



HAL
open science

Étude de l'interaction entre *Verticillium alfalfae* et *Medicago truncatula*

Maoulida Toueni

► **To cite this version:**

Maoulida Toueni. Étude de l'interaction entre *Verticillium alfalfae* et *Medicago truncatula*. Biologie végétale. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2014. Français. NNT : 2014INPT0097 . tel-04261514

HAL Id: tel-04261514

<https://theses.hal.science/tel-04261514v1>

Submitted on 27 Oct 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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Interactions plantes-microorganismes

Présentée et soutenue par :

M. MAOULIDA TOUENI

le lundi 17 novembre 2014

Titre :

ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE VERTICILLIUM ALFALFAE ET
MEDICAGO TRUNCATULA

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Ecologie Fonctionnelle (ECOLAB)

Directeur(s) de Thèse :

MME MARTINA RICKAUER

MME CECILE BEN

Rapporteurs :

Mme DIANA FERNANDEZ, IRD MONTPELLIER

M. PHILIPPE REIGNAULT, UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

Membre(s) du jury :

M. PHILIPPE REIGNAULT, UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE, Président

Mme CECILE BEN, INP TOULOUSE, Membre

Mme DIANA FERNANDEZ, IRD MONTPELLIER, Membre

Mme MARTINA RICKAUER, INP TOULOUSE, Membre

| | |
|--|------------|
| A. INTRODUCTION | 7 |
| I. Les maladies des Plantes | 9 |
| 1. Introduction : les maladies des plantes | 9 |
| 2. Les pathogènes vasculaires | 13 |
| a) Les bactéries | 13 |
| b) Les Oomycètes..... | 13 |
| c) Les champignons | 15 |
| 3. Les maladies de flétrissement vasculaires | 17 |
| II. La verticilliose | 23 |
| 1. <i>Verticillium sp.</i> : l'agent causal de la verticilliose | 25 |
| 2. Cycle de la maladie | 33 |
| 3. Mécanismes de transmission et dispersion | 35 |
| 4. Importance économique et écologique | 37 |
| 5. Méthodes de contrôles de la maladie | 39 |
| III. Bases moléculaires de l'interaction entre <i>Verticillium</i> et l'hôte | 39 |
| 1. Facteurs d'adaptation au xylème | 39 |
| 2. Effecteurs et facteurs de virulence | 45 |
| 3. Types d'interaction observés en réponse à <i>Verticillium sp.</i> | 49 |
| IV. Mécanismes de défense des plantes, notamment contre la verticilliose | 51 |
| 1. Défenses préformées et induites | 51 |
| 2. La perception des pathogènes | 53 |
| 3. Les mécanismes de défense physico-chimiques | 65 |
| 4. Le rôle des molécules de signalisation dans la résistance, les phytohormones | 75 |
| 5. Le rôle des microARN dans la régulation des gènes des mécanismes de défenses | 89 |
| 6. Résistance contre la verticilliose | 93 |
| a) Résistance <i>Ve1</i> -dépendante chez la tomate | 95 |
| 1. Structure de <i>Ve1</i> et <i>Ve2</i> | 95 |
| 2. Signalisation de la résistance <i>Ve1</i> -dépendante | 97 |
| 3. L'effecteur <i>Ave1</i> | 99 |
| b) La résistance <i>Ve1</i> -dépendante est une PTI..... | 101 |
| V. La verticilliose de la luzerne, modèle d'études et objectifs de la thèse | 103 |
| 1. La luzerne, <i>Medicago sativa</i> L. | 103 |
| 2. La verticilliose chez <i>Medicago sativa</i> L. | 107 |
| 3. <i>M. truncatula</i>, plante modèle des légumineuses | 111 |
| 4. <i>M. truncatula</i> est une plante hôte de souches de <i>Verticillium</i> isolées de luzerne | 115 |
| 5. Objectifs de la thèse | 119 |

| | |
|---|------------|
| B. MATERIEL ET METHODES | 123 |
| I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CULTURE..... | 125 |
| 1. <i>Verticillium</i> | 125 |
| 2. Matériel végétal | 125 |
| II. BIOESSAIS..... | 129 |
| 1. Inoculation et notation des symptômes | 129 |
| 2. Traitement hormonaux..... | 131 |
| 3. Analyse statistique des données phénotypiques | 133 |
| a) Développement de la maladie | 133 |
| b) Poids frais et secs racinaires et foliaires | 133 |
| 1. Extraction d'ADN | 133 |
| 2. PCR | 137 |
| 3. Quantification de l'ADN de <i>Verticillium</i> par qPCR..... | 137 |
| 4. Extraction d'ARN | 139 |
| 5. qRT-PCR pour l'étude d'expression de gènes | 141 |
| a) Traitement à la DNase..... | 141 |
| b) Synthèse des ADN complémentaires | 141 |
| c) PCR quantitative..... | 143 |
| I. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES..... | 145 |
| II. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES | 147 |
| 1. Identification des gènes différentiellement exprimés..... | 147 |
| 2. Construction du réseau de coexpression de gènes par la méthode Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)..... | 149 |
| 3. Annotation fonctionnelles..... | 149 |
| a) Analyse des données avec le logiciel MapMan | 149 |
| b) Analyse des GO term | 151 |
| C. RÉSULTATS | 153 |
| I. Etude du mécanisme d'infection de <i>M. truncatula</i> par <i>Verticillium alfalfae</i>..... | 155 |
| 1. Caractérisation moléculaire de la souche V31-2 et présentation du pathosystème..... | 155 |
| 2. Interaction entre <i>M. truncatula</i> et V31-2 en conditions hydroponiques | 157 |
| 3. Étude comparative de la colonisation racinaire au cours d'une interaction compatible et incompatible entre <i>M. truncatula</i> et <i>V. alfalfae</i> V31-2..... | 159 |
| a) Sélection d'une souche monosporique exprimant la GFP..... | 163 |
| b) Étude des mécanismes d'infection et de colonisation de la lignée A17 et F83005.5 par la souche V31-2-GFP..... | 165 |

| | |
|--|-----|
| 4. Discussion | 171 |
| a) Caractéristiques du pathosystème en condition hydroponique | 173 |
| b) Mécanisme d'infection de <i>M. truncatula</i> par <i>V. alfalfae</i> | 173 |
| Processus de colonisation de <i>M. truncatula</i> par <i>V. alfalfae</i> | 175 |
| c)..... | 175 |
| II. Étude de l'implication des hormones dans l'interaction entre <i>V. alfalfae</i> et <i>M. truncatula</i> par traitements exogènes | 183 |
| 1. Effets des traitements hormonaux sur la croissance de <i>Va</i> V31-2 | 185 |
| 2. Effet des traitements hormonaux sur le développement de la maladie | 187 |
| a) Mise au point du dispositif expérimental..... | 187 |
| b) Effets des traitements sur le développement des symptômes chez A17 et F83005.5 189 | |
| c) Effet des traitements sur la colonisation racinaire et foliaire par <i>Va</i> V31-2..... | 191 |
| d) Effet des traitements hormonaux sur l'expression de gènes marqueurs | 195 |
| 3. Recherche et caractérisation de mutant de la voie de l'acide salicylique | 195 |
| a) Identification d'un mutant Npr1 chez <i>M. truncatula</i> | 197 |
| b) Génotypage de la descendance de la lignée mutante NF2859 | 197 |
| 4. Discussion | 199 |
| III. Étude du transcriptome des lignées résistante et sensible inoculées avec <i>Va</i> V31-2 dans la phase précoce de l'infection | 207 |
| 1. Choix du dispositif expérimental pour la caractérisation de la réponse de <i>M. truncatula</i> à <i>Va</i> V31-2 | 209 |
| 2. Principe de la méthode de Massive Analysis of cDNA Ends (MACE) | 211 |
| 3. Analyses globales des données de séquençage | 213 |
| 4. Extraction des gènes différentiellement exprimés en réponse à <i>Va</i> V31-2 dans une interaction compatible et incompatible, par analyses statistiques | 215 |
| 5. Validation de la méthode MACE par qRT-PCR | 219 |
| 6. Annotation fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés en réponse à l'infection chez A17 et F83005.5 | 221 |
| 7. Identification de voies métaboliques impliquées dans la résistance ou la sensibilité grâce à l'annotation GO. | 225 |
| a) Principales classes GO au sein des gènes répondant à l'inoculation chez les lignées sensible et résistante | 227 |
| b) Comparaison des termes GO enrichis dans les gènes induits dans chaque lignée .. | 229 |
| c) Les mécanismes de défense sont inhibés chez la lignée sensible. | 233 |
| 8. Identification et analyse de réseaux de régulation de gènes co-exprimés en réponse à <i>Va</i> V31-2 chez la lignée A17 | 235 |

| | | |
|------------|---|------------|
| a) | Méthode utilisée pour la modélisation du réseau de régulation de gènes co-exprimés | 237 |
| b) | Analyse du réseau de gènes co-exprimés chez A17 en réponse à <i>Va</i> V31-2..... | 239 |
| a) | Comparaison du réseau de co-expression de gènes en réponse à <i>Va</i> V31-2 avec celui prédit par LegumeGRN | 247 |
| b) | Des régulateurs identifiés dans le module de co-expression en réponse à <i>Va</i> V31-2 chez la lignée A17 | 249 |
| 9. | Identification et annotation des contigs de <i>Va</i> V31-2 exprimés <i>in planta</i>..... | 257 |
| 10. | Discussion | 257 |
| a) | Les lignées résistante et sensible développent une réponse commune face à <i>Va</i> V31-2. | 259 |
| b) | Des mécanismes de résistance sont inhibés chez la lignée sensible en réponse à <i>Va</i> V31-2 et d'autres sont induits chez la lignée A17..... | 261 |
| c) | Rôle des voies hormonales dans la réponse à <i>Va</i> V31-2..... | 263 |
| d) | Identification de gènes impliqués dans la signalisation de la résistance contre <i>Va</i> V31-2..... | 265 |
| e) | A17 exprime une résistance <i>Ve</i> 1-indépendante et <i>Ave</i> 1-indépendante. | 269 |
| D. | Discussion générale..... | 271 |
| 1. | La lignée A17 de <i>M. truncatula</i> élimine <i>V. alfalfae</i> V31-2 au niveau racinaire | 273 |
| 2. | Analyse de la signalisation de la résistance contre <i>V. alfalfae</i> chez <i>M. truncatula</i>.... | 281 |
| a) | Analyse de la signalisation de la PTI et ETI..... | 281 |
| b) | Analyse de la signalisation hormonale | 287 |
| c) | Autres voies de signalisation..... | 291 |
| 3. | Les molécules de défenses dans la réponse de la lignée A17 à V31-2. | 295 |
| E. | CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 297 |
| F. | BIBLIOGRAPHIE..... | 315 |
| G. | ANNEXES..... | 359 |

A. INTRODUCTION

I. Les maladies des Plantes

1. Introduction : les maladies des plantes

Les plantes occupent la quasi-totalité de la surface émergée de la Terre. Leur bon développement dépend des facteurs biotiques et abiotiques de leur environnement. Du fait de leur autotrophie (capacité à produire des matières organiques par réduction de matières inorganiques) grâce à la photosynthèse, les plantes sont les premières productrices de matière organique, source principale de carbone. Cette qualité en fait un habitat très attractif pour les micro-organismes hétérotrophes. Ainsi, des bactéries, champignons, oomycètes, virus, protozoaires et nématodes établissent des interactions avec les plantes que ce soit au niveau de la phyllosphère ou de la rhizosphère, l'interaction la plus néfaste pour la plante étant celle avec des pathogènes qui acquièrent leurs nutriments au détriment de la plante hôte.

Les micro-organismes phytopathogènes peuvent être divisés en trois catégories selon la stratégie qu'ils utilisent pour acquérir leurs nutriments à partir de l'hôte. Ainsi, les biotrophes obtiennent leurs nutriments à partir de tissus vivants et ont développé des stratégies pour exploiter leurs hôtes tout en les maintenant en vie pour pouvoir compléter leur cycle de vie. Les nécrotrophes obtiennent leurs nutriments à partir de tissus morts ou mourants, ils induisent donc des nécroses et la macération des tissus. Les membres du troisième groupe, les hémibiotrophes, agissent comme des biotrophes ou des nécrotrophes selon l'étape de leurs cycles (Glazebrook, 2005 ; Kliebenstein and Rowe, 2008). Ainsi, des microbes, même très différents d'un point de vue phylogénique, peuvent présenter des caractéristiques morphologiques, des stratégies d'infection et des mécanismes de virulence similaires. La majorité d'entre eux a évolué pour infecter les parties aériennes telles que les feuilles, la tige ou les fruits. Ceci n'est pas étonnant puisque ce sont les organes de la production ou de stockage de sucres. Attirés par le gradient de sucres, source principale de carbone, les bactéries phytopathogènes se développent dans le mésophylle et progressent vers le phloème qui transporte

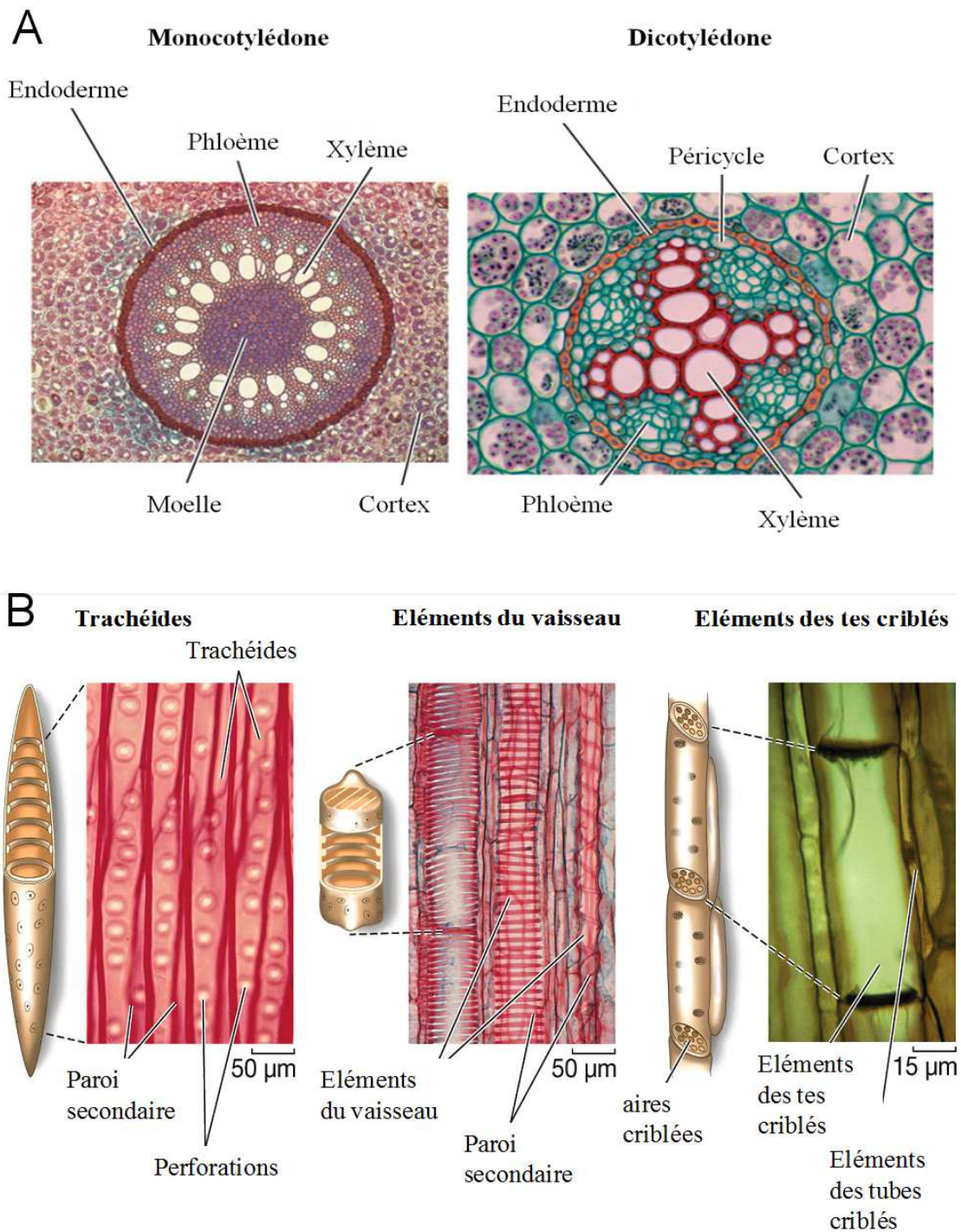


Figure 1 : Structure du système vasculaire de monocotylédone et de dicotylédone. A. Coupes transversales. B. Structure des conduits vasculaires en coupes longitudinales. Adapté de Lab 4 (2014). Le xylème assure le transport de la sève brute. Les vaisseaux sont classés d'après leur architecture et la présence ou non des membranes transversales. Les trachéides (vaisseaux imparfaits) présentent des membranes transversales. Les vaisseaux parfaits ne présentent pas de membranes transversales.

les produits de photosynthèse. Les champignons forment des excroissances mycéliennes qui pénètrent par les plasmodesmes et entrent en contact avec la membrane plasmique des cellules végétales où ils agissent comme des suçoirs en développant une zone active de transfert de nutriments (Agrios, 2004). Toutefois, le sol et le sous-sol sont des habitats très riches en microbes, et offrent également un environnement très favorable aux interactions avec les plantes. Des agents phytopathogènes ciblent donc aussi les organes qui se développent dans le sol tels que les tubercules ou les racines. Un petit groupe de phytopathogènes du sol infecte spécifiquement le système vasculaire.

