 Urd + 1 ATP ==> 1 UMP + 1 ADP
cytidine kinase	cydk	NON	1 Cyd + 1 ATP ==> 1 CMP + 1 ADP
uridine nucleosidase	urdase	NON	1 Urd + 1 H2O + 1 ATP ==> 1 Ura + 1 Ri5P + 1 ADP
uracil phosphoribosyltransferase	urat	OUI	1 UMP + 1 PPi <==> 1 Ura + 1 PRPP
CDP reductase	cdpred	OUI	1 CDP + 1 NADPH <==> 1 dCDP + 1 NADP

dCDP kinase	dcdpk	OUI	1 dCDP + 1 ATP <=> 1 dCTP + 1 ADP
dCMP kinase	dcmpk	OUI	1 dCMP + 1 ATP <=> 1 dCDP + 1 ADP
dCTP diphosphatase	dctpase	NON	1 dCTP + 1 H2O ==> 1 dCMP + 1 PPi
dCMP deaminase	dcmpase	NON	1 dCMP + 1 meTHF + 1 H2O ==> 1 dTMP + 1 NH3 + 1 DHF
dTMP kinase	dtmpk	OUI	1 dTMP + 1 ATP <=> 1 dTDP + 1 ADP
dTDP kinase	dt dpk	OUI	1 dTDP + 1 ATP <=> 1 dTTP + 1 ADP
dTTP apyrase	dttpase	NON	1 dTTP + 2 H2O ==> 1 dTMP + 2 Pi
amidophosphoribosyltransferase and co	aicars	NON	1 PRPP + 2 Gln + 1 Gly + 1 Asp + 4 ATP + 1 fTHF + 1 CO2 + 2 H2O ==> 1 AICAR + 1 Fum + 2 Glu + 4 ADP + 4 Pi + 1 PPi + 1 THF
IMP synthesis	imps	OUI	1 AICAR + 1 fTHF <=> 1 IMP + 1 THF + 1 H2O
IMP degradation	impd	NON	1 IMP + 1 PPi + 8 H2O + 3 O2 ==> 1 Glyx + 1 PRPP + 3 H2O2 + 3 CO2 + 4 NH3
GMP synthase	gm ps	NON	1 IMP + 1 NAD + 1 Gln + 1 ATP + 2 H2O ==> 1 GMP + 1 NADH + 1 Glu + 1 AMP + 1 PPi
GMP reductase	gm pred	NON	1 GMP + 1 NADPH ==> 1 IMP + 1 NADP + 1 NH3
guanylate kinase	gm pk	OUI	1 GMP + 1 ATP <=> 1 GDP + 1 ADP
GDP kinase	gd pk	OUI	1 GDP + 1 ATP <=> 1 GTP + 1 ADP
GTP apyrase	gt pase	NON	1 GTP + 2 H2O ==> 1 GMP + 2 Pi
GDP reductase	gd pred	OUI	1 GDP + 1 NADPH <=> 1 dGDP + 1 NADP
dGDP kinase	dgd pk	OUI	1 dGDP + 1 ATP <=> 1 dGTP + 1 ADP
AMP synthase	amps	NON	1 IMP + 1 GTP + 1 Asp ==> 1 AMP + 1 Fum + 1 GDP + 1 Pi
AMP deaminase	amp da	NON	1 AMP + 1 H2O ==> 1 IMP + 1 NH3
AMP nucleotidase	amp ase	NON	1 AMP + 1 H2O ==> 1 Ade + 1 Pi
adenosine kinase	ade k	OUI	1 Ade + 1 ATP <=> 1 AMP + 1 ADP
adenylate kinase	amp k	OUI	1 AMP + 1 ATP <=> 2 ADP
ATP apyrase	at pase	NON	1 ATP + 2 H2O ==> 1 AMP + 2 Pi
ADP reductase	ad pred	OUI	1 ADP + 1 NADPH <=> 1 dADP + 1 NADP
dADP kinase	dad pk	OUI	1 ATP + 1 dADP <=> 1 ADP + 1 dATP
nucleotide	nucleo	OUI	0.09 dGTP + 0.09 dCTP + 0.16 dATP + 0.16 dTTP + 0.11 GTP + 0.11 CTP + 0.14 ATP + 0.14 UTP <=> 1 ADNARN + 1 PPi

Métabolisme du maintien de statut redox

galactose-1-phosphate phosphatase	gpp	NON	1 GDPgal + 1 H2O ==> 1 GDP + 1 Gal
galactose-1-dehydrogenase and co	galdh	NON	1 Gal + 1 NAD + 1 O2 ==> 1 Asc + 1 NADH + 1 H2O2
ascorbate peroxidase	apx	NON	1 Asc + 1 H2O2 ==> 1 dhAsc + 2 H2O
ascorbate oxidase	aox	NON	2 Asc + 1 O2 ==> 2 dhAsc + 2 H2O
dehydroascorbate reductase (NADH)	dhar1	NON	1 dhAsc + 1 NADH ==> 1 Asc + 1 NAD
dehydroascorbate reductase (glutathione)	dhar2	OUI	1 dhAsc + 2 GSH <=> 1 GSSG + 1 Asc
ascorbate degradation	asc d	NON	1 dhAsc + 1.5 O2 + 2 H2O ==> 1 Thrn + 2 CO2 + 1 H2O2
glutathione-disulfide reductase	gdsr	NON	1 GSSG + 1 NADPH ==> 2 GSH + 1 NADP
glutathione synthase	gshs	NON	1 Glu + 1 Cys + 1 Gly + 2 ATP ==> 1 GSH + 2 ADP + 2 Pi
glutathione hydrolase	gshh	NON	1 GSH + 2 H2O ==> 1 Cys + 1 Gly + 1 Glu
glutathione peroxidase	gshp	NON	2 GSH + 1 H2O2 ==> 1 GSSG + 2 H2O
formate dehydrogenase	hco2dh	NON	1 HCO2 + 1 NAD ==> 1 CO2 + 1 NADH
ATP synthase	nrj1	NON	1 NADH + 2.5 ADP + 2.5 Pi ==> 1 NAD + 2.5 ATP
ATP synthase	nrj2	NON	1 FADH2 + 1.5 ADP + 1.5 Pi ==> 1 FAD + 1.5 ATP
NADPH oxydase and superoxyde dismutase	noxsod	NON	1 NADPH + 1 O2 ==> 1 H2O2 + 1 NADP
Catalase	cat	NON	1 H2O2 ==> 0.5 O2 + 1 H2O
galactose accumulation	ac_gal	OUI	1 Gal <=> 1 Gal_ac
glutathione accumulation	ac_gsh	OUI	1 GSH <=> 1 GSH_ac
glutathione disulfide accumulation	ac_gssg	OUI	1 GSSG <=> 1 GSSG_ac
ascorbate accumulation	ac_asc	OUI	1 Asc <=> 1 Asc_ac
dehydroascorbate accumulation	ac_dhasc	OUI	1 dhAsc <=> 1 dhAsc_ac
carbon dioxide dissipation	co2_dis	NON	1 CO2 ==> 1 CO2_out

Métabolisme des co-facteurs

NAD synthase	nads	NON	1 acMsa + 1 PRPP + 2 ATP + 1 Gln + 1 H2O ==> 1 NAD + 3 PPi + 1 AMP + 1 Glu
NAD kinase	nadk	OUI	1 NAD + 1 ATP ==> 1 ADP + 1 NADP
Coenzyme A biosynthesis	coas	NON	1 kiVa + 1 meTHF + 1 H2O + 1 NADPH + 1 bAla + 1 Cys + 5 ATP ==> 1 CoA + 1 THF + 1 NADP + 2 AMP + 2 ADP + 3 PPi + 1 CO2
FAD synthase	fads	NON	1 GTP + 2 Ru5P + 1 NADPH + 2 ATP ==> 1 FAD + 1 NH3 + 2 HCO2 + 2 PPi + 3 Pi + 4 H2O + 1 NADP + 1 ADP
dihydrofolate synthesis	dhfs	NON	1 GTP + 1 Chor + 1 Gln + 1 ATP + 5 H2O + 2 O2 ==> 1 DHF + 1 Pyr + 1 Glyx + 1 HCO2 + 2 H2O2 + 1 ADP + 4 Pi + 1 PPi
dihydrofolate reductase	dhfr	OUI	1 DHF + 1 NADPH <=> 1 THF + 1 NADP
formate--tetrahydrofolate ligase	fthfl	NON	1 THF + 1 HCO2 + 1 ATP ==> 1 fTHF + 1 ADP + 1 Pi
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	methfdh	OUI	1 fTHF + 1 NADPH <=> 1 meTHF + 1 NADP + 1 H2O
methylenetetrahydrofolate reductase	methfr	NON	1 meTHF + 1 NADPH ==> 1 mTHF + 1 NADP

Annexe V.2 : Liste des métabolites présents dans le modèle

Les métabolites quantifiés sont inscrits en bleu.

Identifiant	Nom	Compartiment
Ac	acetate	interne
AcAc	acetoacetate	interne
AcCoA	acetyl-coenzyme A	interne
acMsa	2-amino-3-carboxymuconate semialdehyde	interne
Ade	adenosine	interne
adhCys	S-adenosyl-homocysteine	interne
adMet	S-adenosyl-methionine	interne
ADP	adenosine-diphosphate	interne
ADPglc	adenosine-diphosphate-glucose	interne
AICAR	aminoimidazole carboxamide ribonucléotide	interne
aKB	alpha-cetobutyrate	interne
aKG	alpha-cetoglutarate	interne
Ala	alanine	interne
AMP	adenosine-monophosphate	interne
Arg	arginine	interne
Aro	arogenate	interne
Asc	ascorbate (reduced)	interne
Asn	asparagine	interne
Asp	aspartate	interne
aTom	alpha-tomatine	interne
ATP	adenosine-triphosphate	interne
bAla	beta-alanine	interne
CarP	carbamoyl-phosphate	interne
CArt	cycloartenol	interne
CDP	cytidine-diphosphate	interne
Chol	cholesterol	interne
Chor	chorismate	interne
Cinn	cinnamate	interne
Cit	citrate	interne
CitMal	citramalate (2-methyl-malate)	interne
Citr	citrulline	interne
CMP	cytidine-monophosphate	interne
CO2	carbon dioxyde	interne
Conif	coniferaldehyde	interne
CoumCoA	coumaroyl-coenzyme A	interne
CQA	chlorogenic acid (caffeoyl-quinic acid)	interne
CTP	cytidine-triphosphate	interne
CW	cell wall	interne
Cyd	cytidine	interne
Cys	cysteine	interne
dADP	deoxyadenosine-monophosphate	interne
DAG	diacylglycerol	interne
dATP	deoxyadenosine-triphosphate	interne
dCDP	deoxycytidine-diphosphate	interne
dCMP	deoxycytidine-monophosphate	interne
dCTP	deoxycytidine-triphosphate	interne
dGDP	deoxyguanosine-monophosphate	interne
dGTP	deoxyguanosine-triphosphate	interne
DHAP	dihydroxyacetone phosphate	interne

dhAsc	dehydroascorbate (oxidized)	interne
DHF	7,8-dihydrofolate	interne
dhQ	dehydroquinate	interne
dmadP	dimethylallyl-diphosphate	interne
dPG	diphosphoglycerate	interne
dTDP	deoxythymidine-diphosphate	interne
dTMP	deoxythymidine-monophosphate	interne
dTTP	deoxythymidine-triphosphate	interne
E4P	erythrose-4-phosphate	interne
F16bP	fructose-1,6-biphosphate	interne
F6P	fructose-6-phosphate	interne
FA16	fatty acids C16	interne
FA16CoA	fatty acids C16 - coenzyme A	interne
FA18	fatty acids C18	interne
FA18CoA	fatty acids C18 - coenzyme A	interne
FAD	flavine-adenine dinucleotide (oxidized)	interne
FADH2	dihydroflavine-adenine dinucleotide (reduced)	interne
Fru	fructose	interne
fTHF	10-formyltetrahydrofolate	interne
Fum	fumarate	interne
G1P	glucose-1-phosphate	interne
G6P	glucose-6-phosphate	interne
GABA	gamma-amino-butyric acid	interne
Gal	galactose	interne
GAP	glyceraldehyde-3-phosphate	interne
GDP	guanosine-diphosphate	interne
GDPfuc	guanosine-diphosphate-fucose	interne
GDPgal	guanosine-diphosphate-galactose	interne
GDPman	guanosine-diphosphate-mannose	interne
Glc	glucose	interne
Glignin	monolignol G (guaiacyl lignin)	interne
Gln	glutamine	interne
Glu	glutamate	interne
Glusa	glutamate-semialdehyde	interne
Gly	glycine	interne
Glyc3P	glycerol-3-phosphate	interne
Glyx	glyoxylate	interne
GMP	guanosine-monophosphate	interne
gPP	geranyl-diphosphate	interne
GSH	glutathione (reduced)	interne
GSSG	glutathione disulfide (oxidized)	interne
GTP	guanosine-triphosphate	interne
H2O2	hydrogen peroxide	interne
H2S	hydrogen sulfide	interne
HCO2	formate	interne
HCO3	bicarbonate	interne
hCys	homocysteine	interne
His	histidine	interne
Hlignin	monolignol H (p-hydroxy-phenyl lignin)	interne
hpPyr	4-hydroxyphenylpyruvate	interne

hPyr	3-hydroxypyruvate	interne
ICit	isocitrate	interne
Ile	isoleucine	interne
IMP	imidazole-5'-phosphate	interne
ipdP	isopentenyl-diphosphate	interne
Kaemp	kaempferol	interne
kiCa	2-ketoisocaproate	interne
kiVa	alpha-ketoisovalerate	interne
kmVa	2-keto-3-methylvalerate	interne
Leu	leucine	interne
lignin	lignin	interne
Lys	lysine	interne
Mal	malate	interne
MaloCoA	malonyl-coenzyme A	interne
Malosa	malonate-semialdehyde	interne
Met	methionine	interne
meTHF	5,10-methenyl-tetrahydrofolate	interne
mTHF	5-methyl-tetrahydrofolate	interne
MyoI	myo-inositol	interne
NAD	oxidized nicotinamide adenine dinucleotide	interne
NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide	interne
NADP	oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	interne
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	interne
NH3	ammonia	interne
NO3	nitrate	interne
O2	dioxygen	interne
OAA	oxaloacetate	interne
OphSer	O-phospho-homoserine	interne
Orn	ornithine	interne
PEP	phosphoenolpyruvate	interne
PG	phosphoglycerate	interne
Phe	phenylalanine	interne
PioCoA	propionyl-coenzyme A	interne
Pph	prephenate	interne
Pro	proline	interne
PROTEIN	proteins	interne
PRPP	5-phosphoribosyl-1-diphosphate	interne
Put	putrescine	interne
Pyr	pyruvate	interne
Quin	quinate	interne
Ri5P	ribose-5-phosphate	interne
Ru5P	ribulose-5-phosphate	interne
RuPP	ribulose-1,5-diphosphate	interne
Rutin	rutin (quercetin 3-rutinoside)	interne
S7P	sedoheptulose-7-phosphate	interne
Ser	Serine	interne
Shik	shikimate	interne
Slignin	monolignol S (syringyl lignin)	interne
Sper	spermidine	interne
Ssa	succinate semialdehyde	interne