Le système vasculaire d'une plante est constitué d'éléments du xylème et du phloème. Les vaisseaux du xylème sont formés de cellules mortes aux parois lignifiées qui transportent les composés absorbés par les racines tels que l'eau, les minéraux et autres nutriments vers les organes aériens. Il existe deux types de conduits vasculaires : les trachéides, caractéristiques des Gymnospermes, et les vaisseaux qu'on trouve chez la majorité des Angiospermes (Esau, 1960). Les vaisseaux du xylème sont des structures multicellulaires formées par un empilement longitudinal de cellules uniques de forme cylindrique, communiquant entre elles au-travers des perforations partielles ou totales de la paroi transversale à leurs deux extrémités (Nakashima et al., 2000). La structure et la composition des vaisseaux du xylème jouent un rôle prépondérant dans la progression et la dissémination du pathogène (**Figure 1**). Le phloème transporte la sève élaborée qui contient les carbohydrates produits grâce à la photosynthèse. La plupart des pathogènes vasculaires colonisent plutôt le xylème alors que celui-ci est pauvre en nutriments. Cela serait lié au fait que la pression osmotique dans le phloème est beaucoup plus élevée ce qui rend difficile la pénétration de ces vaisseaux. Toutefois, les bactéries du genre *Rickettsia*, *Spiroplasma* et *Phytoplasma* sont introduites directement dans le phloème par des insectes vecteurs et infectent spécifiquement le phloème. Parmi les pathogènes qui colonisent le xylème, on trouve des bactéries, des champignons et des oomycètes (Agrios, 2004). Ils provoquent des maladies de flétrissement vasculaire.

REGNE: **BACTERIES**

Division: Gram-positive

Class: Proteobactéries

Famille: *Enterobacteriaceae*

Genre: *Erwinia* (*Cucurbitaceae*)
Pantoea (maïs, sorgho...)

Famille: *Pseudomonadaceae*

Genre: *Ralstonia* (*Solanaceae*, *Musaceae*...)
Xanthomonas (*Brassicaceae*)

Famille : *Microbacteriaceae*

Genre : *Curtobacterium* (fève)
Clavibacter, (pomme de terre et tomate)

Famille: *Xanthomonadaceae*

Genre: *Xylella* (arbres et plantes grimpantes)

REGNE: **CHAMPIGNONS**

Division: Ascomycètes

Class: Sordariomycètes

Sous-classe: *Hypocreomycetidae*

Ordre : *Microascales*

Famille : *Ceratocystidaceae*
Genre : *Ceratocystis* (chênes)

Ordre : *Hypocreales*

Famille : *Nectriaceae*
Genre : *Fusarium* (large spectre d'hôtes)

Ordre : *Incertae sedis*

Famille : *Plectosphaerellaceae*
Genre : *Verticillium* (large spectre d'hôtes)

Sous-classe: *Sordariomycetidae*

Ordre : *Ophiostomatales*

Famille : *Ophiostomataceae*
Genre : *Ophiostoma* (orme)

REGNE : **CHROMITES**

Sous-règne : *Harosa*

Infra-règne : *Heterokonta*

Division: *Oomycota*

Class: Oomycètes

Sous-classe: *Saprolegniomycetidae*

Ordre : *Pythiales*

Famille : *Pythiaceae*
Genre : *Pythium* (plantes herbacées)

Figure 2 : Répartition phylogénétique des pathogènes vasculaires et leurs plantes hôtes majeures. Les plantes hôtes indiquées ne représentent pas une liste exhaustive.

2. Les pathogènes vasculaires

a) Les bactéries

Les pathogènes vasculaires bactériens sont répartis dans sept genres (**Figure 2**): *Ralstonia* (qui affecte entre autres les *Solanaceae* et les bananiers), *Xanthomonas* (qui affecte les *Brassicaceae*), *Erwinia* (qui affecte les *Cucurbitaceae*), *Clavibacter* (qui affecte la tomate), *Xylella* (qui affecte la vigne et les agrumes), *Curtobacterium* (qui affecte les haricots) et *Pantoea* (qui affecte le maïs) (Tjamos et al., 1989 ; Agrios, 2004 ; Roper, 2011 ; Agarkova et al., 2012 ; N'guessan et al., 2012 ; Li et al., 2013). Ces bactéries survivent enfermées dans des débris végétaux, dans les graines, ou dans les insectes vecteurs (Agrios, 2004). L'infection de l'hôte se fait principalement de façon passive, à travers des blessures ou les ouvertures naturelles comme les stomates ou les hydathodes. Certaines comme *Xylella fastidiosa* (*Homoptera cicadellidae* et *Cercopoidea*), *Pantoea stewartii* (*Chaetocnema pulicaria*) et *Erwinia tracheiphila* (*Chrysomelidae*) sont injectées directement dans le xylème par leurs insectes vecteurs (Sasu et al., 2010 ; Roper, 2011 ; Li et al., 2013). Une fois dans les vaisseaux du xylème, les bactéries se multiplient rapidement et colonisent l'espace intercellulaire du parenchyme vasculaire. Le flux du xylème les transporte vers les parties aériennes. Ces bactéries dégradent les parois des cellules vasculaires, du parenchyme et les membranes des ponctuations des trachéides. Il en résulte la destruction prématurée des trachéides qui se trouvent remplies de bactéries et de débris cellulaires. Il est possible d'observer quelquefois le suintement des bactéries au niveau des hydathodes ou des fissures sur la tige des plantes infectées (Agrios, 2004).

b) Les Oomycètes

Le genre *Pythium* contient des espèces dont la plupart sont phytopathogènes, saprophytes des plantes ou parasites des animaux (Martin and Loper, 1999) (**Figure 2**). Les pathogènes vasculaires infectent les graines sur le sol et les plantules au niveau des racines, des hypocotyles, voire la plantule toute entière provoquant la fonte des semis, des manques à la levée ainsi que la

pourriture racinaire notamment chez la luzerne cultivée (Raynal, 1989). Ils peuvent persister dans le sol pour une très longue période en état d'oospores (spores aux parois épaisses issues de la reproduction sexuée) (Martin and Loper, 1999). La germination de celle-ci est stimulée par des exsudats racinaires et l'infection de l'hôte peut se faire de façon directe ou indirecte. L'infection directe se fait par l'intermédiaire d'hyphes qui pénètrent l'épiderme et traversent les tissus corticaux, l'endoderme et le parenchyme cellulaire pour accéder au système vasculaire. L'infection indirecte se fait par germination d'une oospore enkystée au contact de l'hôte (Rey et al., 1998).

c) Les champignons

Les champignons pathogènes vasculaire sont répartis dans les quatre genres *Verticillium*, *Fusarium*, *Ceratocystis* et *Ophiostoma* (Yadeta and Thomma, 2013) (**Figure 2**). Le genre *Ceratocystis* affecte le chêne, le cacaotier et l'eucalyptus. L'espèce *C. fagacearum* provoque d'énormes dégâts dans les forêts de chênes (Koch et al., 2010). Les symptômes apparaissent en premier au sommet des arbres sur lesquels on observe un flétrissement foliaire et de la défoliation (Koch et al., 2010). Le genre *Ophiostoma*, avec les espèces *O. ulmi* et *O. novo-ulmi*, affecte essentiellement l'orme, où il est responsable de la graphiose de l'orme qui a pratiquement éradiqué cette espèce ligneuse dans de nombreux pays. Les premiers symptômes sont un jaunissement et un flétrissement foliaires (Newhouse et al., 2007), puis on observe une déformation de l'écorce des branches et des stries noires sous l'écorce, d'où le nom graphiose.

Les genres *Fusarium* et *Verticillium* ont de très larges spectres d'hôtes et infectent des plantes herbacées et ligneuses. La majorité des *Fusarium* responsables de flétrissements vasculaires appartient à une seule espèce, *Fusarium oxysporum*, qui provoque du flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire chez plus de 100 hôtes différents (Lievens et al., 2008). Il est à noter que très souvent, une souche n'est capable d'infecter qu'un seul ou quelques hôtes. Ainsi, sur la base de la spécificité d'hôte, elles sont classifiées en *forma specialis* (groupement taxonomique appliqué à un

champignon qui est adapté à un hôte spécifique) (Armstrong et al., 1975). A ce jour, plus de 120 *formae speciales* sont décrites (Michielse and Rep, 2009). Cette spécialisation n'est pas observée chez les espèces du genre *Verticillium*.

Ces champignons persistent dans le sol ou dans des débris végétaux sous forme de structures de dormance, telles que des chlamydospores, des microsclérotés, du mycélium mélanisé (dark resting mycelium, DRM) ou des coremia, qui peuvent subsister plusieurs années en absence d'hôte. Leur germination est induite par les exsudats racinaires des plantes. Le mycélium infecte les racines excepté pour les espèces d'*Ophiostoma* et *C. fagacearum*, qui sont transmises respectivement par les scolytes de l'orme et les coléoptères de la famille des *Nitidulidae* (Koch et al., 2010). Suite à l'infection, le mycélium colonise l'espace cortical et migre vers les cellules du système vasculaire pour atteindre les vaisseaux du xylème (Pietro et al., 2003 ; Klosterman et al., 2009 ; Schumann and D'Arcy, 2010). Dans le xylème, le champignon produit des conidies qui sont transportées par le flux du xylème vers les autres organes. Tant que les tissus sont vivants, les champignons pathogènes vasculaires sont confinés dans les vaisseaux du xylème. Ils ne colonisent les autres tissus qu'une fois que les tissus sont nécrosés. A ce stade de l'infection seulement sont produites les structures de survie (Agrios, 2004).

3. Les maladies de flétrissement vasculaires

Les maladies de flétrissement vasculaires sont parmi les plus dévastatrices (Agrios, 2004 ; Pegg and Brady, 2002). Elles affectent des plantes annuelles et vivaces, des arbres fruitiers et ornementaux ainsi que des arbustes, et impactent non seulement la production pour la consommation humaine et animale mais aussi les écosystèmes naturels. Les symptômes varient selon le pathogène et l'hôte, et un même pathogène peut causer différents symptômes sur différents hôtes. La plupart des pathogènes sont des microorganismes telluriques et les symptômes se développent de façon acropète (du bas vers le haut). En règle générale, le premier symptôme observé est

l'épinastie, suivie d'une flaccidité, de chloroses, de brunissements vasculaires et de nécroses à l'extrémité des folioles (Agrios, 2004). La mort de la plante peut se produire en quelques jours voire en quelques semaines ou, dans le cas des plantes vivaces, en quelques mois voire en plusieurs années (Fradin and Thomma, 2006 ; Niño-Liu et al., 2006 ; Juzwik et al., 2008 ; Klosterman et al., 2009 ; Michielse and Rep, 2009 ; Janse and Obradovic, 2010 ; Harwood et al., 2011 ; Ralhan et al., 2012).

Deux types de symptomatologie majeurs sont observés : le flétrissement partiel ou complet des parties aériennes, ou un rabougrissement de la plante. Il est naturel de faire un lien direct entre la colonisation du xylème et les symptômes de flétrissement. En effet, la colonisation des vaisseaux entraîne une perturbation de la circulation d'eau à cause de la biomasse du pathogène et des polysaccharides qu'il peut sécréter. Mais les mécanismes de défenses de la plante peuvent aussi contribuer à diminuer la circulation au niveau du xylème. En effet, pour se défendre, l'hôte va induire la production de tyloses et la sécrétion de gomme et de gel qui favorisent la formation d'embolies (Fradin and Thomma, 2006). Des études physiologiques études menées chez la luzerne (*Medicago sativa*) et le raisin ont montré que l'infection par *Xylella fastidiosa* provoquait une diminution de la conductivité du xylème et un stress hydrique (Pérez-Donoso et al., 2010 ; Daugherty et al., 2010). Le deuxième type de symptômes, le rabougrissement de la plante, est observé notamment chez les plantes de la famille des *Brassicaceae* suite à l'infection par *Verticillium longisporum* (Kamble et al., 2013). En effet, il a été montré que le colza (*Brassica napus*) et *Arabidopsis thaliana* arrivent à maintenir leurs statuts hydriques en développant de nouveaux vaisseaux du xylème aux niveaux racinaire et foliaire ainsi qu'au niveau de l'hypocotyle. Ce phénomène appelé la transdifférenciation (Reusche et al., 2012 ; Reusche et al., 2013) permettrait de compenser la perte fonctionnelle des vaisseaux colonisés. Il est intéressant de noter qu'une plante infectée par *V. longisporum* résiste mieux au stress hydrique qu'une plante non infectée (Reusche et al., 2012).

La plupart des phytopathogènes vasculaires infectent leurs hôtes *via* des blessures ou les fissures qui peuvent apparaître au niveau des sites de formation des racines latérales (Vicente et al., 2001 ; Pietro et al., 2003 ; Fradin and Thomma, 2006 ; Eynck et al., 2007 ; Michielse and Rep, 2009 ; Genin, 2010 ; Chalupowicz et al., 2012). En effet, un épiderme et un endoderme intacts sont des barrières physiques efficaces, bloquant l'accès aux vaisseaux du xylème. Certains pathogènes vasculaires sont introduits directement dans le xylème par des insectes vecteurs se nourrissant de la sève du phloème ou au moment de la mastication des tissus par les insectes de la famille des *Scolytinae*. D'autres entrent par les ouvertures naturelles telles que les hydathodes ou les stomates (Niño-Liu et al., 2006). Dans tous les cas, ces pathogènes arrivent à accéder et à coloniser les vaisseaux du xylème. L'infection est rendue systémique grâce à la production de conidies ou par la multiplication rapide par scissiparité dans le cas des bactéries. Ces cellules néoformées sont transportées vers tous les tissus par le flux de transpiration. A la fin de leur cycle de vie, les pathogènes produisent des structures de dormance qui vont subsister plusieurs années dans le sol ou conservées dans des débris végétaux (Agrios, 2004).