Starch	starch	interne
Suc	sucrose	interne
Succ	succinate	interne
SuccCoA	succinyl-coenzyme A	interne
SucP	sucrose-phosphate	interne
THF	tetrahydrofolate	interne
Thr	threonine	interne
Tomd	tomatidine	interne
Trp	tryptophane	interne
Tyr	tyrosine	interne
UDP	uridine-diphosphate	interne
UDPara	uridine-diphosphate-arabinose	interne
UDPgal	uridine-diphosphate-galactose	interne
UDPgala	uridine-diphosphate-galacturonate	interne
UDPglc	uridine-diphosphate-glucose	interne
UDPglua	uridine-diphosphate-glucuronate	interne
UDPrha	uridine-diphosphate-rhamnose	interne
UDPxyl	uridine-diphosphate-xylose	interne
UMP	uridine-monophosphate	interne
Ura	uracil	interne
Urd	uridine	interne
Urea	urea	interne
UTP	uridine-triphosphate	interne
Val	valine	interne
XSP	xylulose-5-phosphate	interne
ADNARN	nucleic acids	externe
Ala_ac	alanine accumulation	externe
Arg_ac	arginine accumulation	externe
Asc_ac	ascorbate (reduced) accumulation	externe
Asn_ac	asparagine accumulation	externe
Asp_ac	aspartate accumulation	externe
aTom_ac	alpha-tomatine accumulation	externe
bAla_ac	beta-alanine accumulation	externe
Cit_ac	citrate accumulation	externe
Citr_ac	citrulline accumulation	externe
CO2_out	carbon dioxyde	externe
CoA	coenzyme A	externe
CQA_ac	chlorogenic accumulation	externe
CQA_ph	chlorogenic in phloem	externe
CW_ac	cell wall accumulation	externe
Cys_ac	cysteine accumulation	externe
DAG_ac	lipides accumulation	externe
dhAsc_ac	dehydroascorbate (oxidized) accumulation	externe
Fru_ac	fructose accumulation	externe
GABA_ac	GABA accumulation	externe
Gal_ac	galactose accumulation	externe
Glc_ac	glucose accumulation	externe
Gln_ac	glutamine accumulation	externe
Gln_in	glutamine uptake	externe
Glu_ac	glutamate accumulation	externe

Gly_ac	glycine accumulation	externe
gPP_ac	geranyl-diphosphate accumulation	externe
GSH_ac	glutathione accumulation	externe
GSSG_ac	glutathione disulfide accumulation	externe
H2O	water	externe
His_ac	histidine accumulation	externe
Ile_ac	isoleucine accumulation	externe
Leu_ac	leucine accumulation	externe
Lys_ac	lysine accumulation	externe
Mal_ac	malate accumulation	externe
Met_ac	methionine accumulation	externe
Myol_ac	myo-inositol accumulation	externe
NH3_ac	ammonium accumulation	externe
NO3_ac	nitrate accumulation	externe
NO3_in	nitrate uptake	externe
O2_in	dioxygen uptake	externe
Phe_ac	phenylalanine accumulation	externe
Pi	inorganic phosphate	externe
PPi	pyrophosphate	externe
Pro_ac	proline accumulation	externe
PROTEIN_ac	proteins accumulation	externe
Put_ac	putrescine accumulation	externe
Quin_ac	quininate accumulation	externe
Rutin_ac	rutin accumulation	externe
Ser_ac	serine accumulation	externe
Sper_ac	spermidine accumulation	externe
Starch_ac	starch accumulation	externe
Suc_ac	sucrose accumulation	externe
Suc_in	sucrose uptake	externe
Succ_ac	succinate accumulation	externe
Thr_ac	threonine accumulation	externe
Thrn	threonate	externe
Tomd_ac	tomatidine accumulation	externe
Trp_ac	tryptophane accumulation	externe
Tyr_ac	tyrosine accumulation	externe
Val_ac	valine accumulation	externe

Annexe V.3 : Régression sur les données expérimentales

Résumé des contraintes expérimentales utilisées dans le modèle avec le coefficient détermination (R^2) de la régression linéaire.

Plantes *mock*-inoculées

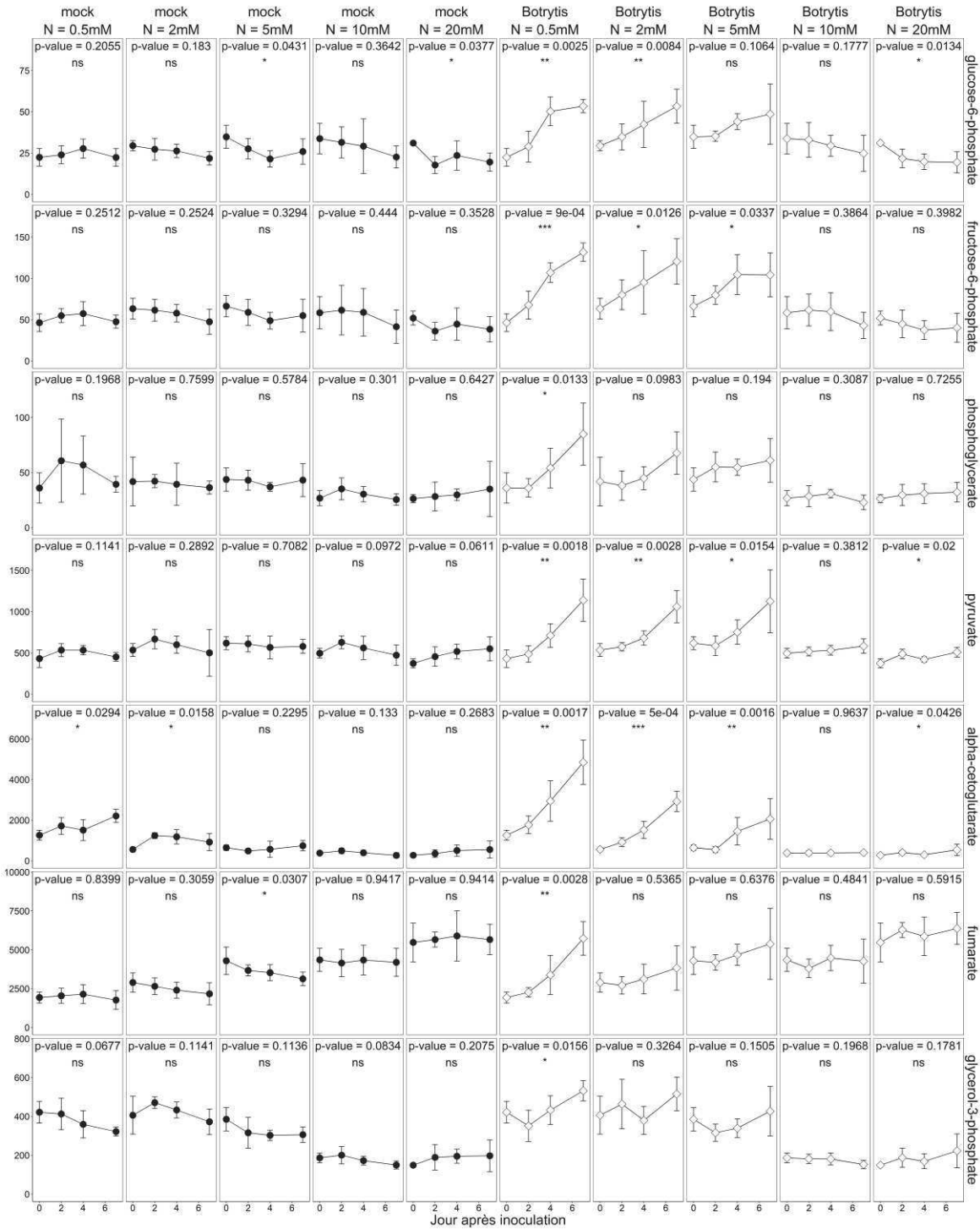
	N = 0,5 mM		N = 2 mM		N = 5 mM		N = 10 mM		N = 20 mM	
	Flux	R ² régression	Flux	R ² régression	Flux	R ² régression	Flux	R ² régression	Flux	R ² régression
Assimilation des sucres et stockage										
Vac_fru	7.1E-03	0.010	-5.8E-02	0.332	-3.8E-02	0.085	-8.8E-02	0.369	3.0E-02	0.024
Vac_glc	-1.0E-01	0.062	-1.8E-01	0.069	-1.8E-01	0.082	-6.1E-01	0.432	-7.7E-02	0.006
Vac_suc	-2.5E-02	0.002	-1.6E-01	0.097	-5.7E-01	0.404	-2.5E-01	0.100	6.1E-01	0.132
Vac_starch	3.9E+00	0.174	2.8E+00	0.219	4.2E+00	0.271	-1.9E-01	0.007	3.5E+00	0.117
Cycle de Krebs										
Vac_succ	9.5E-04	0.078	1.0E-03	0.112	4.8E-04	0.006	1.5E-03	0.153	3.0E-04	0.002
Vac_mal	-1.9E-01	0.225	-5.0E-01	0.418	-2.8E-01	0.128	-2.1E-03	0.000	3.9E-02	0.002
Vac_ct	3.4E-02	0.026	2.2E-01	0.237	6.0E-03	0.000	2.0E-01	0.760	2.0E-01	0.422
Métabolisme du shikimate et des composés phénoliques										
Vac_quin	-2.0E-02	0.112	-1.6E-02	0.065	-2.2E-02	0.290	-5.3E-03	0.025	8.4E-04	0.002
Vac_tyr	-5.7E-04	0.070	7.9E-04	0.038	2.0E-03	0.233	-1.4E-03	0.092	1.7E-03	0.083
Vac_phe	-2.4E-03	0.310	-5.1E-03	0.217	-3.5E-03	0.157	1.6E-03	0.108	1.3E-02	0.513
Vac_trp	-2.1E-03	0.209	1.9E-03	0.409	2.5E-03	0.15	-1.2E-04	0.000	5.2E-03	0.172
Vac_cqa	-1.6E-03	0.038	3.0E-03	0.089	-3.4E-04	0.001	-5.1E-03	0.084	1.1E-02	0.302
Vac_rut	6.0E-03	0.083	1.1E-02	0.091	3.4E-02	0.594	1.6E-02	0.352	9.4E-03	0.331
Shunt du GABA										
Vac_gaba	-3.9E-03	0.492	-9.8E-03	0.194	-1.5E-02	0.228	-7.0E-03	0.038	-9.1E-06	0.000
Assimilation de l'azote										
Vac_arg	-4.0E-04	0.192	-6.4E-04	0.063	-5.4E-04	0.029	5.2E-04	0.012	2.0E-03	0.266
Vac_citr	-1.0E-04	0.106	-5.7E-04	0.230	-4.8E-03	0.760	-5.9E-03	0.301	-1.7E-03	0.023
Vac_lys	-6.5E-04	0.135	1.6E-03	0.077	1.5E-03	0.046	-5.6E-04	0.006	3.1E-03	0.163
Vac_asp	-1.8E-02	0.605	-5.0E-02	0.574	-1.1E-01	0.637	-5.2E-02	0.273	3.0E-02	0.049
Vac_glu	-1.1E-02	0.127	-2.6E-02	0.134	-7.9E-02	0.255	-7.6E-02	0.194	2.3E-02	0.016
Vac_asn	-3.8E-03	0.615	-1.5E-02	0.325	-8.1E-02	0.408	-7.3E-02	0.378	3.8E-02	0.050
Vac_gln	-2.0E-02	0.575	-1.5E-01	0.639	-5.6E-01	0.689	-6.6E-01	0.548	-1.5E-01	0.030
Vac_no3 (min.)	4.8E-04	0.023	2.4E-03	0.144	4.0E-02	0.120	5.9E-01	0.665	1.4E+00	0.337
Vac_no3 (max.)	2.6E-03	0.023	5.5E-02	0.144	5.7E-01	0.120	1.8E+00	0.665	2.8E+00	0.337
Métabolisme des acides aminés branchés										
Vac_val	-2.3E-03	0.215	-4.3E-03	0.155	-1.1E-02	0.390	-1.6E-02	0.585	-7.5E-04	0.001
Vac_ile	-1.0E-03	0.158	-2.4E-03	0.151	-3.4E-03	0.188	-9.1E-03	0.508	2.7E-03	0.000
Vac_leu	-1.3E-03	0.286	-2.0E-03	0.147	-3.4E-03	0.195	-5.6E-03	0.358	1.6E-03	0.027
Métabolisme de l'histidine										
Vac_his	-5.6E-04	0.088	-3.8E-03	0.174	-7.7E-03	0.404	-9.1E-03	0.364	3.4E-03	0.051
Métabolisme de la proline										
Vac_pro	-1.1E-02	0.613	-9.2E-02	0.430	-9.6E-02	0.610	-7.5E-02	0.363	8.1E-02	0.078
Métabolisme des autres acides aminés										
Vac_ser	-7.9E-03	0.375	-1.3E-02	0.240	-3.2E-02	0.482	-5.0E-02	0.698	-2.1E-02	0.133
Vac_gly	-6.1E-04	0.160	-7.5E-04	0.058	-2.6E-03	0.435	-7.8E-03	0.672	-5.8E-03	0.404
Vac_thr	-3.2E-03	0.272	-1.0E-02	0.316	-2.7E-02	0.604	-3.1E-02	0.659	-2.4E-03	0.002
Vac_ala	-2.8E-03	0.159	-5.9E-04	0.002	-4.1E-03	0.043	3.1E-03	0.066	1.2E-02	0.372
Vac_met	-5.5E-05	0.078	-2.3E-04	0.090	-6.0E-04	0.337	1.9E-05	0.000	7.3E-04	0.373
Métabolisme des polyamines										
Vac_bala	-4.7E-04	0.363	-3.8E-04	0.036	-2.2E-03	0.598	-4.5E-03	0.621	-2.7E-03	0.268
Vac_sper	-2.2E-05	0.053	-2.3E-05	0.013	-7.6E-05	0.033	-2.0E-05	0.003	6.6E-06	0.001
Vac_put	4.4E-05	0.068	1.8E-04	0.083	-2.6E-05	0.001	-1.1E-04	0.013	7.1E-04	0.314
Métabolisme du géranyl-PP et de la tomatine										
Vac_atom	-2.1E-03	0.017	1.3E-02	0.108	-1.1E-02	0.119	3.9E-03	0.012	3.9E-02	0.441
Synthèse et dégradation des protéines										
Vac_prot	-1.6E+00	0.588	-1.7E+00	0.225	-1.4E+00	0.052	-2.5E-01	0.004	-9.3E-01	0.091
Synthèse et de dégradation des parois										
Vac_myoi	-2.5E-02	0.154	-1.2E-02	0.021	-3.8E-02	0.219	-3.0E-02	0.297	1.1E-02	0.012
Vac_cw	2.3E+00	0.030	7.7E+00	0.291	1.3E+01	0.406	1.1E+01	0.691	1.1E+01	0.293
Métabolisme des acides nucléiques										
Vnucleo	-1.5E-03	0.185	-2.1E-03	0.208	1.7E-03	0.032	1.3E-02	0.384	-2.3E-04	0.000
Métabolisme des lipides										
Vac_dag	1.3E-04	0.000	-3.0E-03	0.002	2.4E-02	0.034	3.8E-02	0.048	4.9E-03	0.001
Métabolisme de maintien du statut redox										
Vac_gal	6.3E-04	0.030	1.1E-03	0.068	3.2E-03	0.259	-1.1E-03	0.053	-2.5E-04	0.006
Vac_gssg (max.)	-1.1E-03	0.173	-1.1E-04	0.001	9.0E-04	0.024	-2.6E-04	0.004	5.4E-04	0.005
Vac_gsh (max.)	-2.8E-03	0.246	-2.3E-04	0.001	1.8E-03	0.024	-5.2E-04	0.004	1.1E-03	0.005
Vac_asc	-1.3E-03	0.001	-1.9E-02	0.130	2.5E-02	0.181	7.2E-03	0.055	1.4E-02	0.143
Vac_dhasc	-6.1E-03	0.117	2.7E-02	0.262	-6.8E-03	0.012	5.7E-03	0.032	9.2E-03	0.096