Les méthodes de contrôle classiques sont peu efficaces contre les pathogènes vasculaires à cause de leur confinement dans le xylème, et de la formation des structures de dormance. La fumigation, la solarisation et la rotation de culture sont souvent utilisées (Klosterman et al., 2009). Toutefois, elles sont limitées en efficacité à grande échelle et/ou sont très coûteuses. A partir de l'année 2014, la réglementation sur l'utilisation de traitements chimiques sera renforcée par la Directive n° 2009/128/CE du 21/10/09 du Parlement et du Conseil Européens pour favoriser l'utilisation de méthodes qui préservent l'environnement (http://www.ineris.fr/aida/consultation_document/733). Ainsi, des méthodes biologiques sont à l'étude. La plupart sont basées sur l'utilisation d'agents biologiques qui vont entrer en compétition avec les micro-organismes pathogènes ou augmenter le niveau de défense des plantes. Parmi les microorganismes qui ont montré des résultats prometteurs, il y a *Bacillus subtilis* HJ5 (Li et al., 2013a) et *Pseudomonas fluorescens* (Mercado-Blanco et al., 2004 ; Prieto et al., 2009 ; Schilirò et al., 2012). Toutefois, l'efficacité des agents biologiques est

Tableau 1 : Génomes de micro-organismes pathogènes vasculaires séquencés.

| Règnes | espèces | Références |
|-------------|--|---|
| Champignons | <i>Verticillium dahliae</i> | Klosterman et al., 2011 |
| | <i>Verticillium alfalfae</i> | Klosterman et al., 2011 |
| | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> | Ma et al., 2010 |
| Bactéries | <i>Ralstonia solanacearum</i> | Salanoubat et al., 2002 |
| | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | Lee et al., 2005 |
| | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | Qian et al., 2005 |
| | <i>Xylella fastidiosa</i> | Simpson et al., 2000 |
| | <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i> | Gartemann et al., 2008 |
| | <i>Erwinia amylovora</i> | Sebahia et al., 2010 ; Smits et al., 2010 ; Powney et al., 2011 |
| Oomycètes | <i>Pythium ultimum</i> | Lévesque et al., 2010 |

affectée par les facteurs biotiques et abiotiques au champ. La meilleure méthode de contrôle reste la sélection de variétés résistantes. Contrairement aux agents pathogènes foliaires, les connaissances sur les facteurs de pouvoir pathogène des pathogènes racinaires ou vasculaires ainsi que sur les mécanismes de résistance chez les plantes qu'ils attaquent sont moins avancées. Cela est probablement lié au fait que la rhizosphère est plus complexe et que le xylème est moins facile d'accès pour les analyses. L'impact économique de ces pathogènes et l'absence de traitements efficaces justifient l'intérêt grandissant pour leur étude. Cet intérêt est reflété par le séquençage récent du génome de plusieurs pathogènes vasculaires (**Tableau 1**). La sélection de variétés résistantes nécessite une compréhension de la biologie du pathogène mais aussi des mécanismes à l'origine de la résistance.

II. La verticilliose

La verticilliose est une trachéomyose provoquée par les espèces du genre *Verticillium* affectant des plantes annuelles et vivaces, des arbres fruitiers et ornementaux ainsi que des arbustes dans les régions tempérées, subtropicales voire tropicales (Pegg and Brady, 2002 ; Fradin and Thomma, 2006 ; Klosterman et al., 2009). Parmi les plantes à intérêt agronomique les plus touchées, on compte le coton (*Gossypium* spp.), la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), les Cucurbitaceae, le fraisier (*Fragaria grandiflora* Ehrh.), la menthe (*Mentha piperita* L.), le tournesol (*Helianthus annuus* L.), l'aubergine (*Solanum melongena* L.), le colza (*Brassica napus*) et l'olivier (*Olea europaea* L.). Son large spectre d'hôtes et la difficulté de contrôler la maladie par une lutte chimique ou des pratiques culturales font de *Verticillium* l'un des pathogènes les plus dévastateurs dans le monde, provoquant plusieurs milliards de pertes annuelles. De ce fait, la sélection de variétés résistantes est le seul moyen efficace pour le contrôle de la maladie (Fradin and Thomma, 2006). Une fois installée, la verticilliose est

chronique dans les champs. Chez la luzerne par exemple, la plupart des cultivars sont sélectionnés pour leur résistance à la verticilliose. Tous les cultivars, même résistants, renferment des plantes qui présentent des symptômes. Les études montrent que la résistance est contrôlée par plusieurs gènes mais très peu de choses sont connues en ce qui concerne les mécanismes moléculaires. Ce chapitre aborde la verticilliose, les symptômes, les espèces fongiques, les plantes hôtes, le cycle de maladie, l'importance économique et écologique et la gestion de la maladie. Les mécanismes de résistance contre la verticilliose seront traités dans le chapitre suivant.

1. *Verticillium* sp. : l'agent causal de la verticilliose

Le genre *Verticillium* a une longue histoire taxonomique. Il a été évoqué pour la première fois en 1816 par von Nees. Il désignait un groupe de Deutéromycètes caractérisés par un conidiophore verticillé, d'où le nom *Verticillium* (Isaac, 1967 ; Pegg and Brady, 2002). A l'époque, cette définition incluait plus de 50 espèces dont des parasites d'insectes, de nématodes ou d'autres champignons, et un groupe d'espèces particulières qui provoquent des maladies de flétrissement vasculaires chez les dicotylédones. Ces dernières se distinguent des autres par le fait qu'elles forment des structures de dormance. Dans ce groupe, on trouve *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. tricorpus* et *V. nigrescens* (Gams and Zaayen, 1982). L'agent causal le plus important économiquement et le plus étudié est *V. dahliae* Klebahn, mais *V. albo-atrum* et *V. longisporum* provoquent aussi d'importantes pertes économiques (Klosterman et al., 2009). *V. dahliae*, l'espèce type du genre, a un très large spectre d'hôte, infectant la tomate, le coton, l'olivier, la laitue et la pomme de terre entre autres. Chez la pomme de terre, le taux de perte peut atteindre 50% mais varie généralement entre 10 et 15% (Powelson and Rowe, 1993 ; Rowe and Powelson, 2002), alors que chez la laitue, on peut observer jusqu'à 100% de perte (Subbarao et al., 1997). *V. albo-atrum* affecte essentiellement le houblon, la tomate et la pomme de terre (Heale, 2000). Ces deux espèces peuvent donc infecter les mêmes plantes, mais se différencient à la fois par leurs structures de dormance et par leurs distributions

géographiques qui est en lien direct avec leurs températures de croissance optimale (Pegg and Brady, 2002). En effet, la température optimale de croissance de *V. albo-atrum* est comprise entre 20 et 25°C alors que *V. dahliae* préfère des températures plus élevées, entre 25 et 28°C.

La première souche de *Verticillium* a été isolée en 1879 à partir de la pomme de terre par Reinke et Berthold. Ils décrivaient une souche de champignon provoquant une maladie de flétrissement vasculaire, avec du mycélium blanc et des structures de dormance brunes foncées voire noires (termes exactes : "Dauermycelien", "Sklerotien" or "Zellhauf"), et la nommaient *V. albo-atrum* du latin *alba* et *atra* qui signifient blanc et noir (Reinke and Berthold, 1879). En 1913, une souche de *Verticillium* morphologiquement différente de *V. albo-atrum* et formant des microsclérotés a été isolée par Klebahn à partir du dahlia (*Dahlia* sp. cv. Geiselher) en Allemagne, et a été nommée *V. dahliae* (Isaac, 1967 ; Pegg and Brady, 2002). Dans les années 1950 une souche de *Verticillium* qui s'attaque spécifiquement aux espèces de la famille des *Brassicaceae* a été rapportée pour la première fois (Isaac, 1957a). Cette souche qui produisait des microsclérotés comme *V. dahliae* mais des spores beaucoup plus longues que les deux autres espèces, a été nommée *V. dahliae* var. *longisporum*.

La taxonomie du genre *Verticillium* a subi plusieurs modifications au cours de l'histoire en fonction de l'évolution des méthodes d'analyses. La classification des souches de *V. albo-atrum* et des souches de *V. dahliae* var. *longisporum* a posé plus de difficultés.

a) *V. albo-atrum*

L'espèce historique *V. albo-atrum* regroupait des souches isolées à partir de différents hôtes dont la pomme de terre, le houblon, la tomate ou encore *Medicago sativa* L. (alfalfa ou luzerne). Une souche provoquant des symptômes de flétrissement sur la luzerne a été rapportée pour la première fois en 1918 en Suède (Hedlund, 1923). Elle a été désignée comme étant une souche de *V. albo-atrum* sur la base de ses caractéristiques morphologiques. Plusieurs études de pathogénicité et de génétique moléculaire montrent que les souches isolées à partir de la luzerne sont différentes des

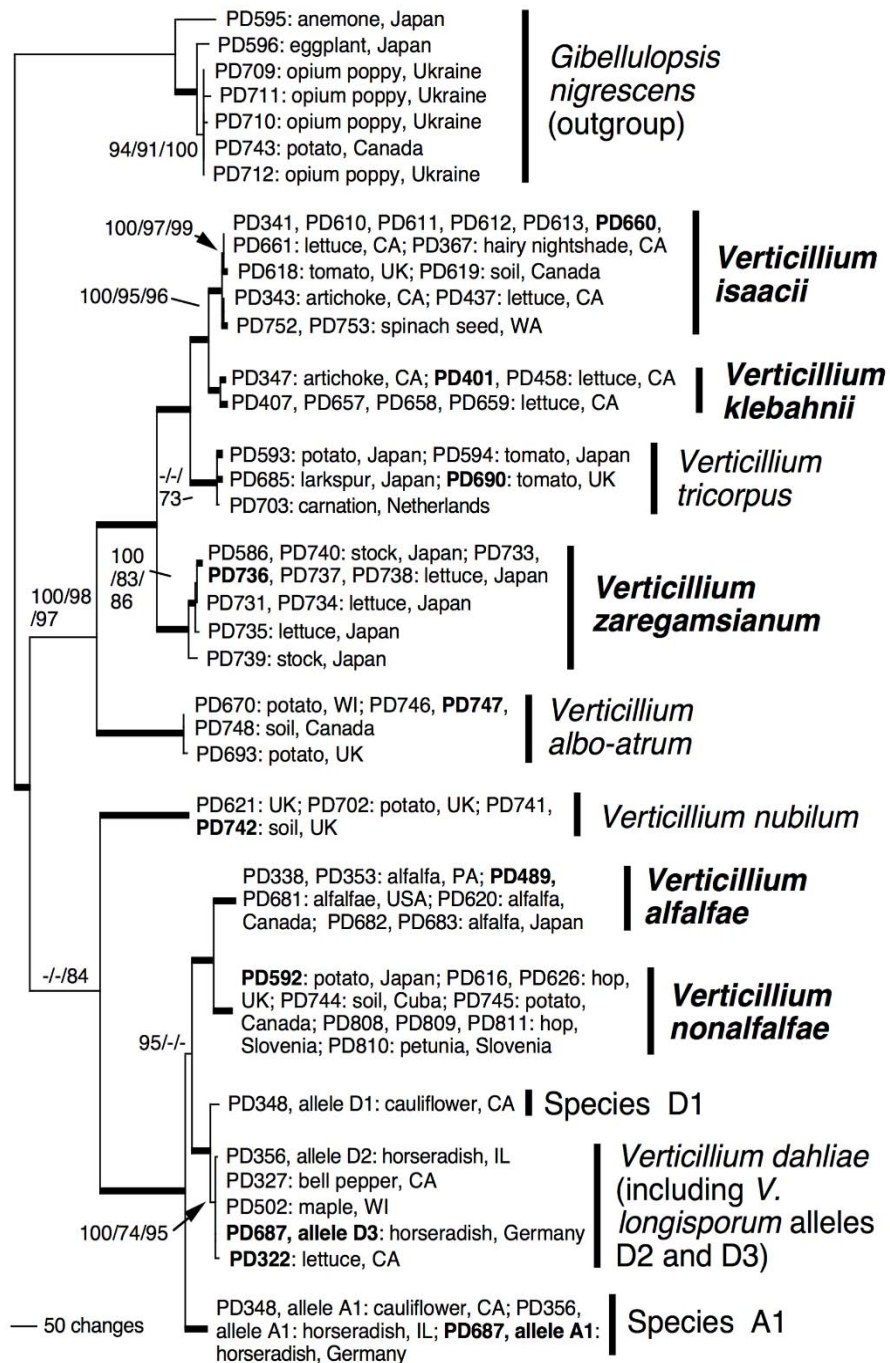


Figure 3 : Relations phylogéniques des dix espèces de *Verticillium* basées sur des analyses qui combinent les séquences ITS (internal transcribed spacer region) et des séquences partielles des gènes codant pour l'actine, l'"elongation factor 1-alpha", la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase et la tryptophane synthase.

autres souches de *Verticillium* y compris celles de *V. albo-atrum* isolées de la pomme de terre (Carder and Barbara, 1991 ; Typas et al., 1992 ; Griffen et al., 1994). Déjà en 2002, Pegg et Brady (2002) avait proposé de créer une nouvelle espèce qui contiendrait seulement les souches adaptées à la luzerne.

b) La nouvelle taxonomie

Tout récemment, la taxonomie du genre *Verticillium* a été revue (Inderbitzin et al., 2011 ; 2013). Le genre *Verticillium*, aussi appelé *Verticillium sensu stricto* fait partie des *Ascomycètes*, de la classe des *Sordariomycètes*. Il est placé dans la famille des *Plectosphaerellaceae* qui est proche des *Colletotrichum*, un autre groupe de phytopathogènes (Zare et al., 2007). Dans la nouvelle taxonomie (**Figure 3**), trois différentes espèces ont été dérivées à partir des espèces historiques *V. albo-atrum* et *Verticillium tricorpus*, et une nouvelle espèce, *V. zaregamsianum* a été identifiée. Ainsi, le genre *Verticillium* contient maintenant dix espèces phytopathogènes vasculaires des dicotylédones avec des conidiophores verticillés qui produisent des structures de dormance de couleur brune : *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *V. alfalfae*, *V. longisporum*, *V. nonalfalfae*, *V. tricorpus*, *V. zaregamsianum*, *V. nubilum*, *V. isaacii* et *V. klebahnii*. Les structures de dormance ont une importance au niveau taxonomique. Ainsi, *V. albo-atrum* forme des amas de mycélium avec des pigments bruns (Dark Resting Mycelium, DRM), *V. nubilum* produit des chlamydospores, *V. dahliae* et *V. longisporum* produisent des microsclérotés, et *V. tricorpus* produit les trois types de structure de dormance (Isaac, 1953 ; Karapapa et al., 1997). Les trois différentes espèces dérivées à partir de l'espèce historique *V. albo-atrum* sont : *V. albo-atrum* (pathogène de la pomme de terre), *V. alfalfae* (pathogène de la luzerne), et *V. nonalfalfae* (spectre d'hôte plus large mais non pathogène de la luzerne) (Inderbitzin et al., 2011 ; 2013). Il est à noter que très peu de souches recensées dans les collections sont des *V. albo-atrum* et qu'il est impossible de différencier *V. alfalfae* de *V. nonalfalfae* ou de *V. albo-atrum* en se basant sur leurs morphologies. Toutefois, au niveau moléculaire, tous les

isolats de *V. alfalfae* portent l'allèle "mating type 1-1" (MAT1-1) alors que les isolats de *V. nonalfalfae* portent l'allèle MAT1-2 (Inderbitzin et al., 2011 ; 2013).

c) *V. longisporum*

En ce qui concerne *V. dahliae* var. *longisporum*, celui-ci cause énormément de dégâts dans les champs de colza (*Brassica napus*) en Suède, Allemagne, France et Pologne. Toutes les souches appartenant à cette espèce sont pathogènes de *Brassicaceae* comme le colza (*Brassica napus*), l'arabette (*A. thaliana*), le chou (*Brassica oleracea*) ou encore le radis (*Raphanus sativus*). Contrairement à la majorité des ascomycètes, ces souches sont des diploïdes stables (Ingram, 1968), et contiennent presque deux fois le génome de *V. dahliae* (Inderbitzin et al., 2011b). Depuis une dizaine d'années il a été décidé de l'ériger en une nouvelle espèce, *V. longisporum*, qui comporte des isolats à longues spores adaptés aux *Brassicaceae* (Karapapa et al., 1997 ; 2000 ; Zeise and Von Tiedemann, 2002). *V. longisporum* renferme trois groupes d'isolats (au moins) qui ont évolué indépendamment par hybridation entre deux lignages de *V. dahliae* (D2 et D3) et deux espèces inconnues (Inderbitzin et al., 2011b). Les deux génomes inconnus sont absents des collections existantes, excepté en tant que parents de *V. longisporum*. Ils ont été nommés espèces A1 et D1. Les trois lignages de *V. longisporum* sont issus de l'hybridation entre l'espèce A1xD1, A1xD2, et A1xD3.

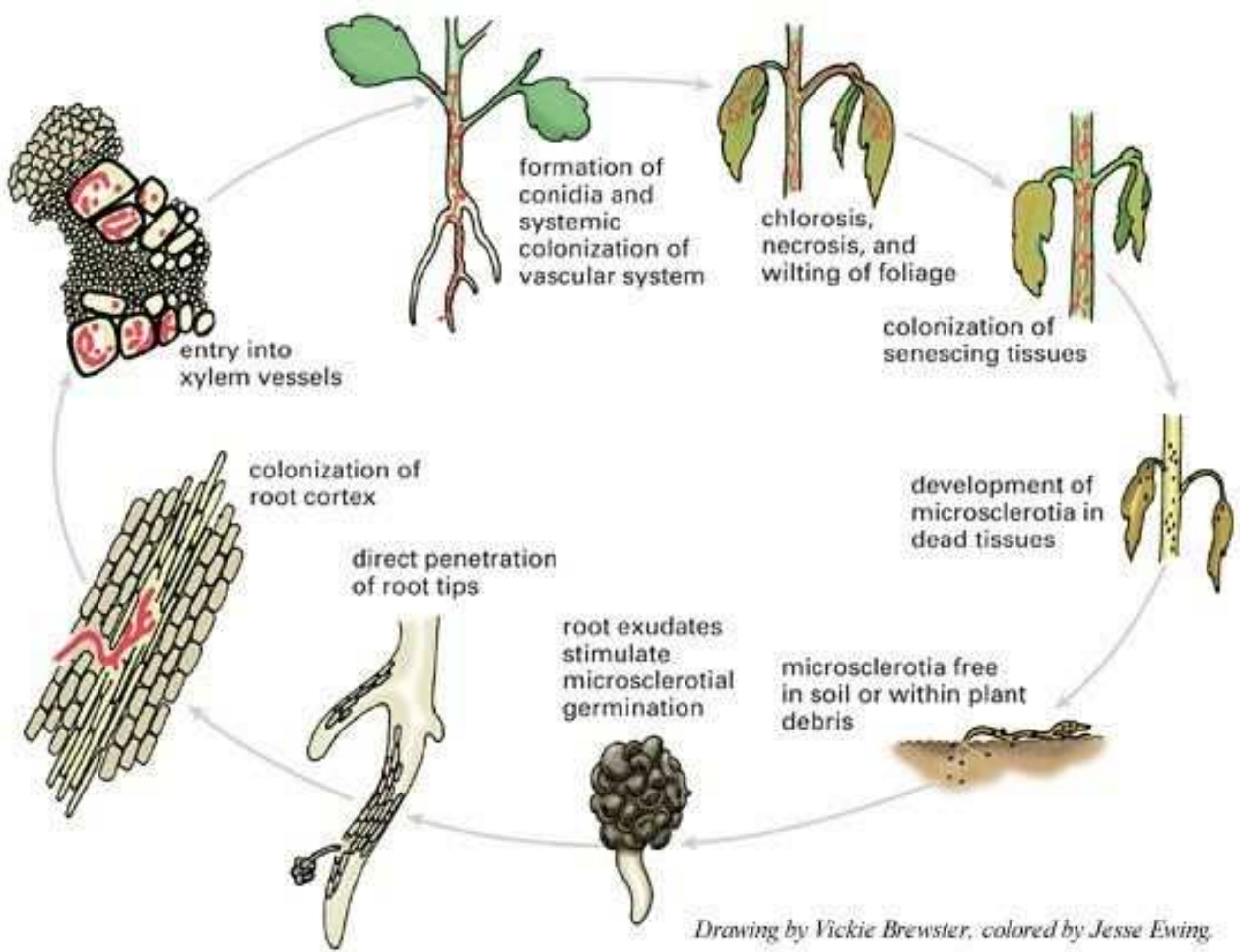


Figure 4 : Cycle de maladie de *Verticillium* sp. (Berlanger and Powelson, 2000).

2. Cycle de la maladie

Le cycle d'infection est très similaire chez *V. albo-atrum*, *V. longisporum* et *V. dahliae* (Pegg and Brady, 2002 ; Johansson et al., 2006 ; Eynck et al., 2007 ; Vallad and Subbarao, 2008). Il peut être divisé en trois phases : la phase de dormance, la phase d'infection, et la phase saprophyte (**Figure 4**). Dans la phase de dormance, qui commence lorsque les conditions ne sont plus favorables pour la croissance, le pathogène forme des structures de survie qui peuvent persister jusqu'à plus d'une dizaine d'années dans le sol et constituent une source d'inoculum. Dans la nature, la germination est induite par les exsudats racinaires des plantes qu'elles soient hôtes ou non (Mol and Riessen, 1995). Pour atteindre les racines, la croissance de l'hyphes néoformée se ferait dans le sens d'un gradient de nutriments (Huisman, 1982).

Au début de la phase d'infection, *V. longisporum* et *V. dahliae* pénètrent directement les cellules de l'épiderme racinaire (Eynck et al., 2007 ; Vallad and Subbarao, 2008). *Verticillium* ne produit pas d'appressorium, l'entrée de l'hyphes peut être facilitée par les blessures ou les fissures au niveau de sites de formation de racines latérales (Pegg and Brady, 2002 ; Eynck et al., 2007). Pour accéder aux vaisseaux du xylème, les hyphes se développent dans le cortex en direction de l'endoderme. Des observations cytologiques montrent que le xylème est l'habitat préféré de *Verticillium* sp. plutôt qu'un habitat accidentel (Selman and Buckley, 1959 ; Pegg, 1965). L'endoderme est une barrière physique qui est renforcée par la production de subérine (Talboys, 1958 ; Bishop and Cooper, 1983) ; pour la traverser, le champignon profiterait des zones endommagées ou de la zone d'élongation de la racine où l'endoderme est fin (Pegg and Brady, 2002). Une fois dans le xylème, le pathogène reste confiné dans les vaisseaux. La vitesse de colonisation par croissance végétative est très faible due à la pauvreté du milieu (Presley et al., 1966). Pour la colonisation systémique, *Verticillium* produit des spores qui seront transportées par le flux de sève dans le xylème (Eynck et al., 2007 ; Vallad and Subbarao, 2008). Dans les vaisseaux du xylème, les conidies sont stoppées au niveau des ponctuations et des parois des extrémités des vaisseaux (perforations). Ces conidies néoformées germent et les hyphes accèdent aux vaisseaux adjacents ;

la colonisation se poursuit ainsi de suite (Eynck et al., 2007). Ce mode de colonisation explique les observations de mycélium discontinu dans les vaisseaux mais aussi la rapidité de la colonisation (Heinz et al., 1998 ; Chen et al., 2004). A l'exception de *V. longisporum*, les espèces de *Verticillium* induisent des symptômes de flétrissement foliaire. Certains pensent que les symptômes de flétrissement et de brunissement sont causés par l'activité du champignon qui produit des enzymes de dégradation et des toxines. D'autres pensent que c'est la conséquence de la réponse de l'hôte (Robb et al., 2012). Certains de ces mécanismes de défense comme la production de lignine, de callose et de subérine s'ajoutent à la présence d'une biomasse importante du pathogène, et contribuent à boucher les vaisseaux du xylème (Pegg and Brady, 2002 ; Fradin and Thomma, 2006 ; Klosterman et al., 2009 ; Robb et al., 2012).

Dans les phases tardives du cycle (phase saprophyte), le champignon sort du cylindre central et colonise tous les tissus de la plante. Il forme alors les structures de dormance dans le parenchyme (Schnathorst, 1981 ; Neumann and Dobinson, 2003). Ces structures vont se retrouver encastées dans les débris de la plante morte et constituent une source d'inoculum qui peut persister plusieurs années dans le sol (Pegg and Brady, 2002).

3. Mécanismes de transmission et dispersion

Les pathogènes du sol ne se disséminent pas facilement sur de longues distances. L'introduction dans un champ dépend donc beaucoup des pratiques culturales. En effet, le transport de terre, de plantes avec un sol d'accompagnement (bulbes et tubercules), de graines, de débris végétaux, de greffons, de plantes de pépinières ou de toute autre matériel végétal contaminé est le mode de dissémination le plus courant vers de nouvelles zones de cultures. La dissémination peut aussi se faire par le vent et l'eau d'irrigation (Pegg and Brady, 2002). Le premier et le plus rapide des moyens de transmission de *Verticillium* reste le contact racinaire. Toutefois les outils contaminés jouent aussi un rôle important dans la contamination de plantes saines comme dans le cas de la luzerne qui est fauchée plusieurs fois lors d'un cycle de culture (Acharya and Huang, 2003). C'est pourquoi des restrictions sur les déplacements de matériel de plantation, de sol et de machines sont

Tableau 2 : Pertes économiques causées par la verticilliose.

| Plante hôte | Production annuelle globale (moyenne 2005-2010) | | Perte estimée | | Perte maximale |
|-------------------------|--|-------------|---------------|---------|----------------|
| | Mio. \$ | Mio. Tonnes | Mio. Tonnes | Mio. \$ | % |
| Tomate | 71,07 | 140,95 | 1,41 | 710,72 | 70 |
| Pommes de terre | 70,7 | 326,02 | 3,26 | 707,03 | 50 |
| Coton | 35,47 | 23,52 | 0,24 | 354,72 | 30 |
| Colza | 20,65 | 54,98 | 0,55 | 206,53 | 50 |
| Pastèque | 21,16 | 95,62 | 0,96 | 211,61 | |
| Olivier | 21,05 | 17,7 | 0,18 | 210,46 | 75 |
| Piments et poivrons | 17,88 | 27,65 | 0,28 | 178,77 | 20 |
| Concombre | 17,26 | 55,53 | 0,56 | 172,6 | |
| Choux | 16,89 | 64,66 | 0,65 | 168,93 | |
| Laitue | 13,95 | 23,56 | 0,24 | 139,47 | 100 |
| Tabac | 12,48 | 6,69 | 0,07 | 124,78 | 30 |
| Aubergine | 12,22 | 38,32 | 0,38 | 122,15 | 70 |
| Tournesol | 10,33 | 31,7 | 0,32 | 103,3 | 55 |
| Fraise | 8,75 | 4,14 | 0,04 | 87,48 | |
| Epinards | 6,41 | 17,16 | 0,17 | 64,1 | |
| Chou-fleur (et brocoli) | 6,39 | 18,56 | 0,19 | 63,93 | |
| Pistachier | 3,26 | 0,73 | 0,01 | 32,62 | |
| Avocat | 3,01 | 3,73 | 0,04 | 30,08 | |
| Lentilles | 1,96 | 3,07 | 0,04 | 19,61 | |
| Artichaut | 1,15 | 1,44 | 0,01 | 11,45 | |
| Houblon | 586 | 0,13 | 0 | 5,86 | 100 |
| Alfalfa | nb | nb | nb | nb | 50 |

Mio. : millions

Données compilées par Magdalena Siebold (non publié) d'après les chiffres du FAO
Donnée présentées au 11th International Verticillium Symposium 2013.

prises en place afin d'éviter la dissémination.

4. Importance économique et écologique

De toutes les espèces du genre *Verticillium*, *V. dahliae* est la plus néfaste à cause de son large spectre d'hôtes et de la persistance de ces microsclerotia. En Amérique du nord, la verticilliose est la maladie la plus destructrice en ce qui concerne les cultures de tomate et la deuxième en ce qui concerne la pomme de terre. Les cultures les plus touchées en termes de pertes annuelles sont de loin la tomate et la pomme de terre avec une perte annuelle mondiale estimée à plus de 700 millions d'euros (Tableau 2).

Les isolats de *Verticillium* sont décrits comme étant adaptés à un hôte plutôt que spécifiques à un hôte. En effet, un isolat peut induire des symptômes chez plusieurs espèces de plantes différentes mais il sera toujours plus virulent chez l'hôte à partir duquel il a été isolé (Malcolm et al., 2013). Il existe une longue liste de plantes reportées comme étant hôtes de *Verticillium* (Pegg and Brady, 2002). Les espèces hôtes semblent être restreintes aux dicotylédones, mais l'utilisation de méthodes pour détecter la présence du champignon *in planta* montre que celui-ci est capable d'infecter et de coloniser les monocotylédones (Malcolm et al., 2013). Aussi, en 1986, un cas de verticilliose causé par *V. dahliae* a été rapporté chez le blé (Mathre, 1986 ; Mathre, 1989). Parmi les dicotylédones, il existe des espèces sauvages asymptomatiques et symptomatiques comme *Trifolium* sp et *Capsella bursa-pastoris* respectivement (Ligoxigakis et al., 2002). Il se peut que des hôtes asymptomatiques soient des plantes utilisées pour la rotation de cultures ou des mauvaises herbes présentes dans les champs de culture et puissent servir de réservoir d'inoculum. Le fait que *Verticillium* puisse être endophyte pour d'autres plantes a donc une certaine importance et doit être considéré dans des schémas de rotation pour le contrôle de la verticilliose ; mais à ce jour, cet aspect n'est pas traité par la recherche.

5. Méthodes de contrôles de la maladie

Tout comme les autres maladies de flétrissement vasculaires, la verticilliose est très difficile à contrôler. Des actions ciblées sur l'inoculum initial (les structures de dormance) par des méthodes physiques (augmentation de la température, solarisation), chimiques (fumigation) peuvent limiter l'étendue de la maladie (Klosterman et al., 2009). L'estimation de la quantité de l'inoculum, la détection et la dégradation des plantes contaminées sont souvent utilisées comme méthode de prévention (Fradin and Thomma, 2006). D'autres mesures comme la lutte biologique (utilisation de micro-organismes antagonistes), des mesures de quarantaines, de traitements des graines et l'interdiction d'exportation de matériel végétal sont aussi mises en place (Pegg and Brady, 2002). Toutefois, toutes ces stratégies montrent peu d'efficacité. Le développement et la sélection de variétés résistantes restent les seules méthodes efficaces.

III. Bases moléculaires de l'interaction entre *Verticillium* et l'hôte

1. Facteurs d'adaptation au xylème

Pour pouvoir pénétrer dans la plante et coloniser le système vasculaire, *Verticillium* doit posséder des "armes moléculaires" telles que des enzymes (ex. cellulases et pectinases) nécessaires à la dégradation des substances pariétales constitutives ou produites par la plante en réponse à l'infection telles que la tylose (Bishop and Cooper, 1984 ; Rioux et al., 1998). Il doit aussi être capable de se développer dans le xylème, qu'on peut représenter comme un système de tuyaux qui transporte de l'eau et des solutés essentiellement inorganiques puisés dans le sol. C'est donc un environnement pauvre en nutriments avec une osmolarité fluctuante (Andersen and Brodbeck, 1989). Ceci expliquerait le fait qu'un nombre très limité de pathogènes soient capables de s'y développer. Par contre, une adaptation à un environnement tel que le xylème permet d'éviter la

compétition avec la majorité des autres microbes, y compris certains endophytes. Après avoir accédé au xylème, *Verticillium* y reste confiné dans la majeure partie de son cycle d'infection (Pegg and Brady, 2002 ; Fradin and Thomma, 2006 ; Eynck et al., 2007). Il est donc capable d'y trouver tout ce dont il a besoin pour sa croissance et pour la production de spores. Les études montrent que dans la sève du xylème du colza, le nitrate, le sulfate, et le phosphate font partie des anions inorganiques les plus abondants alors que le calcium, le potassium, le magnésium, et le manganèse sont les cations inorganiques les plus présents (Nakamura et al., 2008). A des concentrations plus faibles, on y trouve différents carbohydrates, tel que le glucose, le fructose, le saccharose, le maltose, le raffinose, le tréhalose et le ribose, des protéines, des acides aminés et des acides organiques qui peuvent servir de source de nutriments organiques (Nakamura et al., 2008). Toutefois, les quantités sont très faibles et varient selon les conditions de l'environnement et l'espèce de plante (Siebrecht et al., 2003). Il faut noter que les stress biotiques et abiotiques peuvent modifier les concentrations de ces différents éléments (Nakamura et al., 2008). Il semble donc que les pathogènes vasculaires possèdent des systèmes efficaces leur permettant d'acquérir des nutriments pour leur développement malgré toutes ces contraintes.

L'analyse du génome des souches de *Verticillium* peut donner des indications sur les caractéristiques génétiques qui leur permettent de se développer dans le xylème, de produire des spores, et d'induire la maladie. Les génomes d'une souche de *V. dahliae* VdLs.17 isolée de la laitue et d'une souche de *V. alfalfae* VaMs.102 isolée de luzerne ont été séquencés (Klosterman et al., 2011). Ils ont tous deux huit chromosomes. Le génome de *V. dahliae* fait 33,83 Mb et celui de *V. alfalfae* 32,83 Mb. Ils coderaient respectivement pour 10 535 et 10 221 gènes. De plus, le génome mitochondrial de *V. dahliae* est 2,4 fois plus grand que celui de *V. alfalfae* et code pour deux fois plus de gènes. Parmi les gènes annotés, 8 699 sont orthologues (1:1) entre les deux génomes, tandis que 1 357 sont spécifiques à *V. dahliae* et 1 102 sont spécifiques *V. alfalfae* (Klosterman et al., 2011).