Plantes inoculées avec *Botrytis*

	N = 0.5 mM		N = 2 mM		N = 5 mM		N = 10 mM		N = 20 mM	
	Flux	R2 régression	Flux	R2 régression	Flux	R2 régression	Flux	R2 régression	Flux	R2 régression
Assimilation des sucres et stockage										
Vac_fru	1.2E-01	0.519	1.5E-01	0.594	2.7E-01	0.583	4.5E-02	0.236	1.6E-02	0.009
Vac_glc	1.2E-01	0.047	5.3E-02	0.015	6.9E-02	0.010	3.0E-01	0.102	-1.7E-01	0.037
Vac_suc	3.6E-02	0.005	2.8E-02	0.002	-2.6E-01	0.111	2.1E-02	0.001	4.5E-01	0.196
Vac_starch	3.5E+00	0.210	1.4E+00	0.049	2.4E+00	0.112	6.1E-01	0.024	4.6E-01	0.022
Cycle de Krebs										
Vac_succ	8.9E-03	0.512	8.5E-03	0.521	7.8E-03	0.245	2.0E-03	0.139	2.3E-03	0.140
Vac_mal	-1.3E-01	0.078	-3.2E-01	0.417	8.3E-02	0.008	5.0E-02	0.006	-3.4E-02	0.002
Vac_cit	2.5E-01	0.363	3.9E-01	0.417	3.7E-01	0.261	2.7E-01	0.778	2.5E-01	0.684
Métabolisme du shikimate et des composés phénoliques										
Vac_quin	-3.4E-02	0.331	-2.2E-02	0.127	-2.0E-02	0.041	-4.2E-03	0.111	2.9E-03	0.032
Vac_tyr	2.1E-03	0.321	3.9E-03	0.346	7.7E-03	0.494	4.5E-04	0.008	3.9E-05	0.000
Vac_phe	5.8E-05	0.000	-4.0E-03	0.104	6.3E-04	0.004	3.8E-03	0.385	5.9E-03	0.407
Vac_trp	-1.1E-03	0.047	4.5E-04	0.028	2.8E-03	0.176	-1.6E-04	0.001	-2.2E-03	0.062
Vac_cqa	2.8E-03	0.103	2.3E-02	0.728	2.2E-02	0.466	3.0E-03	0.172	7.8E-03	0.275
Vac_rut	2.1E-02	0.270	3.4E-02	0.515	3.2E-02	0.594	9.3E-03	0.105	1.5E-02	0.396
Shunt du GABA										
Vac_gaba	1.6E-02	0.491	-8.5E-03	0.115	7.7E-03	0.035	-2.5E-02	0.448	-5.7E-03	0.033
Assimilation de l'azote										
Vac_arg	-2.6E-04	0.051	-1.7E-04	0.004	2.0E-03	0.176	2.5E-03	0.352	1.6E-03	0.185
Vac_citr	-1.6E-04	0.216	-4.0E-04	0.160	-5.1E-03	0.626	-1.1E-02	0.492	-5.2E-03	0.168
Vac_lys	4.6E-04	0.031	2.2E-03	0.224	9.4E-03	0.474	3.0E-03	0.170	1.8E-03	0.068
Vac_asp	2.4E-03	0.005	-2.2E-02	0.101	-3.2E-02	0.077	-5.1E-03	0.006	2.1E-02	0.026
Vac_glu	2.6E-02	0.213	3.1E-02	0.113	3.9E-03	0.002	-4.9E-04	0.000	3.1E-02	0.023
Vac_asn	-3.6E-03	0.409	-1.7E-02	0.238	-7.4E-02	0.340	-9.2E-02	0.341	2.3E-02	0.018
Vac_gln	-2.1E-02	0.466	-1.4E-01	0.516	-5.2E-01	0.620	-6.9E-01	0.606	-2.5E-01	0.076
Vac_no3 (min.)	2.5E-04	0.012	3.9E-03	0.203	1.0E-01	0.463	8.0E-01	0.784	9.6E-01	0.357
Vac_no3 (max.)	1.3E-03	0.012	9.0E-02	0.203	1.5E+00	0.463	2.4E+00	0.784	1.9E+00	0.357
Métabolisme des acides aminés branchés										
Vac_val	1.2E-03	0.093	-1.7E-03	0.028	1.1E-02	0.097	-1.3E-02	0.474	1.5E-03	0.003
Vac_ile	2.0E-03	0.161	-1.4E-03	0.053	1.0E-02	0.185	-7.9E-03	0.390	-1.9E-03	0.024
Vac_leu	6.2E-05	0.000	-1.9E-03	0.101	1.1E-02	0.203	-3.4E-03	0.146	9.6E-04	0.011
Métabolisme de l'histidine										
Vac_his	1.3E-03	0.153	-3.4E-03	0.121	1.6E-03	0.010	-8.1E-03	0.277	2.6E-03	0.013
Métabolisme de la proline										
Vac_pro	-9.4E-03	0.544	-1.1E-01	0.521	-9.9E-02	0.632	-8.0E-02	0.622	3.6E-02	0.013
Métabolisme des autres acides aminés										
Vac_ser	-2.6E-04	0.000	-1.1E-02	0.150	-3.5E-03	0.004	-4.4E-02	0.588	-2.4E-02	0.172
Vac_gly	-3.8E-04	0.070	-7.9E-04	0.090	-2.3E-03	0.439	-8.7E-03	0.709	-6.3E-03	0.377
Vac_thr	-1.1E-03	0.030	-1.0E-02	0.295	-1.5E-02	0.269	-3.6E-02	0.602	-1.7E-02	0.128
Vac_ala	2.1E-03	0.049	1.2E-03	0.002	6.3E-03	0.047	7.8E-03	0.190	1.9E-02	0.396
Vac_met	-3.8E-05	0.049	-1.5E-04	0.072	-5.3E-05	0.002	5.1E-04	0.195	1.0E-03	0.436
Métabolisme des polyamines										
Vac_bala	8.7E-04	0.309	7.0E-04	0.112	9.5E-04	0.040	-4.3E-03	0.741	-2.8E-03	0.226
Vac_sper	7.4E-05	0.093	2.0E-04	0.345	2.4E-04	0.131	2.1E-04	0.223	-3.9E-05	0.017
Vac_put	2.7E-04	0.586	8.0E-04	0.520	1.5E-03	0.594	3.1E-04	0.115	7.3E-04	0.219
Métabolisme du gényryl-PP et de la tomatine										
Vac_atom	-7.7E-03	0.117	2.2E-02	0.230	3.6E-02	0.318	1.8E-02	0.309	3.2E-02	0.521
Synthèse et dégradation des protéines										
Vac_prot	6.6E-01	0.045	3.3E+00	0.597	4.5E+00	0.331	3.8E+00	0.576	1.1E+00	0.130
Synthèse et de dégradation des parois										
Vac_myoi	-2.2E-02	0.147	-7.6E-02	0.542	-8.3E-02	0.577	-4.5E-02	0.557	-2.5E-02	0.137
Vac_cw	6.0E+00	0.152	7.8E+00	0.177	1.8E+01	0.551	2.0E+01	0.879	1.2E+01	0.536
Métabolisme des acides nucléiques										
Vnucleo	-8.8E-04	0.064	4.1E-03	0.157	4.4E-03	0.096	2.0E-02	0.439	1.7E-03	0.035
Métabolisme des lipides										
Vac_dag	-1.5E-02	0.010	3.7E-02	0.086	8.5E-02	0.258	7.4E-02	0.223	2.5E-02	0.047
Métabolisme de maintien du statut redox										
Vac_gal	1.3E-03	0.068	2.2E-03	0.189	3.4E-03	0.437	2.9E-04	0.004	-4.4E-04	0.011
Vac_gssg (max.)	3.7E-03	0.389	6.5E-03	0.514	8.8E-03	0.480	1.8E-03	0.090	1.8E-03	0.084
Vac_gsh (max.)	7.4E-03	0.389	1.3E-02	0.514	1.8E-02	0.480	3.5E-03	0.090	3.6E-03	0.084
Vac_asc	-1.7E-02	0.163	-3.0E-02	0.335	-8.5E-03	0.015	4.2E-03	0.019	3.9E-03	0.030
Vac_dhasc	5.5E-03	0.040	2.7E-02	0.248	1.0E-02	0.028	6.0E-03	0.059	8.0E-03	0.065

Annexe V.4 : Évolution des métabolites internes

Évolution des quantités en métabolites internes mesurées pendant 7 jours, au différents niveau d'azote et d'inoculation. Les différences au cours du temps ont été vérifiées par un test de Kruskal-Wallis. Les différences et les p-valeurs associées sont indiquées dans chaque graphe par ns (p-valeur > 0,05), * (0.05 > p-valeur > 0.01), ** (0.01 > p-valeur > 0.001) et *** (0.001 > p-valeur). Chaque valeur correspond à la moyenne de 5 répétitions biologiques et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre ces répétitions.



Chapitre VI

Effet de la nutrition azotée et de l'infection par *Botrytis cinerea* sur la teneur en phytohormones dans les tiges de tomate

François Lecompte, Nathalie Lacrampe, Sylvie Citerne, Doriane Dumont,

Sophie Colombié, Philippe Nicot, Raphaël Lugan

1. Introduction

Les phytohormones sont des molécules de classes chimiques diverses, présentes en très faibles concentrations dans les tissus végétaux et qui régulent, par la signalisation moléculaire qu'elles engendrent, les processus de croissance, de développement, et de réponse à l'environnement biotique et abiotique. Les hormones existent sous diverses formes, dont certaines seulement sont actives biologiquement (Fàbregas and Fernie 2022). Les contrôles de la synthèse, de la conjugaison et du catabolisme des hormones permettent leur régulation homéostatique et l'adaptation aux changements environnementaux (Benjamins and Scheres 2008; Westfall *et al.* 2016; Albrecht and Argueso 2017; Chen *et al.* 2020).

Les principales hormones associées au stress biotique sont l'éthylène (ET), l'acide salicylique (SA) (Vlot *et al.* 2009) et l'acide jasmonique (JA) (Wasternack and Hause 2013) et leurs dérivés. Les voies SA- et JA/ET-dépendantes sont souvent considérées, par le nombre de gènes qu'elles peuvent contrôler suite à un signal biotique, comme les principales signalisations liées à la défense des plantes (Aerts *et al.* 2021). Face aux stress biotiques, les rôles prépondérants de la voie SA-dépendante contre les pathogènes biotrophes, et de la voie JA-dépendante contre les pathogènes nécrotrophes et les insectes ont été largement reconnus. La signalisation en aval du JA se découpe schématiquement en deux branches antagonistes liées à l'activité des facteurs de transcription, celle des MYC, coréglée par l'ABA et permettant la réponse aux blessures et aux insectes, et celle des ERF, coréglée par l'ET qui permet la réponse aux pathogènes nécrotrophes (Berrocal-Lobo *et al.* 2002; Lorenzo *et al.* 2003, 2004; Anderson *et al.* 2004; Fernández-Calvo *et al.* 2011; Verhage *et al.* 2011; Zhu *et al.* 2011). Pour autant, les plantes subissent en permanence des attaques de diverses natures, simultanées ou successives, dans des conditions abiotiques variées, et doivent mettre en place des stratégies d'adaptation compromettant au minimum leur aptitude (fitness). L'ensemble du processus de signalisation est continuellement coréglé (Glazebrook 2005; Robert-Seilaniantz, Grant, *et al.* 2011; Pieterse *et al.* 2012; Huot *et al.* 2014; Shigenaga and Argueso 2016).

Une signalisation JA/ET fonctionnelle est requise pour la défense d'*Arabidopsis* contre *B. cinerea* (Rowe *et al.* 2010; Windram *et al.* 2012; Coolen *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017). Chez la tomate, des mutants JA ou ET sont plus sensibles, en particulier ceux portant la mutation

jai1, gène orthologue de *COI1* chez *Arabidopsis* (Díaz *et al.* 2002; AbuQamar *et al.* 2008; Du *et al.* 2017). Le rôle du SA dans la défense contre *B. cinerea* n'est pas totalement éclairci. L'ajout exogène de SA ou de son analogue BTH peut induire une résistance à *B. cinerea* chez le haricot, la tomate, le tabac et *Arabidopsis* (De Meyer *et al.* 1998; Murphy *et al.* 2000; Audenaert *et al.* 2002), avec cependant des résultats contradictoires chez ces deux dernières espèces (Harel *et al.* 2014; Yuan *et al.* 2017). Des marqueurs de la voie SA comme PR1, PR5, Chi9 ou Glub sont exprimés suite à l'infection par *B. cinerea*, mais selon les études le niveau de SA mesuré dans la plante augmente ou diminue après l'infection (Govrin and Levine 2002; Ferrari *et al.* 2003; Vicedo *et al.* 2009; Harel *et al.* 2014; Gupta *et al.* 2020). Les mutants SA apparaissent selon les études plus sensibles ou aussi sensibles que le sauvage (WT, *wild type*) (Zimmerli *et al.* 2001; Audenaert *et al.* 2002; Ferrari *et al.* 2003, 2007; AbuQamar *et al.* 2006; Achuo *et al.* 2006). Dans l'étude récente d'une population d'isolats de *B. cinerea* infectant *Arabidopsis*, le mutant SA *npr1-1* est apparu en moyenne légèrement plus sensible que le WT Col-0, ce qui suggère que la voie SA concourt à la résistance, au moins contre certains isolats (Zhang *et al.* 2017). Par ailleurs certains isolats de *B. cinerea* sécrètent un exopolysaccharide qui enclenche la signalisation SA, au détriment de la voie JA, ce qui diminue la résistance (El Oirdi *et al.* 2011), l'antagonisme majeur entre les voies du JA et du SA étant bien documenté (Kunkel and Brooks 2002; Aerts *et al.* 2021). D'autre part, le SA et le Me-SA ont directement un effet fongistatique sur au moins certains isolats de *B. cinerea* (Dieryckx *et al.* 2015).

Le rôle de l'ABA dans la défense contre les bioagresseurs est complexe. L'ABA intervient à des niveaux multiples, et selon les cas diminue ou augmente la résistance aux maladies (Ton *et al.* 2009). L'ABA compromet la réponse à de nombreux pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes, comme *Pseudomonas syringae*, *Hyaloperonospora arabidopsis*, *Xanthomonas oryzae* ou *Phytophthora spp* (Yasuda *et al.* 2008; Fan *et al.* 2009; Xu *et al.* 2013), du fait d'un antagonisme des signalisations SA et ABA (Yasuda *et al.* 2008; Fan *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2010; Xu *et al.* 2013). L'ajout externe d'ABA peut provoquer une augmentation de JA chez *Arabidopsis* (Fan *et al.* 2009) car il agit directement sur la signalisation JA, via l'activation de la transcription de *MYC2* (Aleman *et al.* 2016), mais il y a aussi un antagonisme avec l'ET et la voie des ERF (Abe *et al.* 2003; Anderson *et al.* 2004; Hickman *et al.* 2017). Ainsi, sur 341 accessions d'*Arabidopsis*, l'expression du marqueur de la voie JA *PDF1.2* est réduite dans 317 cas lors d'une stimulation avec du Me-JA + ABA par rapport à du Me-JA seul (Proietti

et al. 2018). Pourtant l'effet de l'ABA sur les nécrotrophes est variable selon les travaux. Une mutation ABA ou un ajout d'ABA externe va dans le sens d'un effet positif de l'ABA sur la résistance à *Alternaria brassicicola* (Ton and Mauch-Mani 2004; Adie *et al.* 2007; Flors *et al.* 2007), *Plectosphaerela cucumerina* (Ton and Mauch-Mani 2004; Sánchez-Vallet *et al.* 2012) et *Sclerotinia sclerotiorum* (Perchepied *et al.* 2010). Sur *Botrytis cinerea* en revanche, l'ABA est considéré comme augmentant la sensibilité (Audenaert *et al.* 2002; Achuo *et al.* 2006; Adie *et al.* 2007; Liu *et al.* 2015), même si des résultats contradictoires ont été présentés (Cui *et al.* 2019).