Tableau 3 : Enzymes actives sur les carbohydrates identifiées dans le génome de *V. dahliae* et *V. alfalfae* et d'autres ascomycètes dont les génomes ont été séquencés (Klosterman et al., 2011).

| CAZY families | <i>H. jecorina</i> ^a | <i>P. anserina</i> | <i>A. niger</i> | <i>N. crassa</i> | <i>M. oryzae</i> | <i>F. graminearum</i> | <i>F. verticillioides</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>V. albo-atrum</i> | <i>V. dahliae</i> | <i>p-value</i> ^b |
|-------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-----------------------------|
| PL family | 3 | 7 | 8 | 4 | 5 | 21 | 23 | 24 | 34 | 35 | 0.0002 |
| PL1 | 0 | 4 | 6 | 1 | 2 | 9 | 11 | 11 | 16 | 17 | 0.0002 |
| PL3 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 7 | 7 | 7 | 11 | 11 | 0.0003 |
| PL4 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 0.003 |
| PL11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0.0002 |
| GH family | 190 | 226 | 243 | 173 | 232 | 247 | 306 | 368 | 257 | 281 | 0.32 |
| GH6 | 1 | 4 | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 4 | 4 | 0.009 |
| GH15 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3.6e-5 |
| GH33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| GH38 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0.0002 |
| GH49 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.01 |
| GH61 | 3 | 33 | 7 | 14 | 17 | 15 | 13 | 16 | 21 | 27 | 0.07 ^c |
| GH74 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 |
| GH88 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3.6e-5 |
| GH115 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 0.0002 |
| CBM family | 48 | 97 | 71 | 59 | 89 | 97 | 111 | 127 | 104 | 106 | 0.17 |
| CBM1 | 15 | 30 | 8 | 19 | 22 | 12 | 14 | 13 | 26 | 30 | 0.0097 |
| CBM20 | 1 | 3 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 9.1e-5 |
| CBM42 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0.004 |
| GT family | 93 | 86 | 110 | 76 | 92 | 102 | 107 | 124 | 87 | 94 | 0.78 |
| GT48 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 |
| CE family | 17 | 41 | 25 | 23 | 49 | 46 | 56 | 56 | 47 | 48 | 0.22 |

^anoms entiers: *Hypocrea jecorina*, *Podospora anserina*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*.

^bla probabilité que les famille de gènes soient sur- représentées dans les deux génomes de *Verticillium* en comparaison avec la moyenne dans les autres génomes d'ascomycètes (P<0.005).

^cp-value=0 si le génome de *P. anserina* n'est pas pris en compte.

L'acquisition de sources de carbone peut se faire par la dégradation des parois cellulaires constituées de cellulose, hémicellulose, polysaccharides pectiques et glycoprotéines (Carpita and Gibeaut, 1993). La dégradation de ces molécules nécessite une multitude d'enzymes (Mohnen, 2008 ; Yadav et al., 2009). Dans les génomes de *V. dahliae* et *V. alfalfae*, on trouve en toute logique des familles de gènes qui codent pour des enzymes actives sur les carbohydrates, similaires à ceux identifiés chez d'autres ascomycètes pathogènes tels que *Fusarium* spp. et *Magnaporthe grisea* (**Tableau 3**). Ce qui est particulier chez *Verticillium*, c'est que certaines de ces familles, comme la famille des pectate lyases (PL) catalysant la dégradation des constituants de la pectine, sont surreprésentées. Plusieurs autres enzymes comme la famille des α -glucuronyle hydrolases GH88 et GH105 qui dégradent les produits de dégradation des PL sont aussi surreprésentées (Gilkes et al., 1991). Un enrichissement de la machinerie pectinolytique augmente la capacité de *Verticillium* à dégrader les parois des cellules mais aussi les substances pectiques produites suite à l'infection (Klosterman et al., 2011) et favoriserait certainement la colonisation et donc le pouvoir invasif du pathogène (Rioux et al., 1998 ; Clérivet et al., 2000). Cette analyse montre aussi que seuls les pathogènes vasculaires (séquencés à ce jour) possèdent des gènes codant pour des carbohydrate-binding module 1 (CBM1) avec des activités PL. Trois gènes *CBM1-PL* sont retrouvés chez *V. dahliae* et *V. alfalfae*, un seul chez *F. oxysporum* (Espagne et al., 2008). Les CBM1 sont des domaines protéiques capables de fixation à la cellulose et se trouvent souvent dans des enzymes fongiques. En se liant à la cellulose insoluble, ils attachent l'enzyme aux parois cellulaires augmentant ainsi son efficacité (Receveur et al., 2002). Le fait que les *CBM1-PL* soient spécifiques aux pathogènes vasculaires indique une adaptation pour l'utilisation de la pectine des parois cellulaires. Le génome de *V. dahliae* code pour un total de 30 CBM1 dont 26 possèdent des orthologues chez *V. alfalfae* et 28 possèdent un peptide signal, ce qui indique qu'ils seraient sécrétés (Klosterman et al., 2011). L'acquisition de sources carbonées peut se faire aussi par la fixation de CO₂, qui est très présent dans les vaisseaux du xylème. Il a été montré que *V. albo-atrum* est capable de fixer le CO₂. Les tests ont été réalisés avec du ¹⁴CO₂. Les résultats montrent que celui-ci est incorporé dans 42% des protéines du champignon et dans 34% des acides

nucléiques (Hartman et al., 1972). Toutefois le taux de croissance, de sporulation et de formation de structures de survie peuvent varier selon la concentration en CO₂ et en oxygène. Une trop forte concentration en CO₂ (~20%) aura comme effet de diminuer ces paramètres (Ioannou, 1977).

Pour s'adapter à une osmolarité fluctuante, les pathogènes vasculaires devraient posséder des osmorégulateurs. La recherche de gènes spécifiques aux pathogènes vasculaires a révélé la présence de glucane glucosyltransferases, décrits comme étant impliqués dans la production de glucanes osmorégulateurs chez les bactéries (Page et al., 2001). Ces enzymes sont aussi retrouvées chez le pathogène vasculaire *Erwinia chrysanthemi* pour qui elles sont nécessaires à la fois pour l'osmorégulation et la pathogénicité (Page et al., 2001). Malgré le fait que la glucane glucosyltransferase soit très conservée chez les proteobactéries (Bohin, 2000 ; Page et al., 2001), les seuls eucaryotes qui possèdent ces gènes sont un pathogène d'insectes et les champignons pathogènes vasculaires dont *Verticillium* sp. et *F. oxysporum* (Klosterman et al., 2011).

2. Effecteurs et facteurs de virulence

Les effecteurs sont des polypeptides sécrétés par les micro-organismes pathogènes et jouent un rôle primordial dans leur virulence en modifiant la physiologie et la biochimie de l'hôte ainsi que les réponses de défense (van der Does and Rep, 2007 ; Oliva et al., 2010 ; de Jonge et al., 2011). 780 et 759 protéines potentiellement sécrétées ont été identifiées respectivement chez *V. dahliae* et *V. alfalfae*. Parmi celles-ci, 574 sont conservées entre les deux espèces, 206 sont spécifiques à *V. dahliae* et 185 à *V. alfalfae* (Klosterman et al., 2011). Les effecteurs fongiques sont en général des petites protéines (<400 acides aminés) riches en cystéines (≥4 résidus cystéine). Au total 246 protéines correspondent à cette description dont 126 chez *V. dahliae* et 119 chez *V. alfalfae*. Malheureusement aucun ne possède d'orthologue chez d'autres champignons séquencés, à l'exception des homologues de l'effecteur Ecp2 (extracellular protein 2) et Ecp6 (extracellular protein 6) de *C. fulvum*. Toutefois, on peut observer un enrichissement en protéines sécrétées

connues pour jouer un rôle dans la pathogénicité telles que des LysM (lysin motif) et des NEP (necrosis- and ethylene-inducing peptide). En effet, il y a deux fois plus de gènes qui codent pour des effecteurs de type LysM et quatre fois plus de gènes qui codent pour des NEP que chez les autres champignons pathogènes. Il a été montré que ces protéines ont un effet cytotoxique chez les dicotylédones mais pas chez les monocotylédones (Qutob et al., 2006 ; Gijzen and Nürnberger, 2006). Il faut noter que chez *F. oxysporum* on observe aussi un enrichissement en gènes qui codent pour les NEP. Cela pourrait expliquer non seulement la surreprésentation de dicotylédones comme hôtes chez *F. oxysporum*, mais aussi que *Verticillium* spp n'induisent pas de symptômes chez les monocotylédones. Des études plus approfondies sur le sécrétome de ces deux espèces sont nécessaires pour bien identifier les effecteurs. Chez *V. dahliae*, une collection de souches mutantes obtenues par insertion d'ADN grâce à *Agrobacterium tumefaciens* a été créée (Maruthachalam et al., 2011). Parmi ces mutants, 181 n'induisent pas de symptômes sur des semis de laitue, comme par exemple les souches mutées au niveau de gènes codant pour une endoglucanase 1, une hydroxyl-méthyl glutaryl-Co enzyme A synthase et une glycosylphosphatidylinositol mannosyltransferase 3 (Maruthachalam et al., 2011).

En plus des NEP, *V. dahliae* et *V. albo-atrum* produisent d'autres phytotoxines peptidiques cytotoxiques encore non identifiées (Pegg, 1965). Des traitements avec des filtrats de culture de *Verticillium* induisent des chloroses et des nécroses sur des feuilles détachées de variétés sensibles de tomate et de pomme de terre (Buchner et al., 1989 ; Mansoori et al., 1995). Enfin, plusieurs micro-organismes phytopathogènes produisent des phytohormones qui sont souvent impliquées dans leur pouvoir pathogène (Costacurta and Vanderleyden, 1995). Parmi celles qui sont produites par *Verticillium*, on trouve l'IAA (Acide indole 3-acétique), l'éthylène et l'ABA (acide abscissique) (Jr, 1995 ; Tzeng and DeVay, 1984 ; Pegg and Brady, 2002).

3. Types d'interaction observés en réponse à *Verticillium sp.*

Suite à l'infection par *Verticillium*, on peut observer trois types d'interaction possibles : la résistance, la tolérance ou la sensibilité. La résistance à *Verticillium* est généralement définie par une croissance très faible voire nulle du pathogène dans le xylème avec une absence totale de symptômes. La sensibilité est observée lorsque le pathogène prolifère de façon systémique dans la plante conduisant à l'apparition de symptômes sévères. Pour qu'on considère qu'une plante est tolérante, il faut une colonisation systémique mais peu voire pas du tout de symptômes avec un rendement raisonnable (Robb, 2007).

Un allèle de résistance dominant a été identifié chez le tournesol, la pomme de terre, le coton et la tomate (Fick and Zimmer, 1974 ; Lynch et al., 1997 ; Kawchuk et al., 2001 ; Zhang et al., 2012). Les mécanismes de résistance multigéniques impliquent plusieurs gènes ou *loci* dont chacun contribue à part variable à la capacité de la plante de lutter contre l'agent pathogène. Ces gènes vont ralentir ou contenir la colonisation de l'hôte toute en réduisant les dommages causés par l'infection (Agrios, 2004). Une résistance multigénique a été observée chez plusieurs espèces de plantes dont la pomme de terre, le coton, alfalfa, *A. thaliana*, le houblon et le colza (Simko et al., 2004 ; Vandemark et al., 2006 ; Rygulla et al., 2008 ; Wang et al., 2008 ; Häffner et al., 2010 ; Jakse et al., 2013). *Verticillium sp.* est capable de pénétrer l'épiderme et d'accéder au tissu cortical de tout hôte que celui-ci soit sensible ou à résistance qualitative ou quantitative. Les mécanismes de résistance peuvent être efficaces contre *Verticillium* durant la phase pré-vasculaire et vasculaire (Talboys, 1964). Des défenses structurales et biochimiques sont mises en place en réponse à l'infection à *Verticillium sp.* (Fradin and Thomma, 2006). Ce qui différencie la résistance et la sensibilité est très souvent l'intensité et le "timing" d'induction des mécanismes de défense (Lynch et al., 1997).

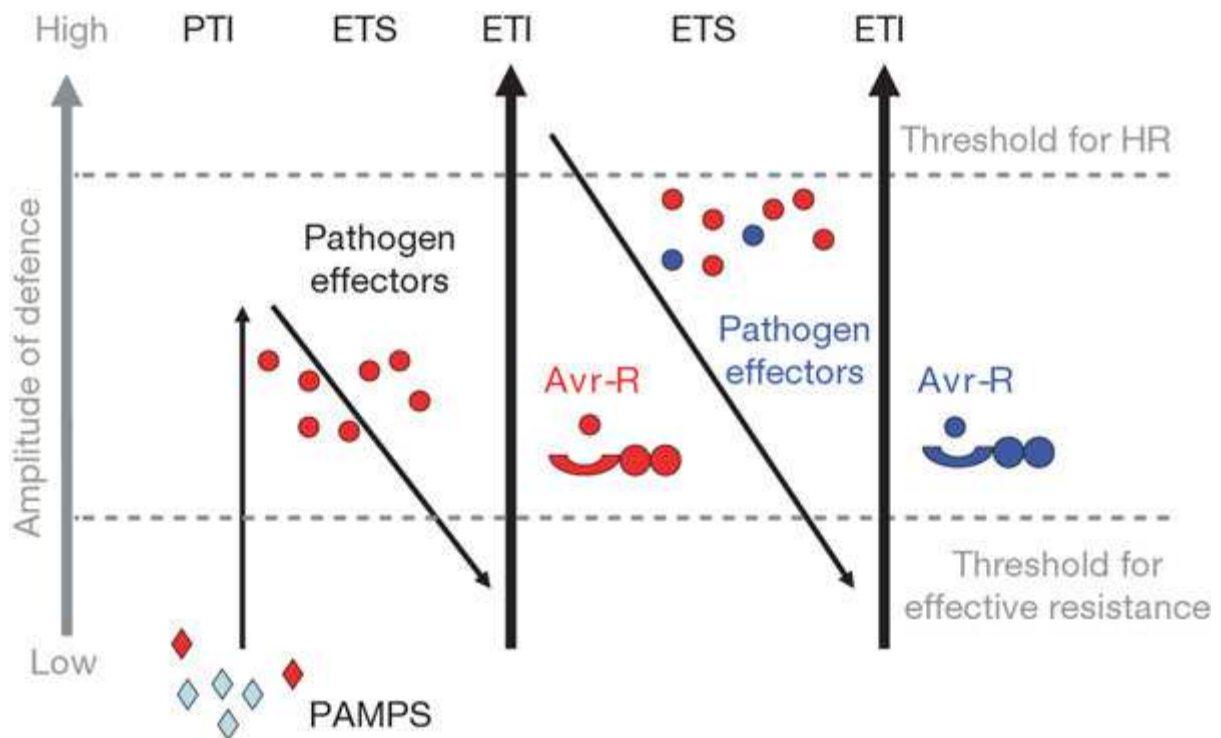


Figure 5 : Illustration du modèle des interactions plantes-pathogènes en zigzag (Jones et Dangl, 2006). PTI =PAMP-triggered immunity; ETS = effector-triggered susceptibility ; ETI = effector-triggered immunity. Dans la première phase, la plante détecte les PAMPs (diamant rouge) grâce à une PRR et induit une PTI. Dans la phase 2, le pathogène produit des effecteurs pour déstabiliser la PTI ou favoriser la nutrition et la colonisation, provoquant une ETS. Dans la phase 3, une protéine R reconnaît un effecteur appelé Avr indiqué en rouge, activant l'ETI, qui se manifeste le plus souvent par une réponse d'hypersensibilité (mort cellulaire programmée). Dans la phase 4, les isolats qui ont perdu l'effecteur Avr sont sélectionnés, et un autre effecteur (en bleu) peut supprimer l'ETI. La sélection favorise de nouveaux allèles de protéines R capables de reconnaître les nouveaux effecteurs acquis, provoquant de nouveau une ETI.