Le compromis entre la croissance et la défense a souvent été présenté comme la nécessité de partager des ressources en quantités finies pour la croissance et la reproduction d'une part et la production de molécules permettant de se défendre contre les bioagresseurs d'autre part (Havko *et al.* 2016; Kliebenstein 2016). Le rôle de la signalisation hormonale dans l'expression de ce compromis est de mieux en mieux compris (Huot *et al.* 2014). La croissance et le développement sont contrôlés par des hormones comme les auxines (et leur principale forme, l'acide indole acétique, désigné ici par auxine, IAA), les cytokinines (CK) et les gibbérellines (GA). Les mutants exprimant de manière constitutive les voies JA ou SA ont une croissance plus faible que les types sauvages (WT) (Huot *et al.* 2014; Campos *et al.* 2016). Le SA, en réprimant le récepteur de l'auxine TIR1 et en stabilisant les répresseurs Aux/IAA de la voie de signalisation agit de manière antagoniste avec l'auxine (Navarro *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007; Robert-Seilaniantz, MacLean, *et al.* 2011). Il est en revanche généralement considéré un effet synergique de l'auxine sur la voie JA, du fait notamment de l'influence positive du JA sur la synthèse de l'IAA, via les gènes *ASA1*, *ASB1* et *YUCCAs* (Qi *et al.* 2012; Hentrich *et al.* 2013; Shigenaga and Argueso 2016), et parce qu'il a été montré que la répression de la signalisation IAA augmente la sensibilité d'*Arabidopsis* aux nécrotrophes (Llorente *et al.* 2008). Les mutants *Arabidopsis* IAA-résistants *axr1*, *axr2* ou *axr6* sont plus sensibles à *B. cinerea*, suggérant un rôle important de la signalisation auxine (Llorente *et al.* 2008). Cependant chez Col-0 l'infiltration d'IAA, ou du conjugué IAA-ASP, augmente la sensibilité à *B. cinerea* (González-Lamothe *et al.* 2012). Un élément clé du compromis croissance-défense du point de vue hormonal est l'antagonisme entre la signalisation GA-dépendante et la signalisation JA-dépendante (Hou *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012; Heinrich *et al.* 2013). Un lien entre ce

compromis et le fonctionnement du phytochrome a été démontré (Cerrudo *et al.* 2012; Campos *et al.* 2016; Havko *et al.* 2016; Liu *et al.* 2019; Courbier *et al.* 2020).

Les CKs promeuvent la résistance aux biotrophes (Shigenaga and Argueso 2016; Albrecht and Argueso 2017). Les CKs semblent également favoriser la résistance aux nécrotrophes. La surexpression des gènes *IPT*, codant pour des isopentenyl transférases liées à la biosynthèse des CKs, favorise la résistance à *B. cinerea*. Les récepteurs AHK des CKs contribuent également à la résistance aux nécrotrophes, les mutants pour ces récepteurs étant plus sensibles (Pham *et al.* 2012; Proietti *et al.* 2018; Li *et al.* 2021). L'ajout de CKs externe favorise la résistance à *B. cinerea* chez la tomate, avec une médiation apparente des voies SA et ET car les mutants *NahG* (SA) et *Never Ripe* (ET) (Gupta *et al.* 2020) ne montrent pas cet effet priming. Une forte accumulation de cis-zeatine et de cis-zeatine-riboside suite à l'infection par *B. cinerea* a été récemment montrée chez *Arabidopsis* (Li *et al.* 2021).

Une seule étude, à notre connaissance, a examiné l'influence de la signalisation hormonale sur tige de tomate infectée par *B. cinerea* (Beyers *et al.* 2014). Elle montre que le mutant pour la signalisation ET *ein2* est plus sensible que le WT, tandis que les mutants perturbés dans la voie de synthèse du JA (*def1*) et de l'ABA (*sitiens*) sont plus résistants. D'autre part, et d'une manière plus générale, l'influence de la nutrition azotée sur la signalisation hormonale en cas de stress biotique n'est pas totalement comprise, et a été peu étudiée (Zarattini *et al.* 2021). Dans les chapitres précédents, il a été montré que l'infection par *B. cinerea* provoquait, par rapport aux plantes *mocks*, une augmentation du diamètre et de la masse par unité de longueur des tiges. Ce résultat intéressant nous a conduit à doser, dans les tissus proximaux des lésions, les phytohormones, afin d'étudier si les profils observés pouvaient expliquer ces différences de croissance, et les différences de sensibilité au champignon. Ce court chapitre propose une analyse de ces résultats préliminaires.

2. Matériel et méthodes

La même expérimentation que celle décrite dans les chapitres précédents a été utilisée ici, avec les mêmes échantillons. Les conditions expérimentales ne seront donc pas reprises ici. Les hormones ont été dosées à la plateforme analytique de l'observatoire du végétal à l'Institut Jean-Pierre Bourgin. Le protocole pour le dosage des hormones est le suivant :

Pour chaque échantillon, 5 mg de poudre lyophilisée ont été extraits avec 0.8 mL d'un mélange acétone / eau / acide acétique (80 / 19 / 1 ; v / v / v). Des isotopes marqués stables de l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'acide indole-3-acétique et des cytokinines (isopentenyl-adénosine, isopentenyl-adénosine-monophosphate, zeatine-7-glucoside, zeatine-9-glucoside, zeatine-O-glucoside, zeatine-riboside et zeatine-riboside-monophosphate) ont été utilisés comme standards internes et préparés selon Le Roux *et al.* (2014). 1 ng de standard de chaque composé nommé ci-dessus et 0.5 ng de cytokinines ont été ajoutés à l'échantillon. L'extrait a été remué pendant 10 minutes à 10°C dans un Thermomixer (Eppendorf®), puis centrifugé (8000g, 10 °C, 10 min.). Les surnageants ont été récupérés et les culots ont été re-extraits deux fois avec 0.4 mL de la solution d'extraction, puis vigoureusement agités pendant 1 min et passés en sonication pendant 1 min à 25 Hz. Après centrifugation, les trois surnageants ont été mélangés et séchés (volume final 1.6 mL).

Chaque extrait sec a été dissous dans 100 µL d'un mélange acetonitrile / eau (50 / 50 ; v / v), filtré et analysé avec une UPLC Waters Acquity couplée à un spectromètre de masse Waters Xevo Triple quadrupole TQS (UPLC-ESI-MS/MS). Les composés ont été séparés dans une colonne à phase inverse (Uptisphere C18 UP3HDO, 100 x 2.1 mm x 3 µm; Interchim, France) à un débit de 0.4 mL.min⁻¹ avec un gradient binaire : (A) eau avec 0.1 % d'acide acétique (v / v) et (B) acetonitrile avec 0.1 % d'acide acétique (v / v), et une température de colonne de 40 °C. Pour l'ABA, SA, JA, IAA les gradients binaires suivants ont été utilisés (temps, % A): (0 min., 98 %), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %), (9.6 min., 0%), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %), et pour les CKs (temps, % A): (0 min., 95 %), (13 min., 40 %), (16 min., 0 %), (16.5 min., 95 %). L'ionisation a été effectuée par une source électrospray et l'acquisition en mode MRM (*multiple reactions monitoring*), en mode positif pour l'IAA et en mode négatif pour les autres molécules. Les paramètres suivants ont été utilisés: tension capillaire 1.5 kV (mode négatif), température de la source et des gaz de désolvatation respectivement de 130°C and 500°C. L'azote a été utilisé pour le balayage du cône et la désolvatation (150 L.h⁻¹ et 800 L.h⁻¹, respectivement), et l'argon a été utilisé comme gaz de collision à un flux de 0.18 mL.min⁻¹.

Un test préliminaire a été fait sur 10 mg d'un pool d'échantillons pour détecter des gibbérellines. Aucune des molécules recherchées (GA1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 19, 20, 23, 24, 29, 34, 44, 51 et 53) n'a été détectée.

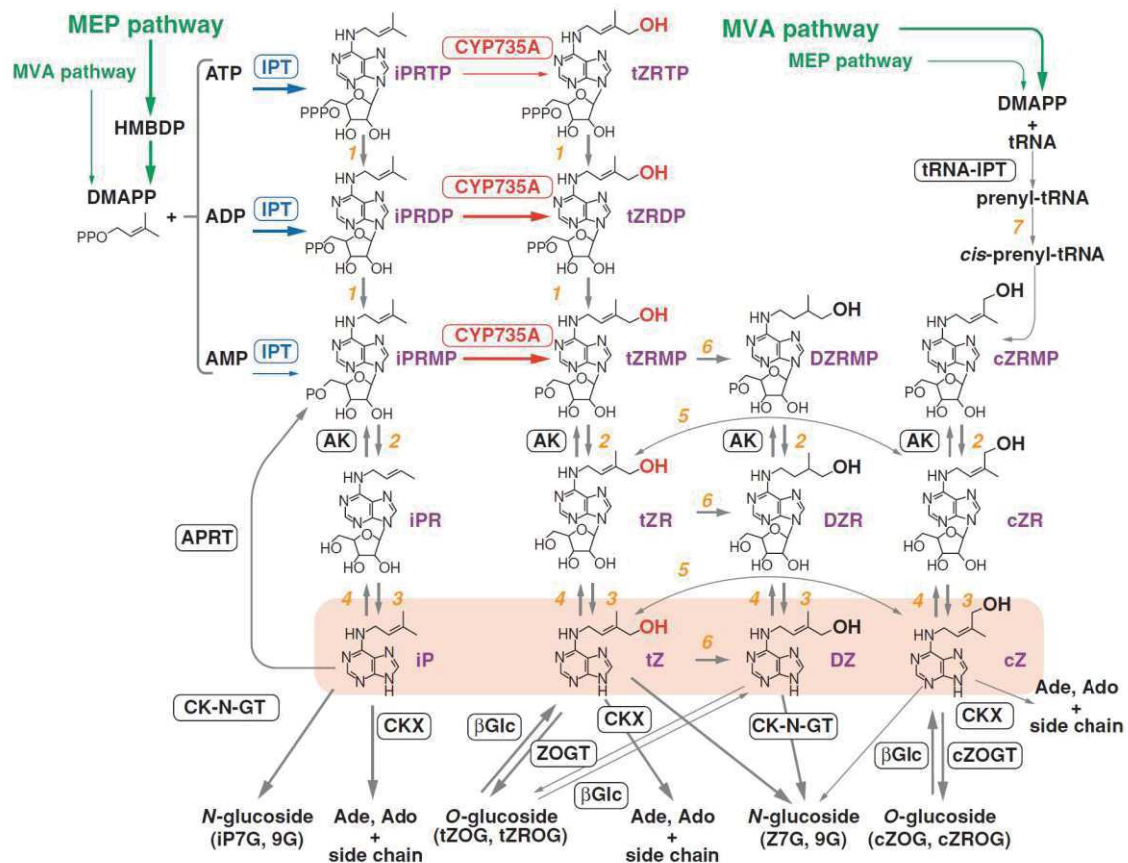


Figure VI.1 : Voies de biosynthèse des cytokinines isoprénoïdes.

Les CKs sont formées à partir de la liaison d'AMP, ADP ou ATP à un diméthylallyl-diphosphate sous l'action d'isopentényl-transférases (IPT), pour former des isopentényladénosines (iPRTP, iPRDP, iPRMP, iPR). L'iPR est transformé en forme active, isopentényl-adénine (iP), par des adenosine nucleosidases. Les CK-nucléotides sont hydroxylés en trans-zeatine-nucléotides par CYP735A, pour donner les formes actives, trans-zeatine (tZ) et dihydro-zeatine (DZ). D'après Sakakibara (2006), reproduit sous licence de Annual Reviews of Plant Biology.

3. Résultats

Dans aucun des échantillons le JA ou le JA-Ile n'a été mesuré au-dessus du seuil de détection. Concernant les autres hormones CKs, IAA et SA les mesures ont été pour certains échantillons en dessous du seuil de quantification, et la concentration n'a pas été calculée pour ces échantillons. Pour la clarté de la présentation des résultats et à des fins d'analyses statistiques avec un échantillon complet pour la comparaison entre les plantes inoculées sans pathogènes (*mocks*) et inoculées avec *B. cinerea* (plantes infectées), certains résultats sont donnés en semi-quantitatif à partir de l'aire de pics avec une unité arbitraire normalisée par la masse sèche. Autrement les concentrations sont présentées en ng.gMF^{-1} (masse fraîche).

3.1. Les niveaux d'hormones avant inoculation traduisent le gradient de nutrition azotée

Parmi les CKs, précurseurs de composés actifs ou dérivés conjugués, les composés suivants ont été détectés : isopentenyl-adénosine (iPR), isopentenyl-adénosine-monophosphate (iPRMP), zeatine-7-glucoside (Z7G), zeatine-9-glucoside (Z9G), zeatine-O-glucoside (ZoG), zeatine-riboside (ZR) et zeatine-riboside-monophosphate (ZRMP). Les principales molécules responsables de la signalisation CK sont l'isopentenyl-adénine (iP), la trans-zéatine (tZ) et la cis-zéatine (cZ) (Sakakibara 2006, Figure VI.1). Les CKs totales ont été calculées comme la somme de l'ensemble des composés dosés.

Les concentrations d'hormones avant inoculation sont données dans la Figure VI.2. Les CKs et l'auxine ont augmenté avec le niveau d'azote, avec cependant de faibles différences quantitatives entre les niveaux. La concentration en SA était en revanche plus élevée à 0.5 mM de NO_3^- et décroissante avec l'augmentation de la disponibilité en azote. Pour l'ABA, les comparaisons de moyennes indiquent des différences significatives entre les niveaux 0.5, 10 et 20 mM de NO_3^- d'une part, et 2 et 5 mM de NO_3^- d'autre part, mais les écarts sont quantitativement faibles.

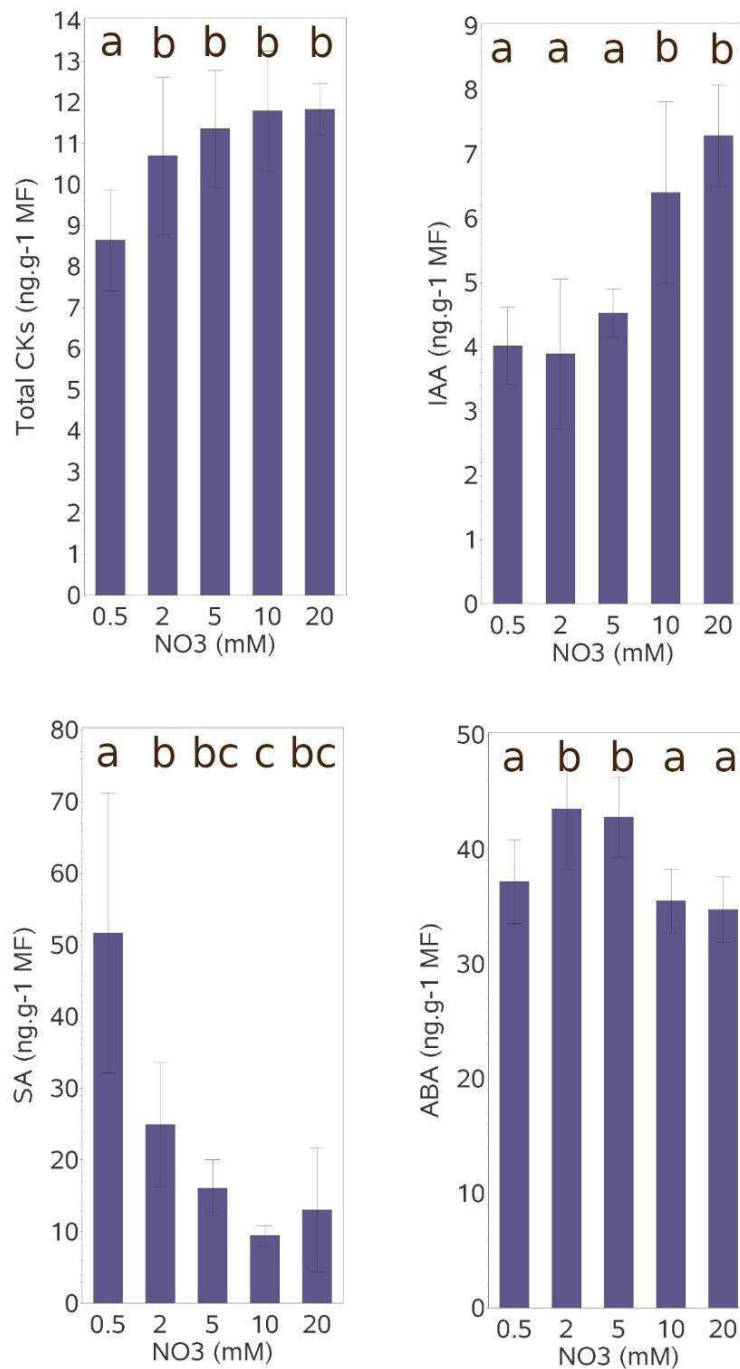


Figure VI.2 : Concentrations en CKs totales, IAA, SA et ABA, mesurées avant inoculation.

Les barres correspondent à la moyenne (\pm l'écart-type) de 4 ou 5 échantillons. Les lettres indiquent des groupes significativement différents selon un test de Newman-Keuls à 5 %.

3.2. L'infection par *B. cinerea* modifie profondément les profils hormonaux des tissus asymptomatiques proximaux

L'inoculation du champignon et le développement infectieux qui en résulte engendre une modification de toutes les hormones mesurées, avec cependant des cinétiques d'évolution et des effets de l'azote contrastés (Figure VI.3). L'auxine diminue significativement à tous les niveaux d'azote chez les plantes infectées par rapport aux plantes *mocks*, entre 2 et 4 jours après inoculation (dpi, *days post-inoculation*). Quatre jours après inoculation (4 dpi), le niveau d'IAA chez les plantes infectées représente 40%, 38%, 23%, 72% et 75% de celui des plantes *mocks*, respectivement de 0.5 à 20 mM de NO_3^- . Sept dpi, ce pourcentage comparatif croît régulièrement de 27% à 58% avec le niveau d'azote. L'ABA diminue chez les plantes infectées dès 2 dpi, mais uniquement aux bas niveaux d'azote, jusqu'à 5 mM de NO_3^- . Cette différence s'estompe entre 2 et 4 dpi à 2 mM de NO_3^- et entre 4 et 7 dpi à 5 mM de NO_3^- , mais reste significative à 7 dpi à 0.5 mM de NO_3^- . Les niveaux de SA ne sont pas différents entre les plantes infectées et les plantes *mocks* jusqu'à 7 dpi, où le niveau de SA augmente chez les plantes infectées aux bas niveaux d'azote, la différence n'étant significative qu'à 0.5 mM de NO_3^- . Chez les plantes *mocks*, les niveaux mesurés entre 2 et 7 dpi restent comparables à ceux observés à 0 dpi, avec un fort effet du traitement azoté, et une tendance à la baisse au cours du temps pour l'ABA et l'IAA, possiblement consécutive à l'incubation des plantes en chambres de culture.

Concernant les CKs, l'observation des quantités totales (valeurs semi-quantitatives) laisse apparaître peu de différences entre les plantes *mocks* et les plantes infectées, même si l'on observe une légère baisse chez les plantes infectées 4 dpi pour les niveaux 2 et 5 mM de NO_3^- . La quantification des molécules individuelles donne un aperçu plus précis (Table VI.1). La molécule dont la concentration est la plus élevée est la zeatine-O-glucoside (ZOG), pour laquelle la conjugaison avec la forme active trans-zeatine est considérée comme réversible (Figure VI.1, Sakakibara 2006). Les autres molécules ont des concentrations 5 à 100 fois plus faibles. Les principales différences entre les plantes *mocks* et infectées portent sur les précurseurs de l'iP, iPR et iPRMP, dont les niveaux sont systématiquement plus faibles dès 2 dpi chez les plantes infectées, et sur la Z9G, dont la concentration augmente faiblement au cours du temps chez les plantes *mocks*, et très fortement chez les plantes infectées, à tous les

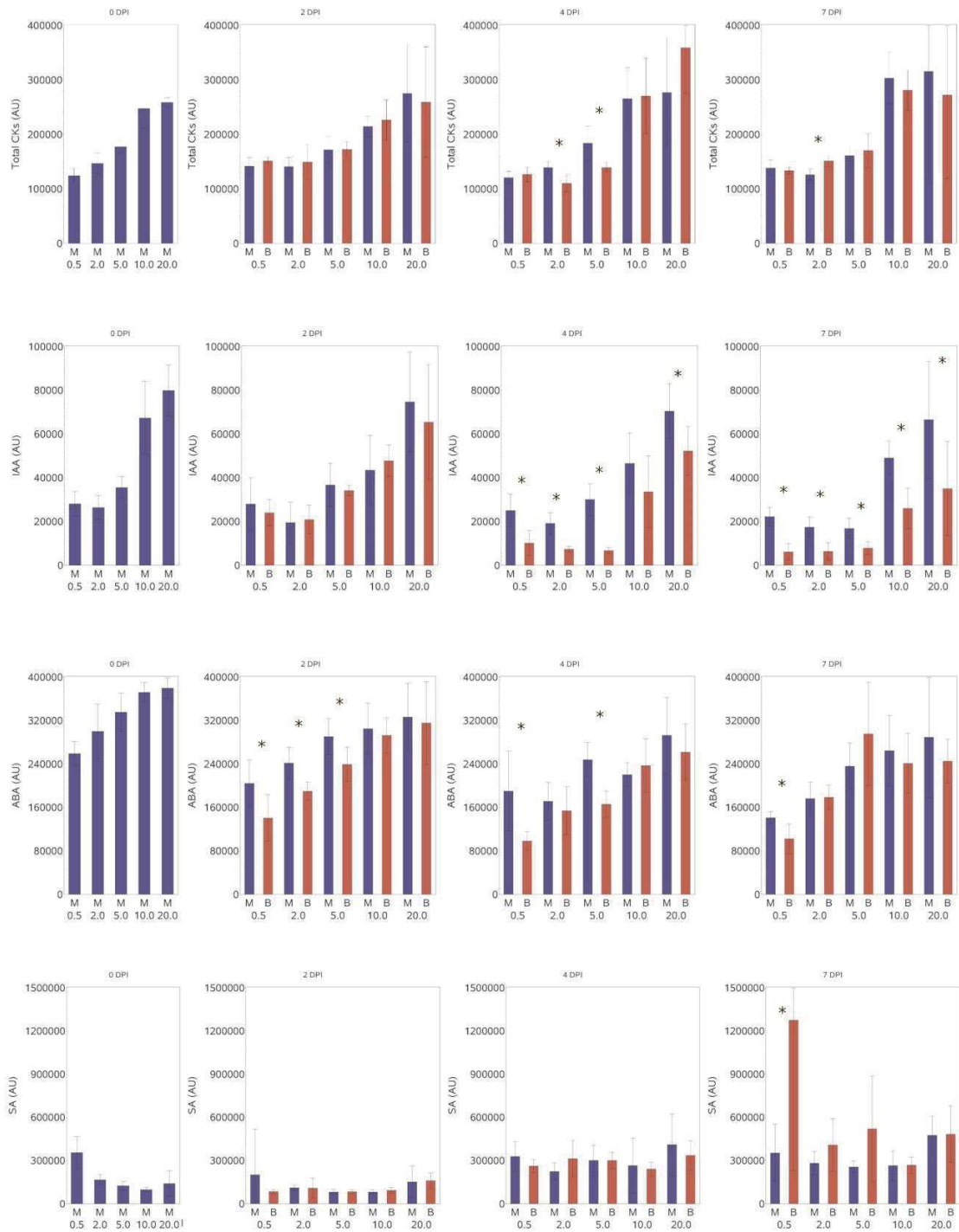


Figure VI.3 : Comparaison des niveaux d’hormones entre les traitements

Les niveaux semi-quantitatifs (rapportés à la matière sèche) de CKs, IAA, ABA et SA sont comparés entre les plantes *mocks* (M) et inoculées avec *B. cinerea* (B), par niveau d’azote, aux différentes dates de mesures. Les astérisques indiquent des différences significatives à 5 % dans les comparaisons M-B deux à deux, avec un test de Newman-Keuls. DPI : jours après infections.

niveaux d'azote. L'augmentation est cependant plus marquée aux niveaux d'azote élevés (10 et 20 mM de NO_3^-).

3.3. Le niveau d'ABA après infection est corrélé négativement à l'intensité des symptômes

Que ce soit pour les composants du métabolisme primaire et secondaire ou les hormones, et parce que les traitements azotés influencent fortement les niveaux de symptômes, l'identification d'une molécule non constitutivement associée au développement de ces symptômes suppose (1) que ses concentrations diffèrent entre les niveaux d'azote et (2) que l'évolution des concentrations après infection diffère entre les plantes *mocks* et les plantes infectées, et ce de manière différente entre les niveaux d'azote. Parmi les cinétiques d'évolutions hormonales observées, l'ABA montre ce type de profil. De fait, la concentration en ABA est linéairement associée à l'évolution de la maladie (mesurée par l'AUDPC, *area under the disease progression curve*) 2 dpi ($r^2 = 0.8$, données non montrées) et à 4 dpi ($r^2 = 0.91$, Figure VI.4). Cette corrélation est significative uniquement pour les plantes infectées, et non pour les plantes *mocks*, indiquant que c'est bien l'interaction entre le niveau d'azote et l'infection qui est responsable de cette réponse, et non le niveau d'azote seul.

4. Discussion

L'observation d'une croissance en diamètre accrue chez les tiges des plantes infectées à bas niveau d'azote en comparaison avec les plantes *mocks*, ainsi que le rôle central joué par la signalisation hormonale pour réguler la croissance et déclencher des réactions de défense suite à une infection par un agent pathogène, nous ont conduits à mesurer les profils hormonaux dans les échantillons de tissus de tiges avant infection ainsi que dans les tissus proximaux des lésions provoquées par l'inoculation de *B. cinerea*. La quantification des hormones par des approches de métabolomique peut s'avérer importante pour la compréhension des interactions biotiques (Allwood *et al.* 2021). Il n'y a encore que peu de travaux montrant des profils hormonaux dans le cadre d'interactions de stress biotiques et abiotiques, une étude pionnière a porté sur l'effet combiné du stress hydrique et de l'infection par *Pseudomonas syringae* chez *Arabidopsis* en 2017 (Gupta *et al.* 2017). A notre connaissance, aucune observation de profils hormonaux n'a été faite sur tiges de tomate en

	ZRMP				ZR			
	JO	J2	J4	J7	JO	J2	J4	J7
N1	Botrytis							
	mock	0.5					0.2	
N2	Botrytis		0.6					0.6
	mock	1.5	0.8		0.4	0.4	0.4	
N3	Botrytis		1.5	0.7				0.3
	mock	2.2	1.5	0.7	0.7	0.5	0.7	0.3
N4	Botrytis		2.7	1.6	1.4			1.3
	mock	3.1	2.2	1.6	1.3	1.1	1.0	1.7
N5	Botrytis		3.5	2.4	2.9			3.3
	mock	3.2	3.1	2.3	2.7	1.1	1.1	2.1

	iPRMP				iPR			
	JO	J2	J4	J7	JO	J2	J4	J7
N1	Botrytis		0.2			0.18		
	mock	0.3	0.3			0.2	0.2	0.2
N2	Botrytis		0.5	0.3		0.2	0.3	0.3
	mock	0.9	0.7	0.5	0.5	0.3	0.2	0.4
N3	Botrytis		0.5	0.3	0.4			0.4
	mock	1.0	0.8	0.7	0.5	0.3	0.3	1.0
N4	Botrytis		0.5	0.5	0.3			0.3
	mock	0.8	0.6	0.6	0.7	0.3	0.3	0.8
N5	Botrytis		0.6	0.4	0.3			0.5
	mock	0.7	0.9	0.7	0.7	0.3	0.3	1.5

	ZOG				ZTG				Z9G			
	JO	J2	J4	J7	JO	J2	J4	J7	JO	J2	J4	J7
N1	Botrytis		10.3	28.9	30.2							
	mock	8.0	8.1	25.8	28.5	0.4	0.4	0.5	0.7		0.7	0.7
N2	Botrytis		8.7	41.3	31.8							0.9
	mock	6.8	7.4	34.2	36.2	0.9	1.0	1.3	1.2		1.0	0.5
N3	Botrytis		6.6	31.8	27.7							1.3
	mock	5.8	6.0	29.3	28.2	1.3	1.5	2.1	1.8		0.4	0.3
N4	Botrytis		4.8	21.8	16.7							1.6
	mock	4.4	4.6	20.1	16.6	2.0	2.2	2.8	3.4		0.6	0.4
N5	Botrytis		5.4	17.2	22.6							1.6
	mock	4.3	5.1	22.6	23.4	2.2	2.7	3.2	3.6		0.3	0.4

Table VI.1 : Concentrations (ng.gMF⁻¹) des différentes cytokinines mesurées avant et après l'inoculation.

Les moyennes significativement différentes (test de Newman-Keuls à 5%) entre les plantes *mocks* et inoculées avec *B. cinerea* (Botrytis) sont indiquées en gras souligné. Les valeurs inférieures au seuil de quantification n'ont pas été prises en compte, aussi le nombre d'observations par traitement (niveau d'azote x inoculation x jour) peut varier entre 1 et 5 selon les cas.

réponse à la disponibilité en azote et à *B. cinerea*. Des quantifications d'IAA et de GAs ont été faites sur des hypocotyles et des épicotyles de tomate à différentes températures (Ohtaka *et al.* 2020). Les GAs 4, 9, 15, 19, 24, 44 et 53 ont été dosées, indiquant que les méthodes analytiques utilisées dans notre étude pourraient être améliorées pour quantifier les gibbérellines. Les niveaux d'IAA rapportés dans ces travaux sur les plantules, entre 150 et 250 pmol.gMF⁻¹, soit 26 à 44 ng.gMF⁻¹, sont supérieurs mais du même ordre de grandeur que ceux mesurés ici : 1 à 10 ng.gMF⁻¹. Sur feuilles de tomate, des niveaux basaux de SA ont été rapportés à 100 ng.gMF⁻¹ (El Oirdi *et al.* 2011), 30 – 70 ng.gMF⁻¹ (Ding *et al.* 2021), 2400 ng.gMS⁻¹ (soit environ 10 fois moins en MF) (Torres-Vera *et al.* 2014), et de 125 à 300 ng.gMF⁻¹ en fonction des cultivars après infection par *B. cinerea* (Angulo *et al.* 2015). Pour l'ABA, des concentrations de 350 à 660 ng.gMF⁻¹ ont été mesurées dans des feuilles de plantes infectées ou non avec *B. cinerea* (Achuo *et al.* 2004; Angulo *et al.* 2015). Collectivement, ces données montrent que les concentrations basales de SA et ABA mesurées dans ce travail sur des échantillons de tige sont plus faibles que celles rencontrées dans les feuilles. Les niveaux de CKs mesurés sont en revanche du même ordre de grandeur que ceux rapportés sur feuilles d'*Arabidopsis* (Li *et al.* 2021) ou de tomate (Gupta *et al.* 2020).

L'augmentation, avec le niveau d'azote, des concentrations des hormones de croissance CKs et IAA avant inoculation est conforme aux réponses attendues. D'une part, les profils observés sont cohérents avec les gradients de croissance mesurés avant inoculation ; d'autre part, il a été rapporté que les niveaux de ces hormones, ou la transcription de leurs gènes de biosynthèse, répondaient à des différences de disponibilité en azote. Pour les CKs, dont une des fonctions est de moduler les équilibres de croissance entre parties aériennes et parties racinaires en fonction du contexte environnemental (Kieber and Schaller 2018), il a été montré un lien positif entre la disponibilité en nitrates et leur concentration (Samuelson and Larsson 1993). Les nitrates peuvent également réguler les gènes de leurs voies de biosynthèse (Takei *et al.* 2004). Concernant l'auxine, la transcription des gènes de son métabolisme et des gènes IAA-sensibles dépend du niveau des nitrates disponibles dans les feuilles (Comadira *et al.* 2015). Une baisse significative selon la disponibilité en azote du niveau de SA basal a été mesurée. Une diminution par deux de la concentration en SA basal a aussi été observée sur feuilles de tomate alimentées avec 7 mM de NO₃⁻ par rapport à 1 mM de NO₃⁻ (Ding *et al.* 2021).