IV. Mécanismes de défense des plantes, notamment contre la verticilliose

1. Défenses préformées et induites

Les plantes possèdent des barrières naturelles physiques et chimiques préformées pour empêcher la pénétration du tissu et l'invasion du système vasculaire par des microbes. La surface externe de la plante constitue sa première barrière sur laquelle le pathogène doit adhérer pour initier le processus d'infection. Parmi les barrières structurales, on peut compter la cire et la cuticule qui recouvrent les cellules de l'épiderme, la taille, la position et la forme des stomates et des lenticelles et la paroi cellulaire épaisse, dans le cas d'es pathogènes foliaires. L'endoderme, le diamètre des vaisseaux xylème et des perforations jouent un rôle important dans la résistance contre les pathogène vasculaires. De plus, les plantes produisent naturellement une variété de molécules qui ont des effets antimicrobiens. On peut citer les métabolites secondaires comme les phytoanticipines et les saponines (Mysore and Ryu, 2004). Il est évident que les caractéristiques structurales de la plante permettent un niveau de protection de base contre les infections. Cependant, certains microbes entrent naturellement ou grâce à des vecteurs dans les tissus de la plante. Pour autant, ils sont incapables d'initier la colonisation. Pour ces micro-organismes, les barrières chimiques sont donc plus importantes dans la résistance contre l'infection que les barrières physiques (Agrios, 2004).

Ce niveau de défense naturel est efficace pour arrêter la plupart des tentatives d'intrusion, mais une petite partie des micro-organismes est capable de surmonter cette première ligne de défense et d'initier la colonisation. Les plantes peuvent alors répondre par des mécanismes de défenses induits. Ainsi, les plantes et les microbes sont engagés dans une "bataille" permanente de domination (Bent and Mackey, 2007). Cette "bataille" est régie par deux niveaux de défense induite issus de la coévolution entre le pathogène et son hôte (Jones and Dangl, 2006) (**Figure 5**). Dans les chapitres suivants, seront discutés les mécanismes défenses des plantes en général tout en mettant l'accent sur

Tableau 4 : PAMPs et DAMPs identifiés et reconnaissance par les plantes (Postel et Kemmerling, 2009).

| PAMP | Motif minimum | Origine | plantes sensibles |
|--|--|--|---|
| Flagelline | flg22 | Bactéries à Gram-négatif | Tomate, <i>A. thaliana</i> |
| Elongation factor (EF-Tu) | elf18 | Bactéries à Gram-négatif | <i>A. thaliana</i> , autre <i>Brassicaceae</i> |
| Transglutaminase | motif Pep-13 | Oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp.) | Persil, pomme de terre, la vigne, le tabac, <i>N. benthamiana</i> |
| Xylanase | TKLGE pentapeptide | Champignons (<i>Trichoderma</i> spp.) | Tabac, tomate |
| Cold shock protein | motif RNP-1 | Bactéries à Gram-négatif, bactéries à gram-positif | Solanaceae |
| Cellulose-binding elicitor lectin (CBEL) | Domaine de fixation de la cellulose | Oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp.) | Tabac, <i>A. thaliana</i> |
| Lipid-transfer proteins (elicitins) | non identifié | Oomycètes (<i>Phytophthora</i> spp., <i>Pythium</i> spp.) | Tabac, navet, <i>Raphanus sativus</i> |
| Harpin (HrpZ) | non identifié | Bactéries à Gram-négatif (<i>Pseudomonads</i> , <i>Erwinia</i>) | Concombre, tabac, tomate, <i>A. thaliana</i> |
| Necrosis-inducing proteins (NLP) | non identifié | Bactéries (<i>Bacillus</i>), champignons (<i>Fusarium</i>), oomycètes (<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i>) | plantes dicotylédones |
| Sidérophores | non identifié | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Tabac |
| Invertase | Peptide N-mannosylaté | Levure | Tomate |
| Peptidoglycane | Muropéptides | Bactéries à gram-positif | <i>A. thaliana</i> , tabac |
| Chitine | Chitine oligosaccharides (degré de polymérisation >3) | Tous les champignons | Tomate, <i>A. thaliana</i> , riz, blé, orge |
| β-Glucanes | Tetraglucosyle glucitole, hepta-β-glucoside branché, oligo-β-glucosides lineaire | Champignon (<i>Pyricularia oryzae</i>), oomycètes (<i>Phytophthora</i>), algues brunes | Tabac, riz, <i>Fabaceae</i> |
| Fucanes sulfatés | Fucane oligosaccharide | Algues brunes | Tabac |
| Lipopolysaccharide | Lipide A lipooligosaccharides | Bactéries à Gram-négatif (<i>Xanthomonads</i> , <i>Pseudomonads</i>) | Poivre, tabac |
| Rhamnolipides | Mono-/dirhamnolipides | <i>Pseudomonas</i> | Raisin |
| Ergosterole | | Tous les champignons | Tomate |
| Cerebrosides A, C | Base sphingoïde | champignon (<i>Magnaporthe</i> spp.) | Riz |
| DAMP | Motif minimum | Origine | plantes sensibles |
| Oligouronides | Oligomères | Pectines des parois cellulaires | Tabac, <i>A. thaliana</i> |
| Cellodextrines | Oligomères | cellulose des parois cellulaires | Raisin |
| Monomères de cutine | Dodecan-1-ol | Cuticule des plantes | Concombre, tomate, pomme |

les mécanismes de défenses ayant lieu au niveau vasculaire.

2. La perception des pathogènes

Le premier niveau de défense induite est activé par la détection par des récepteurs protéiques de la plante, de molécules signalant la présence du microbe (le "non-soi") ou de molécules signalant des dommages causés par le microbe au sein de la plante (le soi altéré) (Sanabria et al., 2008). Les molécules capables d'induire des réactions de défense sont appelées éliciteurs. Deux catégories d'éliciteurs peuvent être distinguées : les éliciteurs dérivés de la plante aussi nommées DAMPs (damage-associated molecular patterns) et les molécules issues du microbe, les MAMPs ou PAMPs (microbe-associated molecular patterns, pathogen-associated molecular patterns) (Albert, 2013). Les premiers DAMPs identifiés sont les oligogalacturonides issues de la dégradation des parois végétales des plantes par des pectate lyases des champignons (Sharp et al., 1984). Chez les bactéries, *Erwinia carotovora* et *carotovora* et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sont connues pour induire la production de DAMPs. Dans les deux cas, il y a relargage d'oligogalacturonides suite à la dégradation des parois cellulaires (Nothnagel et al., 1983 ; Vorhölter et al., 2012) (**Tableau 4**). Le récepteur WAK1 (wall-associated kinase 1) d' *A. thaliana* est capable de reconnaître la présence d'oligogalacturonides et d'induire les mécanismes de défense (Brutus et al., 2010).

Les MAMPs sont décrits comme des molécules hautement conservées qui ont une fonction essentielle dans la "fitness" ou la survie des microbes qu'ils soient pathogènes ou non (Nürnberger and Brunner, 2002 ; Boller and Felix, 2009). On peut citer le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, la flagelline et le peptidoglycane bactériens, la chitine et le β -glucane de la paroi des champignons et des Oomycètes (Postel and Kemmerling, 2009) (**Tableau 4**). Par la coévolution entre pathogènes et hôtes, les plantes ont développé la capacité de détecter ces molécules grâce à des récepteurs présents dans la membrane plasmique (Zipfel, 2008 ; Boller and Felix, 2009 ; Postel

and Kemmerling, 2009 ; Zipfel, 2009 ; Monaghan and Zipfel, 2012). Suite à la reconnaissance d'un MAMP, des voies de transductions seront activées et vont déclencher un ensemble de mécanismes de défenses nommés la MAMP-triggered immunity (MTI ou PTI pour PAMP-triggered Immunity) dans le but est d'inhiber la croissance du microbe (Jones and Dangl, 2006) (**Figure 5**). La MTI est considérée comme un niveau de défense de base et relativement faible, mais toutefois efficace contre une très grande majorité des microbes. En effet, la maladie est une condition exceptionnelle si on considère le nombre de microbes présents dans l'environnement.

Cependant, la MTI a exercé une sélection pour des pathogènes capables de contourner ou de supprimer cette ligne de défense. Certains ont donc acquis la capacité de sécréter des protéines appelées effecteurs capables de déstabiliser les mécanismes de la MTI (**Figure 5**). A leur tour, les plantes qui ont développé des mécanismes pour détecter ces effecteurs ou leurs effets par l'intermédiaire de protéines de résistance (protéines R) auront un avantage sélectif. La détection de la présence d'un effecteur (ou de son action sur une molécule de la plante) par une protéine R provoque une réponse de défense plus puissante, l'ETI (effector-triggered immunity) aussi appelée résistance race-spécifique (Jones and Dangl, 2006). L'ETI est souvent, mais pas toujours, associée à une réaction d'hypersensibilité appelée HR (pour hypersensitive response) qui se caractérise par une mort cellulaire programmée au niveau du site d'infection (Ausubel, 2005). L'effecteur reconnu par une protéine R est appelé protéine d'avirulence (Avr) et sa perception aboutit à une interaction dite "incompatible". La reconnaissance d'une protéine Avr diminue la "fitness" de la souche porteuse. De fait, les individus qui ne produisent pas l'effecteur soumis à la pression de sélection vont être favorisés. On observe alors l'émergence d'une nouvelle souche pathogène (Jones and Dangl, 2006). D'autres *loci* vont être nécessaires pour la reconnaissance de cette souche. Les plantes qui possèdent ces *loci* vont être favorisées dans la population. Cette course à l'armement par coévolution sélective entre le pathogène et son hôte est décrit par le "zigzag model" de Jones and Dangl (2006)(**Figure 5**).

Cette vision des mécanismes de défense des plantes suppose que la PTI a été développée en premier du point de vue évolutif, puis l'ETI serait apparue pour contrecarrer les pathogènes en coévolution avec l'hôte. Ceci pourrait expliquer le fait que les pathogènes ont des effecteurs capables de supprimer la PTI et l'ETI comme l'effecteur de type III HopF2 de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (Nürnbergger and Lipka, 2005 ; Jones and Dangl, 2006 ; Wilton et al., 2010). Toutefois, les deux niveaux de défense partagent des caractéristiques communes comme des flux de calcium, la production de ROS (en anglais *reactive oxygen species*, dérivés réactifs de l'oxygène) et des cascades de MAP Kinases (*mitogen-activated protein kinase*) (Boller and Felix, 2009). On peut aussi citer l'accumulation d'oxyde nitrique et l'induction de la fermeture des stomates (Delledonne et al., 1998 ; Bolwell, 1999 ; Zhang et al., 2008). Plusieurs exemples montrent cependant qu'aussi élégant qu'il soit, ce modèle serait trop simpliste (Thomma et al., 2011). D'après ces auteurs, il semble qu'il n'y aurait visiblement pas de distinction catégorique entre les MAMPs et les effecteurs, ni entre la MTI et l'ETI. Ces concepts représenteraient plus un genre de continuum (Bent and Mackey, 2007 ; Thomma et al., 2011).

a) La perception extracellulaire des pathogènes vasculaires

Deux types de protéines localisées dans la membrane cytoplasmique permettent la reconnaissance des pathogènes au niveau extracellulaire : les PRRs (Pattern-Recognition Receptors) pour la reconnaissance des MAMPs et des protéines R (protéines de résistance) contenant un domaine LRR (extracellular LRR)(Fritz-Laylin et al., 2005). Les PRRs présentent des caractéristiques structurales communes et on peut distinguer deux groupes d'après leurs domaines extracellulaires : ceux qui contiennent un domaine de type LRR (Leu-rich repeat) et ceux avec un domaine de type LysM. Tous les PRRs connus à ce jour sont des receptor-like kinases (RLKs) ou des receptor-like proteins (RLPs) situés dans la membrane plasmique (Monaghan and Zipfel, 2012). Contrairement au RLKs, les RLPs ne possèdent pas de domaine kinase cytoplasmique.

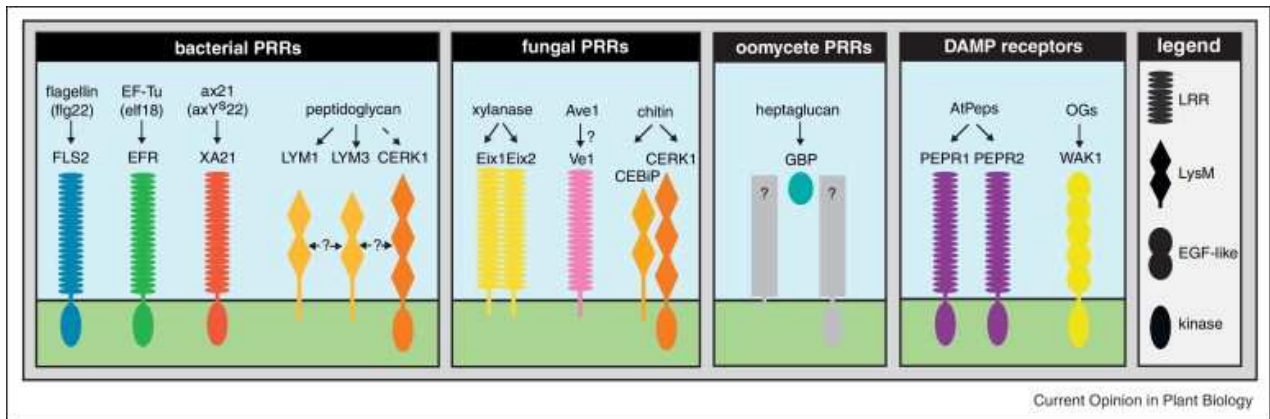


Figure 6 : Récepteurs PRR avec les ligands connus (Monaghan et Zipfel, 2012). La RLK FLS2 reconnaît la flagelline bactérienne (ou l'épitope actif flg22). La RLK EFR spécifique des *Brassicaceae* reconnaît le facteur d'élongation-Thermo instable (EF-Tu) bactérien (ou l'épitope actif elf18), et la RLK Xa21 du riz lie AX21 (ou le peptide synthétique sulfatée de 17-acides aminés axY⁸²²). Les RLPS LYM1 et LYM3 sont les récepteurs du peptidoglycane bactérien (PGN), et la RLK CERK1 se lie faiblement au PGN. Une interaction entre LYM1, LYM3, et CERK1 n'a pas encore été démontrée, mais un complexe pour la reconnaissance du PGN a été proposé. La xylanase fongique est reconnu par les RLPs Eix1 et Eix2 de la tomate. Ave1 est le ligand du RLP Ve1 de la tomate. Chez le riz, la RLP CEBiP lie la chitine et interagit avec la RLK CERK1 pour la signalisation intracellulaire, tandis que chez *Arabidopsis*, CERK1 est la principale protéine qui fixe la chitine et l'interaction avec des protéines analogues à CEBiP n'a pas encore été établie. Chez les légumineuses, une protéine β -glucan-binding protein (GBP) fixe l'heptaglucane de *Phytophthora* ; toutefois, il manque des données sur la signalisation intracellulaire ; ici, l'hypothèse émise est qu'il interagit avec une protéine transmembranaire. Les RLKs PEPR1 et PEPR2 fixent des AtPeps endogènes, et la RLK WAK1, contenant un domaine extracellulaire EGF-like, est un récepteur des oligogalacturonides (CGO) qui sont dérivés de la paroi cellulaire.

Parmi les protéines R à eLRR on peut distinguer trois types : les eLRR-RLP qui possèdent un domaine transmembranaire mais pas de domaines cytoplasmique, les eLRR-RLK qui possèdent un domaine transmembranaire et un domaine Kinase cytoplasmique et les PGIP (polygalacturonase inhibiting protein) qui se fixent aux parois cellulaires (Wang et al., 2010).

Parmi les PRRs les plus connus et les mieux caractérisés (**Figure 6**), on peut citer FLS2 (*Flagellin sensing2*), EFR (*Elongation Factor-Thermo Unstable receptor*), CERK1 (*Chitin Elicitor Receptor Kinase 1*) chez *A. thaliana*, CEBiP (*chitin oligosaccharides binding protein*) et Xa21 du riz, et Ve1 de la tomate. FLS2 et EFR sont des RLKs qui reconnaissent respectivement la flagelline et EF-Tu (Zipfel et al., 2006). Ils induisent donc une résistance spécifique aux bactéries. Il faut noter que ces deux récepteurs ne sont pas conservés chez toutes les plantes hôtes et la réponse de la plante varie selon le pathogène (Thomma et al., 2011). En effet, le gène *EFR* est exprimé chez *A. thaliana* et d'autres *Brassicaceae* mais pas chez les *Solanaceae* comme la tomate, *Nicotiana benthamiana* ou encore la pomme de terre. Toutefois, les plantes transgéniques de *N. benthamiana* et de tomate exprimant le gène *EFR*, expriment une résistance accrue contre les bactéries du genre *Xanthomonas* et *Ralstonia* (Lacombe et al., 2010). Ces plantes ne possèdent donc pas le récepteur EFR mais possèdent tout le mécanisme nécessaire pour la réponse contre EF-Tu.