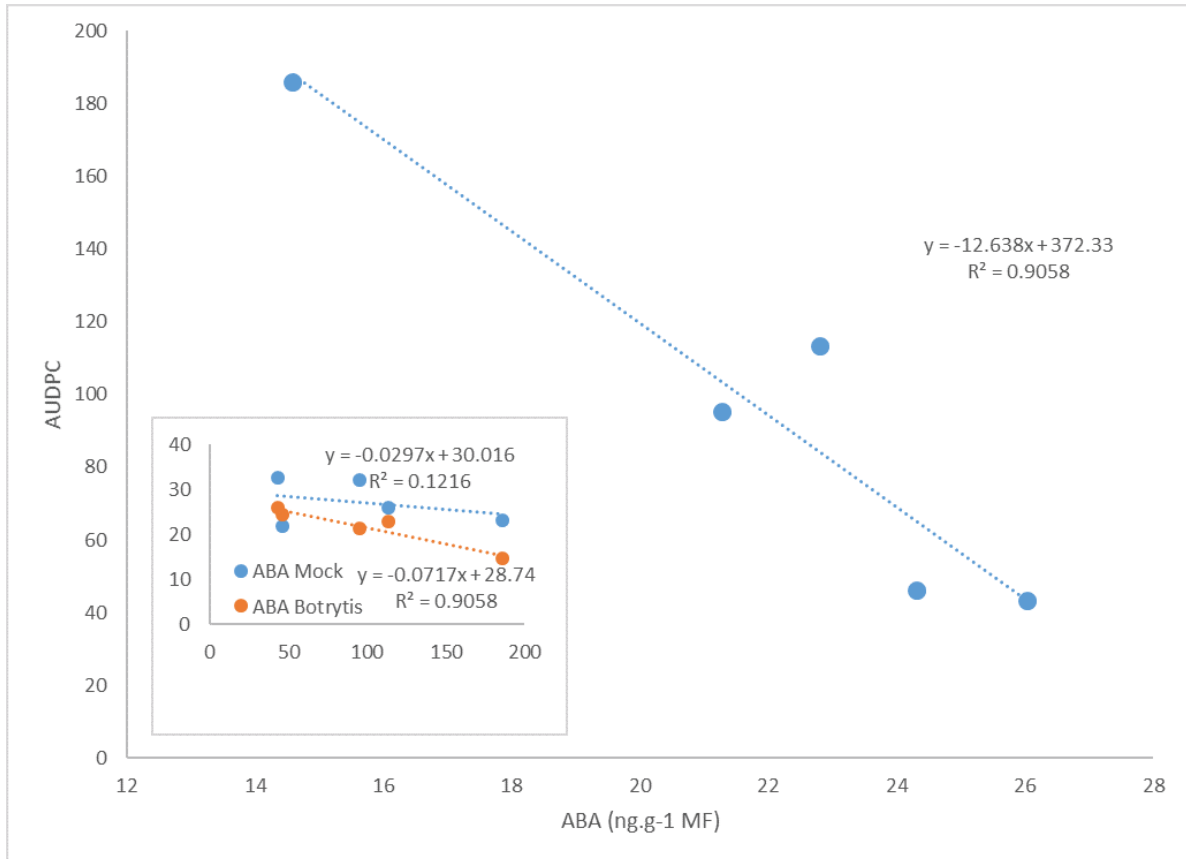


Figure VI.4 : Corrélation entre la concentration en ABA mesurée 4 dpi et l'AUDPC.

En encadré : les données comparées (AUDPC (en X) x ABA (en Y)) pour les plantes *mocks* (ABA Mock) et infectées (ABA Botrytis).

La comparaison entre plantes infectées et *mocks* montre une réponse de l'ensemble des hormones suite à l'infection par *B. cinerea*. Quatre modifications apparaissent clairement chez les plantes infectées : (1) la baisse de l'auxine à tous les niveaux d'azote, (2) la diminution des concentrations en iPR et iPRMP, (3) l'augmentation tardive de celle de Z9G, et (4), à bas niveau d'azote, la diminution rapide de la concentration d'ABA après infection ainsi que l'augmentation tardive de celle de SA. La baisse de la concentration en auxine chez les plantes infectées par *B. cinerea*, observée à tous les niveaux d'azote, est moins forte proportionnellement chez les plantes à 10 et 20 mM de NO_3^- . L'ajustement hormonal des tissus proximaux, indemnes de lésions, montre, comme cela a été observé avec les mesures d'autres métabolites, que la physiologie des tissus proximaux répond à l'infection. L'infiltration d'auxine concourt au développement de *B. cinerea* chez *Arabidopsis*, malgré une plus forte résistance des mutants pour sa conjugaison (González-Lamothe *et al.* 2012). Associé au fait que des mutants pour la synthèse ou la signalisation IAA sont plus sensibles (Llorente *et al.* 2008), on peut émettre l'hypothèse qu'une signalisation auxine permettant un ajustement à la baisse de sa concentration en cas d'infection est nécessaire à la défense contre *B. cinerea*. Cette hypothèse est compatible avec la tendance générale observée lors de nos travaux d'une orientation du métabolisme vers le maintien de l'homéostasie accompagné d'un surcroît d'investissement métabolique dans la génération de composés de défense, au détriment de la croissance.

Les formes actives de CKs n'ont pas été identifiées dans nos échantillons de tiges, mais la forme de réserve ZOG constitue, en concentration, le principal composant des CKs. L'infection par *B. cinerea* diminue significativement les précurseurs iPRMP et iPR, dès 2 dpi et jusqu'à 7 dpi. Une diminution d'iPR a été observée dans les deux autres études rapportant des concentrations en CKs suite à une infection par *B. cinerea*, sur des feuilles de tomate et d'*Arabidopsis* (Gupta *et al.* 2020; Li *et al.* 2021). L'accélération du turn-over des précurseurs des formes actives de CKs semble donc être importante dans la réponse de défense. Chez *Arabidopsis*, une synthèse accrue de cis-zeatine a été observée suite à l'infection par *B. cinerea* (Li *et al.* 2021). Les champignons nécrotrophes, dont *B. cinerea*, ne sont pas connus pour produire des cytokinines (Walters and McRoberts 2006). Dans nos travaux, nous montrons suite à l'infection une accumulation beaucoup plus importante de Z9G, forme conjuguée irréversible du catabolisme de la zeatine, à tous les niveaux d'azote. Un rôle

important, chez plusieurs espèces, des CKs dans la défense contre *Botrytis cinerea* semble donc se confirmer, mais l'explication fonctionnelle du rôle des CKs dans la défense reste à décrire.

A la différence des hormones liées à la croissance, celles dont les fonctions sont principalement associées à la réponse aux stress ont montré des évolutions différentes en fonction des niveaux d'azote. Les concentrations en ABA ont fortement diminué dans les tissus des plantes sensibles entre 0.5 et 5 mM de NO_3^- dès 2 dpi et jusqu'à 7 dpi pour les plantes les moins résistantes (0.5 mM de NO_3^-). Un ajustement linéaire entre la concentration en ABA et la sensibilité des tissus au cours de l'infection est établi et, parmi les hormones mesurées, seul l'ajustement d'ABA post-infection peut être mis en relation avec l'intensité de la maladie. Les travaux concernant le rôle de l'ABA contre les nécrotrophes *A. brassicicola*, *P. cucumerina*, *S. Sclerotiorum*, vont dans le sens d'un lien positif entre la signalisation ABA et la défense, sauf ceux concernant *B. cinerea* pour lesquels une régulation négative de l'ABA défendrait les tissus. Des démonstrations expérimentales basées sur des ajouts d'ABA externe ou de mutants déficients ABA montrent des résistances accrues des feuilles de plantes déficientes en ABA, cependant le rôle causal de l'ABA n'est pas établi (Anderson *et al.* 2004; Achuo *et al.* 2006; Adie *et al.* 2007; Liu *et al.* 2015; Cui *et al.* 2019). Ici les résultats sur des plantes non modifiées, dont la sensibilité est uniquement contrastée par l'environnement abiotique, montrent qu'une baisse de la concentration en ABA est associée à une moindre résistance. Les précédents travaux de notre laboratoire, dans une étude sur tiges de tomate soumises à du stress hydrique, ont montré qu'une accumulation précoce d'ABA dans des tiges de tomates non soumises au stress hydrique était favorable à la défense (Lecompte *et al.* 2017).

Le SA varie peu au cours de l'infection des tiges, sauf 7 dpi où il augmente chez les plantes sensibles, en particulier celles conduites à 0.5 mM de NO_3^- qui permettent la plus grande progression de la maladie. Les preuves expérimentales d'une signalisation SA efficace pour la défense des tissus infectés par *B. cinerea* sont indirectes et ne permettent pas de conclure définitivement (De Meyer *et al.* 1998; Murphy *et al.* 2000; Zimmerli *et al.* 2001; Audenaert *et al.* 2002; Ferrari *et al.* 2003, 2007; AbuQamar *et al.* 2006; Achuo *et al.* 2006; Harel *et al.* 2014; Mehari *et al.* 2015; Yuan *et al.* 2017; Gupta *et al.* 2020). Dans nos travaux, l'accumulation de SA inversement proportionnelle à la résistance des plantes conforte l'hypothèse d'un rôle négatif pour la défense, potentiellement manipulé par les effecteurs du

champignon (El Oirdi *et al.* 2011). Nous n'avons cependant pas vérifié si la souche utilisée dans les expériences possède l'exopolysaccharide capable de stimuler la voie SA chez l'hôte.

Les dosages réalisés dans nos travaux n'ont pas permis de quantifier le JA ou son dérivé actif JA-Ile. Une forte résistance contre *B. cinerea* des tissus locaux ayant subi une blessure a été démontrée sur Arabidopsis et poivron, non nécessairement associée à la voie JA (Chassot *et al.* 2008; García *et al.* 2015). Sur tige de tomate, la notion de tissu proximal de la lésion peut être discutée dans notre approche, le requis expérimental dans nos travaux étant de mesurer des tissus sans présence d'acides nucléiques fongiques. Des analyses complémentaires réalisées à la plateforme d'Avignon ont été faites, permettant de quantifier le JA dans un sous-échantillon des essais. Le JA est, même après induction, généralement en concentration inférieure au SA ou à l'ABA (El Oirdi *et al.* 2011; Angulo *et al.* 2015; Gupta *et al.* 2017). En conséquence, une méthode d'extraction et de dosage du JA sur tige de tomate dans les conditions de nos essais reste à réaliser. Le rôle de l'azote dans la voie JA-dépendante a reçu un éclairage récent avec des travaux montrant chez Arabidopsis une plus forte sensibilité à *B. cinerea* à fort apport de nitrates, accompagnée d'une plus faible expression du marqueur de la voie des ERF PDF1.2 (Soulie *et al.* 2020; Zarattini *et al.* 2021). Ces travaux s'opposent à des résultats sur feuilles de tabac, qui montrent une augmentation de la concentration en JA avec la fertilisation azotée (Lou and Baldwin 2004; Xu *et al.* 2019). Ces résultats contradictoires n'excluent pas des différences importantes de signalisation en réponse à l'environnement, non seulement entre les espèces mais aussi entre les organes.

En conclusion nos résultats montrent l'adaptation du compromis croissance-défense sur tige avec, suite à l'infection par *B. cinerea* une forte baisse de la concentration en auxine dans toutes les conditions de sensibilité. Une baisse des précurseurs des cytokinines associée à une hausse des dérivés des formes actives renforce la présomption du rôle des CKs pour la défense chez la tomate. Une diminution d'ABA, chez les plantes sensibles uniquement, tend à renforcer le rôle positif de la signalisation ABA chez les nécrotrophes, y compris *B. cinerea*.

Références

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003.** Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63–78.
- AbuQamar S, Chai MF, Luo H, Song F, Mengiste T. 2008.** Tomato protein kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell* **20**: 1964–1983.
- AbuQamar S, Chen X, Dhawan R, et al. 2006.** Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection. *Plant Journal* **48**: 28–44.
- Achuo EA, Audenaert K, Meziane H, Höfte M. 2004.** The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology* **53**: 65–72.
- Achuo EA, Prinsen E, Hofte M. 2006.** Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to Botrytis cinerea and Oidium neolycopersici. *Plant Pathol* **55**: 178–186.
- Adie BAT, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, et al. 2007.** ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1665–1681.
- Aerts N, Pereira Mendes M, Van Wees SCM. 2021.** Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense. *Plant Journal* **105**: 489–504.
- Albrecht T, Argueso CT. 2017.** Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth-defence trade-off. *Annals of Botany* **119**: 725–735.
- Aleman F, Yazaki J, Lee M, et al. 2016.** An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 Transcription Factor: A putative link of ABA and JA signaling. *Scientific Reports* **6**: 1–7.
- Allwood JW, Williams A, Uthe H, et al. 2021.** Unravelling plant responses to stress—the importance of targeted and untargeted metabolomics. *Metabolites* **11**.
- Anderson JP, Badruzaufari E, Schenk PM, et al. 2004.** Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3460–3479.
- Angulo C, Leyva M de la O, Finiti I, et al. 2015.** Role of dioxygenase α -DOX2 and SA in basal response and in hexanoic acid-induced resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants against Botrytis cinerea. *Journal of Plant Physiology* **175**: 163–173.
- Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM. 2002.** Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to Botrytis cinerea and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**: 491–501.
- Benjamins R, Scheres B. 2008.** Auxin: The looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 443–465.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R. 2002.** Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal* **29**: 23–32.
- Beyers T, Vos C, Aerts R, et al. 2014.** Resistance against Botrytis cinerea in smooth leaf pruning wounds of tomato does not depend on major disease signalling pathways. *Plant Pathology* **63**: 165–173.
- Campos ML, Yoshida Y, Major IT, et al. 2016.** Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defence tradeoffs. *Nature Communications* **7**.
- Cerrudo I, Keller MM, Cargnel MD, et al. 2012.** Low red/far-red ratios reduce Arabidopsis resistance to Botrytis cinerea and jasmonate responses via a COI1-JAZ10-dependent, salicylic acid-independent mechanism. *Plant Physiology* **158**: 2042–2052.
- Chassot C, Buchala A, Schoonbeek HJ, Métraux JP, Lamotte O. 2008.** Wounding of Arabidopsis leaves causes a powerful but transient protection against Botrytis infection. *Plant Journal* **55**: 555–567.
- Chen K, Li GJ, Bressan RA, Song CP, Zhu JK, Zhao Y. 2020.** Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **62**: 25–54.
- Comadira G, Rasool B, Karpinska B, et al. 2015.** Nitrogen deficiency in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induces molecular and metabolic adjustments that trigger aphid resistance. *Journal of Experimental Botany* **66**: 3639–3655.
- Coolen S, Proietti S, Hickman R, et al. 2016.** Transcriptome dynamics of Arabidopsis during sequential biotic and abiotic stresses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **86**: 249–267.
- Courbier S, Grevink S, Sluijs E, et al. 2020.** Far-red light promotes Botrytis cinerea disease development in tomato leaves via jasmonate-dependent modulation of soluble sugars. *Plant Cell and Environment* **43**: 2769–2781.