L'effet de la détection de la flagelline sur la résistance est très bien décrit avec la souche *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pts*DC3000) chez *A. thaliana* (Zipfel et al., 2004). Mais dans le cas de la bactérie *R. solanacearum* K60 qui possède un flagelle, il s'avère que, contrairement à ce qui est attendu, celle-ci n'est pas détectée par le système FLS2 à cause d'un polymorphisme (Pfund et al., 2004). Le récepteur FLS2 d'*A. thaliana* détecte uniquement les flagelles qui portent un acide aspartique-43 ou asparagine-43 (Sun et al., 2006). De plus, des extraits de flagelline purifiés de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, pv. *juglandis*, et pv. *brassica rapa* n'induisent pas de réponse chez la tomate alors que ceux d'*E. carotovora* et *E. chrysanthemi* induisent une réponse type FLS2 chez la tomate (Felix et al., 1999). En somme, la séquence en acides

aminés de la flagelline varie selon les souches et toutes les espèces de plantes ne possèdent pas le récepteur FLS2.

Les récepteurs CEBiP et CERK1 ont respectivement deux et trois domaines LysM (Miya et al., 2007 ; Newman et al., 2013). Ils permettent la reconnaissance de la chitine, un constituant majeur de la paroi des champignons et présent également en faible quantité chez les oomycètes. Ces récepteurs sont peu spécifiques et agissent de façon générale contre les champignons pathogènes (Kishimoto et al., 2010). Xa21 du riz est aussi décrit comme un produit d'un gène de résistance et protège spécifiquement contre *Xanthomonas oryzae* p.v. *oryzae* (Song et al., 1995). Xa21 est un récepteur qui reconnaît Ax21 (activator of Xa21) de *Xanthomonas oryzae* p.v. *oryzae* dans le xylème. En absence d'Ax21, le récepteur Xa21 interagit avec l'ATPase XB24 (Xa21 binding protein 24) (Chen et al., 2010b). Le domaine kinase en C-terminal catalyse l'autophosphorylation de Xa21, le rendant inactif (Chen et al., 2010 ; Chen and Ronald, 2011). L'activité kinase de Xa21 n'est activée qu'après la reconnaissance d'Ax21 par Xa21 (Chen et al., 2010 ; Park et al., 2010). Il a été montré qu'Ax21 est aussi reconnu par le récepteur FLS2 d'*A. thaliana* et induit la même réponse que la flagelline (Danna et al., 2011).

Ecp2 (extracellular protein 2) est une protéine extracellulaire identifiée chez le pathogène foliaire *Cladosporium fulvum* et qui est nécessaire pour sa virulence (Stergiopoulos et al., 2007). Ecp2 est conservée chez d'autres espèces de champignons pathogènes comme *V. dahliae* (Thomma et al., 2011), et elle est reconnue par un certain nombre de génotypes de tomate dont l'espèce sauvage *Solanum pimpinellifolium*. Il y aurait donc certainement des PRRs non identifiés qui reconnaîtraient Ecp2 (Laugé et al., 1997 ; 1998 ; 2000 ; Stergiopoulos et al., 2007).

Ve1 est un récepteur eLRR-RLP qui permet la résistance contre les souches de race 1 de *Verticillium* (Fradin et al., 2009 ; 2011). Ce récepteur est absent chez *A. thaliana*. Toutefois, l'expression de *Ve1* de la tomate chez *A. thaliana* protège contre ces pathogènes (Fradin et al., 2011). Ve1 reconnaît Ave1 (Avirulence on Ve1 tomato), une protéine qui est conservée chez plusieurs champignons, chez les plantes et chez la bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Thomma et al. (2011) suggèrent qu'Ave1 est un MAMP et non un effecteur en raison de sa conservation entre les règnes et la signalisation mise en place au niveau du mécanisme de défense. Ve1 peut donc être considéré à la fois une protéine R et un PRR.

b) La perception cytoplasmique des pathogènes vasculaires

La détection de la présence d'un pathogène peut aussi se faire par la détection de la présence d'effecteurs dans l'apoplasme et dans le cytoplasme de l'hôte grâce aux protéines de résistance (protéines R). Plusieurs de ces protéines ont été identifiées et caractérisées mais la plupart est impliquée dans les mécanismes de défense contre des pathogènes foliaires (Martin et al., 2003 ; Liu et al., 2007 ; Gassmann and Bhattacharjee, 2012). Les protéines R sont pour la majorité des protéines à domaines NBS-LRR (nucleotide-binding site, leucine-rich repeat) (Jones and Dangl, 2006). Elles ont un domaine LRR en C-terminal impliqué dans la spécificité de perception et un domaine NBS au centre qui régule la conformation et la signalisation de la protéine (Takken et al., 2006). Deux types de NBS-LRR sont définis grâce à leur domaine N-terminal qui peut être soit de type "coiled-coil" (elles sont alors appelées CC-NBS-LRR) soit de type "Toll-interleukin-1 receptor" (dans ce cas on les appelle TIR-NBS-LRR) (Belkhadir et al., 2004 ; Liu et al., 2007). Parmi les protéines R impliquées dans les mécanismes contre des pathogènes vasculaires, on peut citer RRS1-R qui est impliqué dans la résistance contre *R. solanacearum* chez *A. thaliana* (Deslandes et al., 2003), les protéines codées par les gènes *I(I-1, I-2 et I-3)* conférant la résistance contre *F. oxysporum* chez la tomate (Houterman et al., 2008 ; De Wit et al., 2009), Bs2 du poivre (*Capsicum annuum*) qui permet la résistance contre *X. campestris* p.v. *vesicatoria* (Leister et al., 2005).

Le gène *RRS1-R* code pour un TIR-NBS-LRR qui reconnaît PopP2, un effecteur de type III de *R. solanacearum* (Deslandes et al., 2003). La reconnaissance se fait par interaction physique mais le mécanisme nécessite une troisième protéine, la protéase à cystéine RD19 qui est capable de fixer PopP2 mais pas RRS1-R. En absence de PopP2, RD19 est localisée dans la vacuole alors qu'en

présence de PopP2, celle-ci est localisée dans le noyau. Selon le modèle actuel, RRS1-1 reconnaîtrait le complexe RD19-PopP2 dans le noyau (Deslandes et al., 2003 ; Bernoux et al., 2008). *I-2* code pour un CC-NBS-LRR qui reconnaît Avr2 des souches de race 2 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Houterman et al., 2008 ; Takken and Rep, 2010).

Que la détection de pathogènes dans le xylème se fasse par des récepteurs intra- ou extracellulaires, leur perception provoque l'activation de réponses de défense. Ces réponses peuvent être de nature physique pour arrêter la progression du pathogène ou chimique pour inhiber sa croissance ou le tuer.

3. Les mécanismes de défense physico-chimiques

Le xylème est formé par un ensemble d'éléments conducteurs et d'éléments de soutien non conducteurs, des cellules de parenchyme ligneux et des cellules associées aux éléments conducteurs (cellules de contact et cellules sécrétrices). Pour que la colonisation devienne systémique, le pathogène doit passer à travers les pores des plaques perforées des vaisseaux pour accéder à la partie foliaire. Or le diamètre de ces pores, chez les angiospermes varie globalement entre 5 et 20 nm (Choat et al., 2003) et est donc nettement plus petit que le diamètre de bactéries (entre 25 et 500nm) ou des conidies (environ 2000nm) (Choat et al., 2003 ; Choat et al., 2004 ; Agrios, 2004). Toutefois, les pathogènes vasculaires possèdent un arsenal d'enzymes capables de dégrader les parois cellulaires (Agrios, 2004).

a) Les mécanismes de défense physiques

Les parois cellulaires constituent une barrière structurale à franchir pour la plupart des pathogènes. Leur renforcement est très souvent observé suite à une infection (Freeman, 2008). Ainsi on observe la production de substances telles que la callose, la lignine et la subérine (Agrios, 2004). Les appositions pariétales sont des structures enrichies en composés phénoliques qui s'accumulent

au niveau du site d'infection et provoquent une réorganisation du cytosquelette. La callose est un β -1,3-glucane amorphe à haut poids moléculaire synthétisé à partir de l'UDP-glucose. Elle forme des papilles qui servent de matrice pour le dépôt de molécules antimicrobiennes au niveau du site d'infection empêchant ainsi le développement et la progression du pathogène (Luna et al., 2011). L'accumulation de lignine est observée dans les parois des cellules infectées, voire à proximité du site d'infection. Leur synthèse peut être activée suite à différents stress biotiques et abiotiques comme une infection par un pathogène ou une blessure, un stress métabolique ou des perturbations de la structure des parois cellulaires (Field et al., 2006 ; Tronchet et al., 2010 ; Sattler and Funnell-Harris, 2013). La lignine permet d'empêcher la dégradation des fibres de cellulose. Ayant lieu essentiellement au niveau des parois des cellules du xylème secondaire, qui seraient potentiellement en contact avec les pathogènes vasculaires, la lignification devrait jouer le rôle de première barrière physique. Toutefois, ce n'est pas le seul mécanisme employé par les plantes pour empêcher la prolifération du pathogène.

Les occlusions vasculaires font partie des mécanismes les plus observés en réponse aux pathogènes vasculaires (Beckman and Talboys, 1981 ; Agrios, 2004). Le processus se fait essentiellement par la production de substances pectiques par les cellules du parenchyme, qui sont déposées dans les vaisseaux du xylème. Le plus souvent, ce sont des tyloses et/ou des gels qui se présentent sous forme d'excroissances, réduisant ainsi le diamètre de la lumière des vaisseaux pour empêcher la progression de l'agent pathogène (Beckman, 1987 ; Benhamou and Nicole, 1999 ; Agrios, 2004 ; Sun et al., 2013). La production de tyloses a été, par exemple, observée chez le chêne infecté par *Ceratocystis fagacearum* (Blaedow and Juzwik, 2010), l'orme touché par la maladie hollandaise de l'orme (Ouellette and Rioux, 1992) et le houblon infecté par *V. albo-atrum* (Talboys, 1958). La production de gel responsable d'occlusions vasculaires a été observée chez la tomate infectée par *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *V. albo-atrum*, ou encore le pois infecté par *F. oxysporum* f.sp. *pisi* (Bishop and Cooper, 1984). Le gel et les tyloses empêchent la dispersion verticale alors que la callose et les revêtements vasculaires limitent la colonisation des vaisseaux

adjacents. En effet, les revêtements vasculaires sont déposés au niveau des membranes des ponctuations (Rahman et al., 1999). Certaines de ces substances sont capables de se lier entre elles pour former des polymères encore plus complexes, empêchant le développement et la prolifération du pathogène (Agrios, 2004).

L'occlusion vasculaire est systématiquement observée suite à une infection par un pathogène vasculaire, ce qui n'est pas le cas de la lignification. Par exemple suite à l'infection de la tomate par *V. albo-atrum*, on n'observe pas la lignification mais plutôt l'occlusion vasculaire (Robb et al., 1991). Ces barrières ont pour but d'empêcher la propagation du pathogène mais le blocage des vaisseaux du xylème provoque un stress hydrique, lequel à terme peut provoquer le flétrissement de la plante (Fradin and Thomma, 2006 ; Sun et al., 2013). L'occlusion vasculaire n'est pas spécifique à une réponse contre un agent pathogène. En effet, toutes les espèces de plantes forment naturellement des tyloses au niveau du cœur de l'arbre, dans le xylème des feuilles au cours de la sénescence (Saitoh et al., 1993 ; Dute et al., 1999), au cours d'un stress hydrique (Esau, 1960), au cours d'un gel (Cochard and Tyree, 1990), ou après une blessure mécanique (Schmitt and Liese, 1993). Les défenses des plantes ne sont pas limitées aux des barrières physiques, elles sont aussi capables de produire de composés chimiques solubles pour contenir les microbes.

b) Les mécanismes de défense chimiques

En réponse à des changements environnementaux, les plantes produisent naturellement des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) et d'azote (RNS pour Reactive Nitrogen Species) dans les mitochondries, les chloroplastes et les peroxysomes (Apel and Hirt, 2004 ; Groß et al., 2013). Les ROS et les RNS peuvent être sous forme de radicaux libres ou sous forme d'espèces non radicalaires mais toutes aussi réactives. Les radicaux libres sont des molécules ayant un électron de valence non-pairé dans l'orbite externe ce qui les rend instables et très réactifs. Dans la cellule, ils provoquent l'oxydation des acides nucléiques, la peroxydation des lipides et l'oxydation

des groupements sulfhydriles des protéines induisant des dommages irréversibles (O'Brien et al., 2012). Parmi ces radicaux libres, on trouve le superoxyde (O_2^-), l'hydroxyle ($\bullet OH$), le peroxyde ($RO_2\bullet$), l'hydroperoxyde radical ($HO_2\bullet$), l'oxyde nitrique ($\bullet NO$) et le dioxyde d'azote ($\bullet NO_2$). Les ROS et les RNS peuvent être convertis en espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochlorique (HOCl) et les peroxy-nitrites ($ONOO^-$), et *vice versa* (Romero-Puertas et al., 2004). Suite à la détection de la présence de microbes, la cellule infectée induit une surproduction de ROS et de RNS. Très peu de choses sont connues sur la production de RNS contrairement au ROS.

La production de ROS nécessite l'intervention des peroxydases dont l'activité est fortement augmentée dans la sève du xylème suite à une infection par un pathogène vasculaire (Agrios, 2004 ; Apel and Hirt, 2004 ; O'Brien et al., 2012 ; Yadeta and Thomma, 2013). Ces enzymes jouent aussi un rôle dans la biosynthèse de lignine, de subérine et la détoxification du H_2O_2 (Hilaire et al., 2001 ; Passardi et al., 2005). En plus de leur activité antimicrobienne, les ROS sont impliqués dans l'induction de l'expression de gènes de défenses, la réponse d'hypersensibilité (HR), la résistance systémique acquise (SAR pour systemic acquired resistance), la production de phytoalexines et le dépôt de callose (Agrios, 2004 ; Apel and Hirt, 2004). Chez *A. thaliana*, l'accumulation d' H_2O_2 provoque l'activation d'un groupe spécifique de MAP Kinases (ANP1, ANP2 et ANP3), initiant ainsi l'activation de voies de transduction encore non identifiées qui conduisent à l'expression de gènes de défenses (Zhang and Klessig, 2001 ; Pitzschke and Hirt, 2006).

Les autres composés majeurs à effets antimicrobiens sont les phytoalexines et les "pathogenesis-related proteins" (PR protéines). Le terme phytoalexine regroupe un ensemble de métabolites secondaires hétérogènes, de faible masse moléculaire qui ont des effets antimicrobiens sur une grande variété de pathogènes. Ils sont de ce fait considérés comme des marqueurs moléculaires de résistance à la maladie (Ahuja et al., 2012). Généralement, une famille botanique donnée produit des phytoalexines d'une classe chimique spécifique. Les isoflavonoïdes comme la glycéolline ou la médicarpine sont les phytoalexines phénoliques caractéristiques des légumineuses.

Leur synthèse se fait essentiellement à partir de la phénylalanine par la voie des phénylpropanoïdes. Ils peuvent être libérés dans le xylème ou stockés dans des cellules. La présence de cellules de stockage de composés phénoliques dans les tissus du xylème en réponse à un pathogène vasculaire a été rapportée chez plusieurs espèces de plantes comme le coton, la pomme de terre, la tomate et le colza (Beckman, 2000 ; Eynck et al., 2007 ; Yadeta and Thomma, 2013). L'étude de leur rôle dans les interactions entre plantes et microbes a montré que l'accumulation de composés phénoliques augmente la résistance contre les pathogènes. En effet, ils ont des propriétés bactéricides et fongicides (Cowan, 1999 ; Beckman, 2000 ; Jeandet et al., 2002 ; Maddox et al., 2010). Ils peuvent agir sous forme libre ou liée aux parois cellulaires pour empêcher la pénétration du pathogène dans la cellule grâce à leur activité antimicrobienne (Pomar et al., 2004 ; Hückelhoven, 2007). D'autres phytoalexines sont par exemples des indoles comme la camalexine (3-thiazole-2'-yl-indole) qu'on trouve chez les *Brassicaceae*, ou les sesquiterpènes comme la rishitine chez les *Solanaceae*.