- Cui F, Wu W, Wang K, et al. 2019.** Cell death regulation but not abscisic acid signaling is required for enhanced immunity to *Botrytis* in *Arabidopsis* cuticle-permeable mutants. *Journal of Experimental Botany* **70**: 5971–5984.
- Díaz J, Ten Have A, Van Kan JAL. 2002.** The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **129**: 1341–1351.
- Dieryckx C, Gaudin V, Dupuy JW, Bonneau M, Girard V, Job D. 2015.** Beyond plant defense: Insights on the potential of salicylic and methylsalicylic acid to contain growth of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Ding S, Shao X, Li J, et al. 2021.** Nitrogen forms and metabolism affect plant defence to foliar and root pathogens in tomato. *Plant Cell and Environment* **44**: 1596–1610.
- Du M, Zhao J, Tzeng DTW, et al. 2017.** MYC2 orchestrates a hierarchical transcriptional cascade that regulates jasmonate-mediated plant immunity in tomato. *Plant Cell* **29**: 1883–1906.
- Fàbregas N, Fernie AR. 2022.** The reliance of phytohormone biosynthesis on primary metabolite precursors. *Journal of Plant Physiology* **268**.
- Fan J, Hill L, Crooks C, Doerner P, Lamb C. 2009.** Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* **150**: 1750–1761.
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, et al. 2011.** The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701–715.
- Ferrari S, Galletti R, Denoux C, De Lorenzo G, Ausubel FM, Dewdney J. 2007.** Resistance to *Botrytis cinerea* Induced in *Arabidopsis* by Elicitors Is Independent of Salicylic Acid, Ethylene, or Jasmonate Signaling But Requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *PLANT PHYSIOLOGY* **144**: 367–379.
- Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM. 2003.** *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal* **35**: 193–205.
- Flors V, Ton J, Van Doorn R, Jakab G, García-Agustín P, Mauch-Mani B. 2007.** Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* **54**: 81–92.
- García T, Gutiérrez J, Veloso J, Gago-Fuentes R, Díaz J. 2015.** Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *Journal of Plant Physiology* **176**: 202–209.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- González-Lamothe R, El Oirdi M, Brisson N, Bouarab K. 2012.** The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell* **24**: 672–777.
- Govrin EM, Levine A. 2002.** Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant Molecular Biology* **48**: 267–276.
- Gupta A, Hisano H, Hojo Y, et al. 2017.** Global profiling of phytohormone dynamics during combined drought and pathogen stress in *Arabidopsis thaliana* reveals ABA and JA as major regulators. *Scientific Reports* **7**: 1–13.
- Gupta R, Pizarro L, Leibman-Markus M, Marash I, Bar M. 2020.** Cytokinin response induces immunity and fungal pathogen resistance, and modulates trafficking of the PRR LeEIX2 in tomato. *Molecular Plant Pathology* **21**: 1287–1306.
- Harel YM, Mehari ZH, Rav-David D, Elad Y. 2014.** Systemic Resistance to Gray Mold Induced in Tomato by Benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* T39. *Phytopathology* **104**: 150–157.
- Havko NE, Major IT, Jewell JB, Attaran E, Browse J, Howe GA. 2016.** Control of carbon assimilation and partitioning by jasmonate: An accounting of growth–defense tradeoffs. *Plants* **5**: 41–66.
- Heinrich M, Hettenhausen C, Lange T, et al. 2013.** High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant Journal* **73**: 591–606.
- Hentrich M, Böttcher C, Dücking P, et al. 2013.** The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. *Plant Journal* **74**: 626–637.
- Hickman R, Van Verk MC, Van Dijken AJH, et al. 2017.** Architecture and dynamics of the jasmonic acid gene regulatory network. *Plant Cell* **29**: 2086–2105.
- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yan Y, Yu H. 2010.** DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Developmental Cell* **19**: 884–894.
- Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. 2014.** Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant* **7**: 1267–1287.
- Jiang CJ, Shimono M, Sugano S, et al. 2010.** Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-magnaporthe grisea interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 791–798.

- Kieber JJ, Schaller GE. 2018.** Cytokinin signaling in plant development. *Development* **145**: 1–7.
- Kliebenstein DJ. 2016.** False idolatry of the mythical growth versus immunity tradeoff in molecular systems plant pathology. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **95**: 55–59.
- Kunkel BN, Brooks DM. 2002.** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325–331.
- Lecompte F, Nicot PC, Ripoll J, et al. 2017.** Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Annals of Botany* **119**: 931–943.
- Li B, Wang R, Wang S, Zhang J, Chang L. 2021.** Diversified Regulation of Cytokinin Levels and Signaling During *Botrytis cinerea* Infection in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **12**: 1–14.
- Liu Y, Du M, Deng L, et al. 2019.** MYC2 Regulates the Termination of Jasmonate Signaling via an Autoregulatory Negative Feedback Loop. *The Plant Cell* **31**: 106–127.
- Liu S, Kracher B, Ziegler J, Birkenbihl RP, Somssich IE. 2015.** Negative regulation of ABA Signaling By WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards *Botrytis cinerea* 2100. *eLife* **4**: 1–27.
- Llorente F, Muskett P, Sánchez-Vallet A, et al. 2008.** Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Molecular Plant* **1**: 496–509.
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2004.** JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1938–1950.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2003.** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165–178.
- Lou Y, Baldwin IT. 2004.** Nitrogen supply influences herbivore-induced direct and indirect defenses and transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **135**: 496–506.
- Mehari ZH, Elad Y, Rav-David D, Graber ER, Meller Harel Y. 2015.** Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. *Plant and Soil* **395**: 31–44.
- De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, Höfte M. 1998.** Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 279–286.
- Murphy AM, Holcombe LJ, Carr JP. 2000.** Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**: 47–54.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. 2006.** A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* **312**: 436–439.
- Ohtaka K, Yoshida A, Kakei Y, et al. 2020.** Difference Between Day and Night Temperatures Affects Stem Elongation in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Seedlings via Regulation of Gibberellin and Auxin Synthesis. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–12.
- El Oirdi M, El Rahman TA, Rigano L, et al. 2011.** *Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato. *The Plant Cell* **23**: 2405–2421.
- Percepied L, Balagué C, Riou C, et al. 2010.** Nitric Oxide Participates in the Complex Interplay of Defense-Related Signaling Pathways Controlling Disease Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 846–860.
- Pham J, Liu J, Bennett MH, Mansfield JW, Desikan R. 2012.** Arabidopsis histidine kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection. *New Phytologist* **194**: 168–180.
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012.** Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521.
- Proietti S, Caarls L, Coolen S, Van Pelt JA, Van Wees SCM, Pieterse CMJ. 2018.** Genome-wide association study reveals novel players in defense hormone crosstalk in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment* **41**: 2342–2356.
- Qi L, Yan J, Li Y, et al. 2012.** Arabidopsis thaliana plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. *New Phytologist* **195**: 872–882.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. 2011.** Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 317–343.
- Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, et al. 2011.** The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant Journal* **67**: 218–231.
- Le Roux C, Del Prete S, Boutet-Mercey S, et al. 2014.** The hnRNP-Q protein LIF2 participates in the plant immune response. *PLoS ONE* **9**.
- Rowe HC, Walley JW, Corwin J, Chan EKF, Dehesh K, Kliebenstein DJ. 2010.** Deficiencies in jasmonate-mediated plant defense reveal quantitative variation

- in *Botrytis cinerea* pathogenesis. *PLoS Pathogens* **6**: 1–18.
- Sakakibara H. 2006.** Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 431–449.
- Samuelson ME, Larsson C. 1993.** Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Science* **93**: 77–84.
- Sánchez-Vallet A, López G, Ramos B, et al. 2012.** Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates Arabidopsis resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiology* **160**: 2109–2124.
- Shigenaga AM, Argueso CT. 2016.** No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **56**: 174–189.
- Soulie MC, Koka SM, Floch K, et al. 2020.** Plant nitrogen supply affects the *Botrytis cinerea* infection process and modulates known and novel virulence factors. *Molecular Plant Pathology* **21**: 1436–1450.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, et al. 2004.** AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1053–1062.
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B. 2009.** The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**: 310–317.
- Ton J, Mauch-Mani B. 2004.** β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* **38**: 119–130.
- Torres-Vera R, García JM, Pozo MJ, López-Ráez JA. 2014.** Do strigolactones contribute to plant defence? *Molecular Plant Pathology* **15**: 211–216.
- Verhage A, Vlaardingerbroek I, Raaymakers C, et al. 2011.** Rewiring of the Jasmonate signaling pathway in Arabidopsis during insect herbivory. *Frontiers in Plant Science* **2**: 1–12.
- Vicedo B, Flors V, De La O Leyva M, et al. 2009.** Hexanoic acid-induced resistance against *botrytis cinerea* in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1455–1465.
- Vlot CA, Dempsey DA, Klessig DF. 2009.** Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177–206.
- Walters DR, McRoberts N. 2006.** Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* **11**: 581–586.
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X. 2007.** Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology* **17**: 1784–1790.
- Wasternack C, Hause B. 2013.** Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* **111**: 1021–1058.
- Westfall CS, Sherp AM, Zubieta C, et al. 2016.** Arabidopsis thaliana GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 13917–13922.
- Windram O, Madhou P, Mchattie S, et al. 2012.** Arabidopsis defense against *Botrytis cinerea*: Chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell* **24**: 3530–3557.
- Xu J, Audenaert K, Hofte M, de Vleeschauwer D. 2013.** Abscisic Acid Promotes Susceptibility to the Rice Leaf Blight Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* by Suppressing Salicylic Acid-Mediated Defenses. *PLoS ONE* **8**.
- Xu H, Xie H, Wu S, Wang Z, He K. 2019.** Effects of elevated CO₂ and increased N fertilization on plant secondary metabolites and chewing insect fitness. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Yang DL, Yao J, Mei CS, et al. 2012.** Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**.
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, et al. 2008.** Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 1678–1692.
- Yuan HM, Liu WC, Lu YT. 2017.** CATALASE2 Coordinates SA-Mediated Repression of Both Auxin Accumulation and JA Biosynthesis in Plant Defenses. *Cell Host and Microbe* **21**: 143–155.
- Zarattini M, Farjad M, Launay A, et al. 2021.** Every cloud has a silver lining: How abiotic stresses affect gene expression in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **72**: 1020–1033.
- Zhang W, Corwinand JA, Copeland D, et al. 2017.** Plastic transcriptomes stabilize immunity to pathogen diversity: The jasmonic acid and salicylic acid networks within the Arabidopsis/*Botrytis* pathosystem open. *Plant Cell* **29**: 2727–2752.
- Zhu Z, An F, Feng Y, et al. 2011.** Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America* **108**: 12539–12544.
- Zimmerli L, Métraux J-P, Mauch-Mani B. 2001.** β -Aminobutyric Acid-Induced Protection of Arabidopsis against the Necrotrophic Fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **126**: 517–523.

Chapitre VII

Discussion générale et
perspectives

Nathalie Lacrampe

Botrytis cinerea est un champignon phytopathogène responsable de la pourriture grise, qui cause d'énormes dégâts en agriculture. Afin d'étudier les phénomènes métaboliques qui limitent la propagation des lésions nécrotiques, différents niveaux d'expressions du génome ont été analysés. Tout d'abord, une analyse de l'expression de gènes, ciblée sur le métabolisme de dégradation et d'assimilation du saccharose a été réalisée. Puis, des analyses des pools métaboliques avant et après l'inoculation, comprenant les hormones, ont été réalisées. Enfin, les modifications des pools métaboliques au cours du temps et les données de croissance ont été intégrées dans un modèle de flux métaboliques.

Le choix d'étudier un tissu de tige repose sur une réalité agronomique, où chez les plantes de tomate cultivées sous serre, les plaies d'effeuillage constituent un terrain propice à l'inoculation par des conidies de *B. cinerea*. Néanmoins, la tige est un organe particulier. Elle se comporte comme un tissu puit mais est capable d'une faible activité photosynthétique, et est surtout responsable du transport entre les organes de l'eau et des solutés, et du soutien de la plante. Les analyses réalisées, visant à identifier et modéliser les modifications métaboliques de défense d'une « cellule » moyenne, englobent les modifications métaboliques dans les vaisseaux conducteurs et omettent les différents types tissulaires constitutifs de la tige. Pourtant, ces travaux viennent enrichir les connaissances sur la défense, dans un organe passablement négligé, la tige.

Comme tous les nécrotrophes, *B. cinerea* induit la mort des cellules végétales infectées et se nourrit des débris cellulaires ainsi générés. Aussi, la position du tissu analysé par rapport à la lésion est d'une importance capitale pour mesurer la défense. Un tissu choisi trop proche de la lésion ne sera constitué que de cellules mortes ou mourantes (Valeri *et al.*, 2021). A l'inverse, à une trop grande distance de la lésion, des molécules de signalisation longue-distance tel que le calcium ou les phytohormones permettent la perception de l'attaque et induisent, si les pathogènes la déclenche (en règle générale les biotrophes), la résistance systémique acquise (SAR) (Heil and Bostock, 2002; Li *et al.*, 2020). Mais on connaît assez peu le métabolisme des tissus systémique « primés » mais non infectés. Dans cette étude contre un nécrotrophe, l'analyse des mécanismes métaboliques soutenant la défense a été réalisée sur des tissus asymptomatiques, où l'absence de colonisation par le champignon a été vérifiée par dosage d'ARN fongique, mais situés à proximité de la lésion. Toutefois, malgré le plus grand soin apporté lors de l'échantillonnage, la distance du tissu récolté par rapport à la lésion

n'a pas été précisément homogénéisé entre les différentes conditions ; aussi, les analyses ont été réalisées sur un mélange de morceau de tige situé de chaque côté de la lésion. Il se pose la question de l'importance de la spatialité des mécanismes de défense, en particulier dans un tissu polarisé tel que la tige.

Dans l'intention de voir les modifications métaboliques qui soutiennent une défense efficace, la sensibilité des plantes à *B. cinerea* a été modulée par un gradient de nutrition azotée. Le gradient d'azote réalisé a eu un effet significatif sur l'état constitutif des plantes, tant au niveau morphologique, ainsi qu'illustré par les différences de tailles de plantes, de diamètres de tiges, de croissances et de teneurs en eau, qu'au niveau métabolique. L'utilisation de la nutrition azotée comme modulateur de la sensibilité présente l'avantage de permettre des modifications métaboliques associées à la défense dans des conditions naturelles, sur des plantes de neuf semaines en début de fructification, mais engendre des bouleversements physiologiques multiples, qui peuvent être plus limités en exploitant variabilité génétique ou par l'utilisation de mutants.

Il est généralement considéré que l'activation des systèmes de défense suite à une infection entraîne, de manière plus ou moins systémique et plus ou moins durable, la suspension de la croissance. Pourtant, cette étude met en évidence, chez les plantes inoculées, une augmentation de la croissance en diamètre et en masse sèche par unité de longueur des tissus, d'autant plus importante que la nutrition azotée est faible. Une confirmation de ces observations doit être obtenue dans une expérience ultérieure. Néanmoins, des différences statistiques significatives ont été obtenues sur plusieurs lots de plantes indépendants (dates d'échantillonnage et niveaux d'azote), ce qui exclut *a posteriori* une erreur de mesure. Étonnamment, l'augmentation de croissance s'accompagne d'une diminution des hormones de croissance (auxine et précurseurs des cytokinines) chez les plantes inoculées. A faible niveau de nutrition azotée, l'infection induit à la fois une croissance accrue et une accumulation de composés identifiés comme potentiellement actifs dans la défense. Cette divergence avec la notion de compromis croissance-défense pourrait être liée à un problème d'échelle, où l'activation de la défense entrainerait une baisse de la croissance au niveau de la plante entière mais que cette dernière resterait possible localement. Dans ce cadre, il a été observé dans plusieurs études sur feuilles infectées par *B. cinerea* une répression de l'activité photosynthétique des tissus infectés mais un maintien de cette activité dans les

tissus distaux (Berger *et al.*, 2004). Des hypothèses sur l'origine de cette augmentation de croissance peuvent être émises. Il pourrait s'agir d'un mécanisme d'infection induit par le pathogène dans le but de diminuer les défenses de la plante. A l'inverse, la croissance locale pourrait résulter d'un afflux de ressources depuis des tissus systémiques pour produire des composés de défense.

Les différents niveaux d'analyse montrent de plusieurs manières que les tissus asymptomatiques de tige, situés à proximité du site d'inoculation, perçoivent l'infection à *B. cinerea*. En effet, quel que soit le niveau de sensibilité et de nutrition azotée, l'infection induit une modification rapide des quantités en galactinol et alanine, mais également d'hormones tel que l'auxine ou les précurseurs de synthèse des cytokinines (iPRMP et iPR). Néanmoins les modifications métaboliques liées à l'infection ne sont pas identiques entre les plantes plus ou moins sensibles. Une moindre sensibilité à *B. cinerea*, associée à une forte nutrition azotée chez la tomate, ne semble pas s'expliquer par des bouleversements métaboliques majeurs. Une surexpression précoce de nombreux gènes du métabolisme de dégradation et d'assimilation du saccharose est observée, mais peu de variation des pools métaboliques ou des flux associés sont notables. Néanmoins, avec des niveaux de lésions identiques, les plantes à 10 mM de NO_3^- montrent davantage d'évolutions métaboliques que les plantes à 20 mM de NO_3^- . La diminution de la sensibilité est possiblement liée à un état constitutif favorable à la défense, comme par exemple des parois enrichies en lignine ou la présence de protéines de défense particulières, qui ne sont pas mis en évidence dans cette étude. A l'inverse, une forte sensibilité, associée à une faible nutrition azotée, engendre des modifications métaboliques majeures. Tout d'abord, une sous-expression de nombreux gènes codant pour des enzymes de dégradation du saccharose (sucrose synthase et invertase) et d'assimilation de ces produits dans le métabolisme a été observée, en comparaison aux plantes non inoculées. Au niveau hormonal, les taux d'acide abscissique diminuent, chez les plantes sensibles, quelques jours après l'inoculation, alors que l'acide salicylique est très stimulé tardivement et uniquement à très bas niveau de nutrition azotée. En outre, les plantes sensibles présentent une accumulation importante de composés carbonés (tel que le pyruvate, l' α -cétoglutarate et le fumarate, plusieurs oligosaccharides), de la plupart des composés associés à la défense (comme l'acide chlorogénique, la putrescine et la spermidine), et également de glutathion, ce dernier étant associé au maintien du statut redox. Cette accumulation a été reliée à une

tentative infructueuse, associée à une augmentation de la croissance et de la plupart des flux métaboliques, de mise en place de mécanismes de défense induite et de maintien de l'homéostasie, afin de retarder la mort cellulaire bénéfique aux nécrotrophes. L'accumulation de nombreux métabolites, associée à une croissance accrue engendre une réorganisation massive des flux métaboliques qui est associée à une augmentation des besoins en azote, mais aussi en carbone, soutenue, selon les prédictions du modèle FBA, par un import exogène de glutamine. Ces modifications, à niveau intermédiaire de nutrition azotée, accompagnées d'un surcroît de synthèse protéique, permettent de réduire de moitié la progression de la maladie mais ne permettent pas d'atteindre la résistance observée à fort niveau de nutrition azotée. L'infection induit, à tous les niveaux d'azote, à l'exception du plus fort niveau de nutrition azotée où les flux sont similaires entre les plantes *mocks* et inoculées, des flux normalisés par unité de carbone entrant plus importants à travers la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates ainsi que l'assimilation de l'azote (GOGAT) accompagné de flux plus faibles à travers le cycle de Krebs et vers le stockage d'amidon. Ces flux sont légèrement plus élevés à mesure que la disponibilité en azote s'accroît. Cela semble indiquer que la défense de la plante repose sur un surcroît d'activité du métabolisme central. En particulier, les profils très différents de la voie des pentoses-phosphates, entre les plantes *mocks* et inoculées, soulignent l'importance de cette voie dans la défense.

Antérieurement à ce travail, il avait été constaté qu'un niveau constitutif élevé de fructose ou de fructose relatif protège les plantes contre l'infection à *B. cinerea*. Toutefois, au cours de l'infection, l'accumulation de fructose est liée, chez des plantes en condition de stress hydrique, à une moindre sensibilité, tandis que chez des plantes en condition de stress azoté, l'accumulation de fructose est liée à la sensibilité (Lecompte *et al.*, 2017). La teneur en fructose, avant et après inoculation, est donc un marqueur de l'infection, mais est variable selon la combinaison de stimulations biotiques et abiotiques, et possiblement en fonction du génotype de l'hôte. Si un surcroît de fructose dans le pool de sucres constitutif est systématiquement corrélé positivement à la résistance, comme cela a été confirmé dans cette étude, l'interprétation des évolutions de concentration en fructose post-infection est plus difficile, et probablement contextuelle. Néanmoins, au-delà de l'implication dans la défense du gène d'invertase *SI-LIN6* et de multiples gènes d'hexokinases, déjà décrite dans la littérature (Berger *et al.*, 2004; Aguilera-Alvarado and Sanchez-Nieto, 2017), l'implication

spécifique des gènes de saccharose synthase *SI-SUS1* et de phosphofructokinase *SI-PFK6* dans la résistance à *B. cinerea* a été mise en évidence ici. Le clivage du saccharose par les saccharose synthases pourrait être important dans la défense pour son rôle dans la production d'UDP-glucose, précurseurs des composants de la paroi cellulaire. L'implication du fructose dans la glycolyse ne serait alors qu'une conséquence avantageuse du renforcement des parois, apportant cependant un surcroît de carbone utile à la production de pouvoir réducteur et de composés de défense. L'intégration des divers résultats dans un modèle métabolique ne permet pas de statuer sur le rôle du fructose dans la défense. Des analyses plus précises sur les activités enzymatiques ou l'utilisation de modèles cinétiques seraient nécessaires pour élucider cette question.

L'infection par un agent pathogène induit la production de protéines *pathogenesis-related* (PR), telles que les glucanases, les chitinases, les défensines, qui présentent des propriétés antimicrobiennes, mais également des oxalate oxidases et des peroxydases qui sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Van Loon *et al.*, 2006; AbuQamar *et al.*, 2017). Les données expérimentales montrent une augmentation, chez les plantes inoculées, des teneurs en protéines et certains acides aminés libres, alors qu'ils ont tendance à diminuer chez les plantes *mocks*, reflétant ainsi l'activation de la machinerie protéique suite à l'infection. Cependant, aux niveaux de nutrition azotée les plus extrêmes (0.5 et 20 mM de NO_3^-), l'augmentation de la production de protéines n'a pas lieu. A fort niveau de nutrition azotée, les tissus, à haut potentiel de production protéique, ne sont probablement pas suffisamment stimulés par une contrainte biotique de faible intensité. En revanche, à faible niveau de nutrition azotée, où l'intensité de la maladie est élevée, la production de protéines est restreinte par une limitation en azote trop importante. Ainsi, l'incapacité d'activation de la machinerie protéique semble être un facteur de sensibilité. Cela souligne une complexité dans la démarche qui n'avait peut-être pas été suffisamment anticipée : la résistance est la résultante de la virulence du champignon (au sens large, traduit par sa vitesse de progression dans les tissus) et de l'intensité de la défense, les deux phénomènes étant probablement liés, d'une manière à la fois temporelle et spatiale.

La paroi cellulaire a un rôle capital dans la défense. Elle constitue une barrière physique, activement remodelée et renforcée, suite à la pénétration et à la progression des agents pathogènes (Underwood, 2012). Les analyses réalisées montrent que la quantité de paroi

diminue avec la nutrition azotée, mais augmente tardivement après inoculation uniquement chez les plantes les moins sensibles, à forte niveau de nutrition azotée. Cependant, le remodelage du contenu pariétal n'a pas été analysé et n'est donc pas pris en compte dans la modélisation. La composition de la paroi cellulaire pourrait expliquer la défense constitutive élevée et les faibles modifications métaboliques observées à fort niveau de nutrition azotée.

Lors de ce travail, l'origine de la résistance n'a pas été identifiée, même si les observations permettent de faire l'hypothèse que la résistance est liée à plusieurs facteurs. Des analyses complémentaires pourraient être réalisées pour avancer dans la compréhension de ces phénomènes. Tout d'abord, une analyse transcriptomique permettrait de mettre en évidence les modifications d'expression à l'échelle du génome entier. Bien que cela ait déjà été réalisé sur diverses plantes hôtes (Windram *et al.*, 2012; De Cremer *et al.*, 2013; Fortes *et al.*, 2015; Vega *et al.*, 2015) cela n'a jamais été réalisé sur les tiges de tomate à différents niveaux de sensibilité. Ensuite, une analyse protéomique permettrait d'identifier les modifications du protéome de la plante au cours de l'infection et surtout entre les plantes sensibles et résistantes, et de mettre en évidence la présence de protéines d'origine fongique telles que des facteurs de transcription, et ainsi différencier les modifications métaboliques liés à la défense de celles en faveur du pathogène. Enfin, une analyse métabolomique plus poussée, notamment sur la composition des parois, le statut redox et énergétique, les composés secondaires minoritaires, ainsi qu'une analyse des différentes capacités enzymatiques, permettraient de construire un modèle de flux métaboliques plus représentatif de la complexité de l'interaction. Dans cet objectif, il serait également intéressant de différencier les modifications métaboliques liées au transport par les vaisseaux conducteurs de celles dues à la réorganisation métabolique des cellules. Pour ce faire le phloème pourrait être récolté par exsudation ou stylectomie d'insectes piqueurs-suceurs, et analysé séparément. De plus, réaliser des mesures plus fréquentes et sur une plus longue durée permettrait de mieux ajuster les contraintes du modèle et ainsi obtenir une vision dynamique permettant de comparer les flux constitutifs des flux après infection. En parallèle, afin de modéliser la spatialité des mécanismes de défense au niveau de la tige, il serait intéressant de regarder les différences métaboliques entre les tissus au-dessus et en-dessous, et à distance croissante des lésions, pour étudier un éventuel phénomène d'atténuation du signal de défense proportionnel à l'éloignement du champignon.

Les expériences réalisées dans ce travail concernent des plantes cultivées en pots et ayant atteint le début de croissance du premier bouquet de fruits. Les doses d'azote utilisées sont larges, allant du déficit sévère à l'excès, mais la sensibilité au champignon varie dans une gamme d'apport d'azote compatible avec ce qui est pratiqué en production (le niveau optimal pour la croissance et le rendement, ici représenté par la gamme entre 5 et 10 mM de NO_3^-). Ainsi des manipulations d'azote visant à limiter la croissance du champignon peuvent être envisagées en conditions agricoles, à des fins de protection intégrée des cultures. A l'inverse de ce qui est observé ici, des apports élevés d'azote peuvent être favorables à d'autres champignons, notamment les biotrophes comme *Oidium neolycopersici*. Ainsi, les résultats présentés ouvrent des perspectives de travaux agronomiques visant à adapter temporairement les niveaux d'azote en fonction du risque et du type de contraintes biotiques rencontrées dans les parcelles agricoles. Des variations temporaires extrêmes pourraient être envisagées pour accentuer le plus possible les phénomènes de résistance, mais les conséquences agronomiques de la durée et du positionnement dans le cycle de cultures de ces variations devraient également être étudiées.

Références

- AbuQamar S, Moustafa K, Tran LSP.** 2017. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**, 262–274.
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T.** 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* **122**, 419–428.
- De Cremer K, Mathys J, Vos C, Froenicke L, Michelmore RW, Cammue BPA, De Coninck B.** 2013. RNAseq-based transcriptome analysis of *Lactuca sativa* infected by the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Plant, Cell and Environment* **36**, 1992–2007.
- Fortes AM, Carbonell-Bejerano P, Nascimento T, Sousa L, Erban A, Agudelo-Romero P, Martínez-Zapater JM, Kopka J, Rego C.** 2015. Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1769–1785.
- Heil M, Bostock RM.** 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* **89**, 503–512.
- Lecompte F, Nicot PC, Ripoll J, Abro MA, Raimbault AK, Lopez-Lauri F, Bertin N.** 2017. Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Annals of Botany* **119**, 931–943.
- Li P, Lu YJ, Chen H, Day B.** 2020. The Lifecycle of the Plant Immune System. *Critical Reviews in Plant Sciences* **39**, 72–100.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ.** 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135–162.
- Paulina Aguilera-Alvarado G, Sanchez-Nieto S.** 2017. Plant Hexokinases are Multifaceted Proteins. *Plant and Cell Physiology* **58**, 1151–1160.
- Underwood W.** 2012. The plant cell wall: A dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science* **3**, 1–6.
- Valeri MC, Novi G, Weits DA, Mensuali A, Perata P, Loreti E.** 2021. *Botrytis cinerea* induces local hypoxia in *Arabidopsis* leaves. *New Phytologist* **229**, 173–185.
- Vega A, Canessa P, Hoppe G, Retamal I, Moyano TC, Canales J, Gutiérrez RA, Rubilar J.** 2015. Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1–17.
- Windram O, Madhou P, Mchattie S, et al.** 2012. *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: Chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell* **24**, 3530–3557.

Résumé

L'influence de la nutrition azotée des plantes sur l'intensité des épidémies causées par les champignons pathogènes est liée à des phénomènes multiples, dont les mécanismes sont encore mal connus. Il est cependant acquis que le métabolisme des tissus de la plante hôte, dont l'activité dépend de la disponibilité en azote, participe à la défense des plantes. L'objectif de ce travail était de comparer le métabolisme de plantes saines et de plantes infectées, en utilisant des gradients de nutrition azotée aboutissant à des niveaux variables de développement fongique, afin d'identifier les processus métaboliques favorables à la résistance. Le pathosystème étudié est la tige de tomate infectée par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, qui constitue une des menaces microbiologiques les plus sérieuses pour la production agricole. Les plantes ont été cultivées à cinq niveaux de nutrition azotée, allant d'un déficit sévère (solution à 0.5 mM de NO_3^-) à un excès (solution à 20 mM de NO_3^-), avec des traitements intermédiaires (solutions à 2, 5 et 10 mM de NO_3^-). Le développement des lésions a suivi une courbe asymptotique décroissante en fonction de la nutrition azotée, conformément à plusieurs expériences précédentes. Des échantillons de tige asymptomatiques, exemptes de tissus fongiques, ont été récoltés en bordure des lésions, ou dans des zones équivalentes chez des plantes non inoculées, avant, et 2, 4 et 7 jours après l'inoculation.

Une analyse de transcription de gènes, ciblée sur le métabolisme des principaux sucres solubles (saccharose, glucose, fructose), a permis de montrer une expression différenciée des gènes codant pour les invertases, saccharose synthases, hexokinases, fructokinases et phosphofructokinases. En comparaison des plantes *mock*-inoculées, les plantes infectées par *B. cinerea* ont présenté à bas niveaux d'azote une répression de la majorité des gènes, tandis qu'ils ont été surexprimés à forte nutrition azotée. Un surcroît d'expression précoce d'un gène de saccharose synthase et de phosphofructokinase, qui semblent être spécifiquement induit par l'infection, a été observé chez les plantes les plus résistantes. Un profilage quantitatif et semi-quantitatif des métabolites primaires et secondaires a indiqué, chez les plantes très sensibles, des contrastes importants entre 0.5 mM et 5 mM d'apport de NO_3^- avec une évolution profonde du métabolisme, alors que les plantes moins sensibles, à forte nutrition azotée, ont présenté peu de molécules marqueurs de l'infection. Une analyse de la croissance des portions de tiges étudiées a montré une croissance en masse chez les plantes infectées, par rapport aux plantes saines, d'autant plus forte que l'azote était limitant. Cette croissance s'est cependant accompagnée d'une baisse (2 et 5 mM de NO_3^-) ou d'une absence (à 0.5 mM de NO_3^-) de l'accumulation de protéines qui semblent être nécessaires à la défense. Un modèle de flux métaboliques, de type *flux balance analysis* (FBA), a été développé puis contraint avec les données de croissance et les analyses métabolomiques quantitatives. Les flux calculés sont supérieurs au sein du métabolisme central chez les plantes infectées, avec en particulier une activité accrue du métabolisme azoté, de la glycolyse et de la voie des pentoses-phosphates, à carbone importé équivalent. Enfin, des profils hormonaux établis sur les échantillons ont montré des variations de concentrations des hormones associés à la réponse aux stress comme à la croissance. En particulier, suite à l'inoculation, une diminution précoce de la concentration en acide abscissique (ABA) est associée à la sensibilité.

En conclusion, ce travail illustre l'importance de l'adaptation du métabolisme et de ses déterminants (expression génique, signalisation hormonale) dans la réponse de tissus puits tels que les tiges, suite à l'infection par un champignon nécrotrophe, et souligne l'intérêt des approches combinées et intégrées d'expression de gènes, de métabolomique et de fluxomique pour l'analyse de l'interaction plantes-pathogènes. Le stress azoté, qui modifie profondément le métabolisme constitutif ou induit après l'inoculation, est associé à des facteurs de sensibilité et au blocage apparent de certains mécanismes de défense. Mais nos résultats ne permettent pas d'exclure l'hypothèse d'une influence directe du champignon pour perturber les mécanismes de défense, d'une manière différenciée en fonction du niveau de nutrition azotée des plantes.