Les protéines PR sont des protéines de petit poids moléculaire, dont la concentration est faible dans les conditions physiologiques de la plante, mais elles s'accumulent très fortement dans des conditions pathologiques et sont souvent retrouvées dans le milieu extracellulaire (Sels et al., 2008). Pour certaines on ne connaît pas vraiment leur fonction, mais beaucoup parmi elles ont des activités enzymatiques. Ainsi les protéines PR-2 sont des β -1, 3-glucanases, et les protéines PR-3, PR-4, PR-5 et PR-8 sont des chitinases. Ces enzymes peuvent inhiber la croissance des champignons en dégradant les constituants de leurs parois cellulaires. Une forte accumulation des protéines PR-1, PR-2, PR-3, et PR-5 a été observée dans la sève du xylème de tomates infectées par *Fo f. sp. Lycopersici* (Rep et al., 2004 ; Houterman et al., 2007). La plupart des gènes codant pour les protéines PR sont régulés par différentes phytohormones (Sels et al., 2008). L'exemple le plus connu est l'induction des gènes qui codent pour PR-1 et PR-5 par la voie de l'acide salicylique (Thomma et al., 2001) et PR-3, PR-4, PR-12 et PR-13 par la voie de l'acide jasmonique (Penninckx et al., 1998 ; Thomma et al., 2001).

Tableau 5 : Familles des phytohormones et leurs rôles majeurs dans le développement de la plante

| Phytohormones | Rôle majeur dans la plante |
|--------------------------------------|--|
| Famille des auxines | <ul style="list-style-type: none"> - Permet la croissance cellulaire et différenciation tissulaire (xylémienne) - Stimule l'activité mitotique cambiale - Contrôle la croissance des bourgeons axillaires et la dominance apicale - Retarde l'abscission des feuilles - Phototropisme et gravitropisme - Allonge la racine et de la tige par auxèse - Active la rhizogenèse - Détermine la dominance apicale - Permet le développement des fleurs et des fruits |
| Acide salicylique (SA) | <ul style="list-style-type: none"> - Participe aux processus de résistance systémique acquise - Intervient dans la thermogenèse |
| Acide jasmonique (JA) | <ul style="list-style-type: none"> - Est mise en jeu lors de réactions de défense et de stress - Permet le développement du pollen - Favorise la sénescence |
| Acide abscissique (ABA) | <ul style="list-style-type: none"> - Gère le stress hydrique en contrôlant l'ouverture stomatique - Contribue à la chute des feuilles - Détermine la dormance de la graine - Inhibe la levée de dormance |
| Ethylène (ET) | <ul style="list-style-type: none"> - Active la floraison - Déclenche l'abscission foliaire - Contrôle la maturation et le développement des fruits |
| Famille des Gibbérellines | <ul style="list-style-type: none"> - Favorise la croissance cellulaire - Détermine l'allongement par déboîtement des entre-nœuds de la tige - Permet parfois la levée de dormance - Intervient lors de la germination des graines - Active la montaison qui déclenche la mise à fleur |
| Famille des Cytokinines | <ul style="list-style-type: none"> - Active les divisions et la croissance cellulaires - Stimule la néoformation des bourgeons latéraux - Retarde la sénescence des feuilles - Permet le débourrement des bourgeons |
| Famille des Brassinostéroïdes | <ul style="list-style-type: none"> - Stimule l'élongation des organes caulinaires (tiges et feuilles) - Participe à la division cellulaire avec l'auxine - Intervient dans la sénescence - Favorise la floraison |

Il existe une seule molécule inorganique impliquée dans la résistance qui est produite par les plantes en réponse à un pathogène. Une forte accumulation de soufre élémentaire a été observée dans les cellules du parenchyme et autour des occlusions vasculaires au cours d'une interaction incompatible entre *V. dahliae* et la tomate. Du soufre a été aussi détecté dans le xylème de coton infecté par *V. dahliae*, de tabac et de haricot vert infecté par *Fusarium oxysporum* et de tomate infectée par *R. solanacearum* (Williams et Cooper, 2004). Ce soufre est d'origine endogène mais il reste à savoir s'il résulte de la conversion des sulfates, de la dégradation des acides aminés soufrés ou d'une autre voie.

4. Le rôle des molécules de signalisation dans la résistance, les phytohormones

Les phytohormones jouent un rôle essentiel dans la croissance, le développement, la reproduction et la survie de la plante (**Tableau 5**). Elles agissent à de faibles concentrations pour modifier l'expression de gènes lors de processus d'organogenèse mais aussi en réponse à des changements physiologiques. En effet, elles jouent un rôle central dans l'activation des voies de signalisation impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. L'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et ses dérivés, et l'éthylène (ET) sont indispensables pour la résistance locale et systémique (Durrant and Dong, 2004 ; Mishina and Zeier, 2007 ; Tsuda et al., 2008). L'acide abscissique (ABA), les auxines, les gibbérellines (GA), les cytokines (CK), les brassinostéroïdes, les peptides hormones et les strigolactones modulent aussi les voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de défenses des plantes (Gomez-Roldan et al., 2008 ; Bari and Jones, 2008). Une modification de leurs concentrations ou de la sensibilité de la plante pour ces molécules induisent un ensemble de réponses adaptatives suite à l'attaque par un pathogène. Le "timing" de la biosynthèse et la composition en hormones accumulées vont en partie déterminer si la plante sera sensible ou résistante vis-à-vis du micro-organisme (Verhage et al., 2010). Aussi bénéfiques

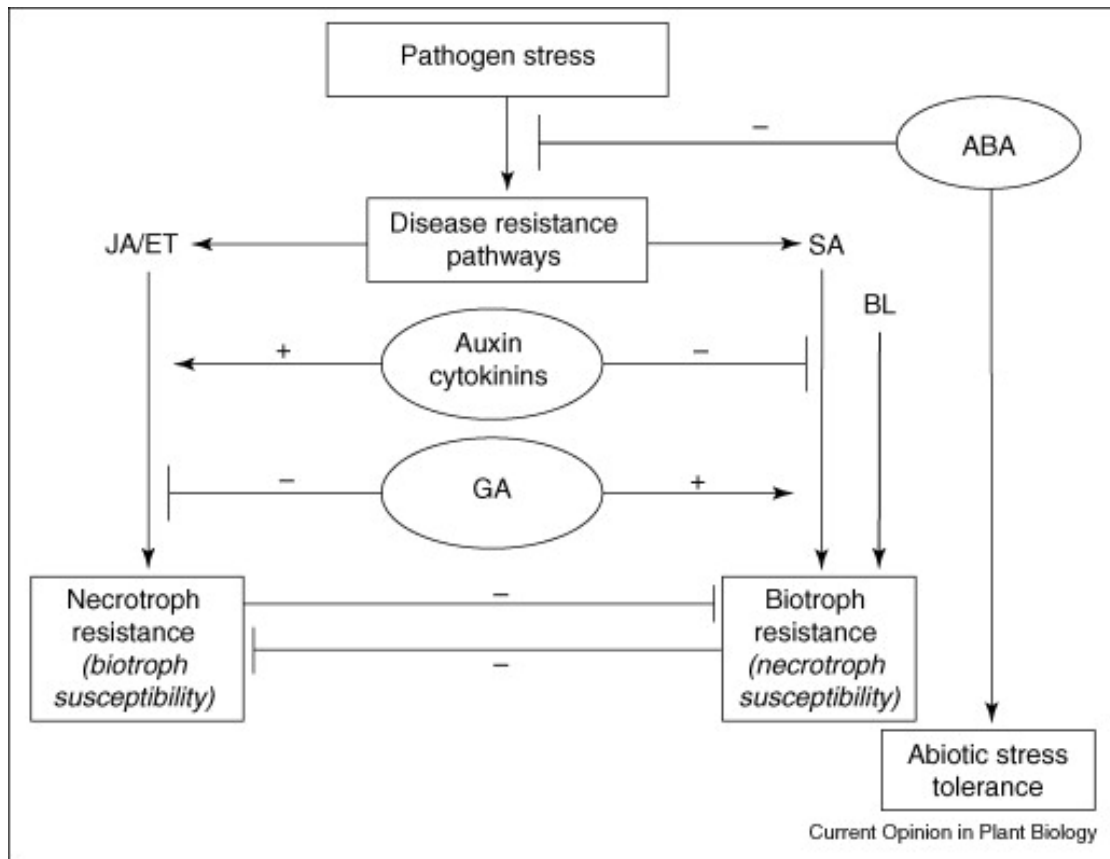


Figure 8 : Modèle indiquant les interactions probables qui existent entre les voies de signalisation hormonales au cours d'une interaction plante-pathogène chez Arabidopsis (Robert-Seilaniantz et al., 2007). La voie de SA est le plus souvent impliquée dans la réponse contre les (hémi-) biotrophes tandis que la voie de JA est le plus souvent impliquée dans la résistance contre les nécrotrophes. Ces deux voies interagissent de façon antagoniste. La voie des BL est le plus souvent impliquée dans la résistance contre les biotrophes. La voie d'ABA est le plus souvent un régulateur négatif des mécanismes de défense contre les pathogènes mais un régulateur positif dans la réponse aux stress abiotiques. ABA: acide abscissique ; JA: acide jasmonique ; ET: éthylène; SA: acide salicylique ; GA: acide gibbéréllique ; BL: brassinolides.

soient-elles, les réactions de défense ont un coût pour la plante et ne doivent pas être activées inutilement (Walters and Heil, 2007). La plante peut réguler de façon fine sa réponse immunitaire et l'utilisation de ses ressources pour son développement, grâce aux antagonismes qui existent dans la signalisation de ces différentes hormones (**Figure 8**) (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Dans les interactions plante/pathogène, les hormones les plus étudiées pour leur rôle dans la défense sont SA, JA, ET, ABA et l'auxine (Robert-Seilaniantz et al., 2007 ; Bari and Jones, 2008 ; Robert-Seilaniantz et al., 2011).

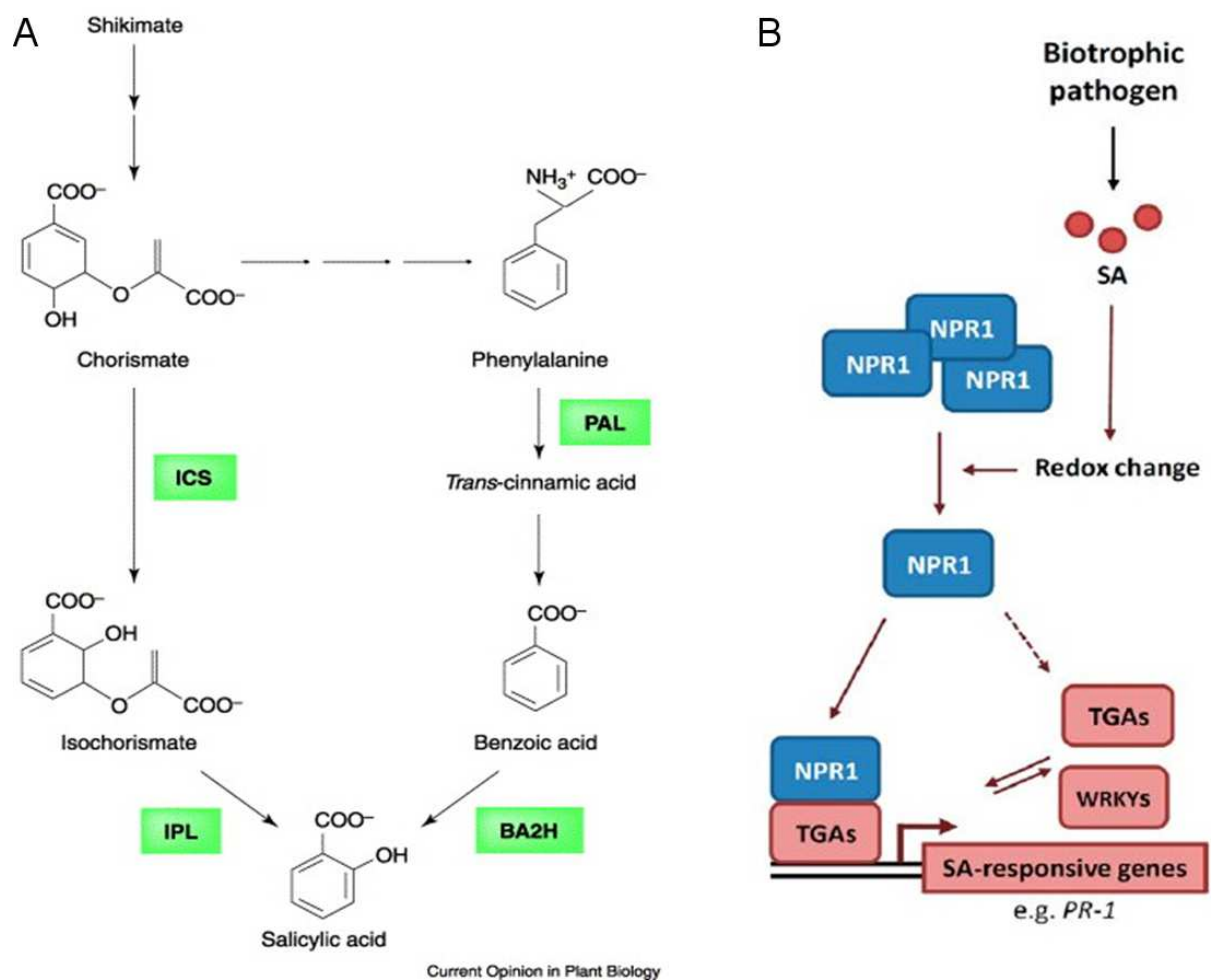


Figure 9 : Biosynthèse de l'acide salicylique (SA) et mécanisme de l'induction de l'expression de gène.

A) Voie de biosynthèse de SA proposée par Shah (2003). La production de SA se fait essentiellement par la voie des shikimates qui fournit du chorismate. L'isochorismate synthase (ICS) et isochorismate pyruvate lyase (IPL) catalysent la conversion du chorismate en SA en deux étapes. Chez le tabac, la phénylalanine est convertie en SA en deux étapes grâce à la Phénylalanine ammonia lyase (PAL) et une benzoic-acid-2-hydroxylase (BA2H).

B) Représentation schématique simplifiée de la signalisation de la voie de SA (Does et al., 2013). L'accumulation de SA provoque un changement du potentiel redox cellulaire provoquant la réduction de l'oligomère de NPR1. Les monomères de NPR1 sont transloqués dans le noyau dans lequel ils fonctionnent comme des co-activateurs de la transcription en augmentant l'affinité des facteurs de transcription TGA aux promoteurs.

L'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque) est un composé phénolique produit à partir de la voie des shikimates grâce à l'action de la voie de l'isochorismate synthase (ICS) qui convertit le chorismate en isochorismate dans les plastides (**Figure 9 A**). En effet, chez le mutant *SID2* (*SA induction-deficient 2*) d'*A. thaliana*, muté dans un gène codant pour une ICS, on observe une forte diminution de l'accumulation de SA (Nawrath and Métraux, 1999 ; Wildermuth et al., 2001). Des études antérieures indiquent qu'il y aurait une autre voie de biosynthèse. Cette deuxième voie dépend de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui convertit la phénylalanine, un dérivé du chorismate, en acide *trans*-cinnamique (Yalpani et al., 1993 ; Chong et al., 2001). Chez *A. thaliana*, la majorité du SA semble produite par la ICS codée par *SID2*. Suite à la reconnaissance d'un pathogène biotrophe ou hémibiotrophe, la concentration en SA augmente de façon significative au niveau du site d'infection mais aussi dans les autres parties de la plante. Le SA se lie alors à son récepteur NPR3 (nonexpressor of pr genes 3) qui va stimuler la dégradation de NPR1 (nonexpressor of pr genes 1), le répresseur de la mort cellulaire programmée, ce qui provoque une HR (Fu et al., 2012 ; Coll et al., 2011). L'accumulation de SA est donc responsable de la HR, réponse caractéristique dans les cas de résistance à des agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes, décrite essentiellement au niveau des feuilles (**Figure 9 B**). Mais elle induit également la mise en place de réponses immunitaires basales comme le dépôt de callose (Tsuda et al., 2008a ; Tsuda et al., 2008b). Elle induit également l'expression de protéines PR (Uknes et al., 1992 ; Delaney et al., 1994). En effet, l'accumulation de SA au niveau du site d'infection et à distance est nécessaire pour l'expression systémique de gènes *PR-1*, *PR-2* et *PR-5* (Thomma et al., 2001).

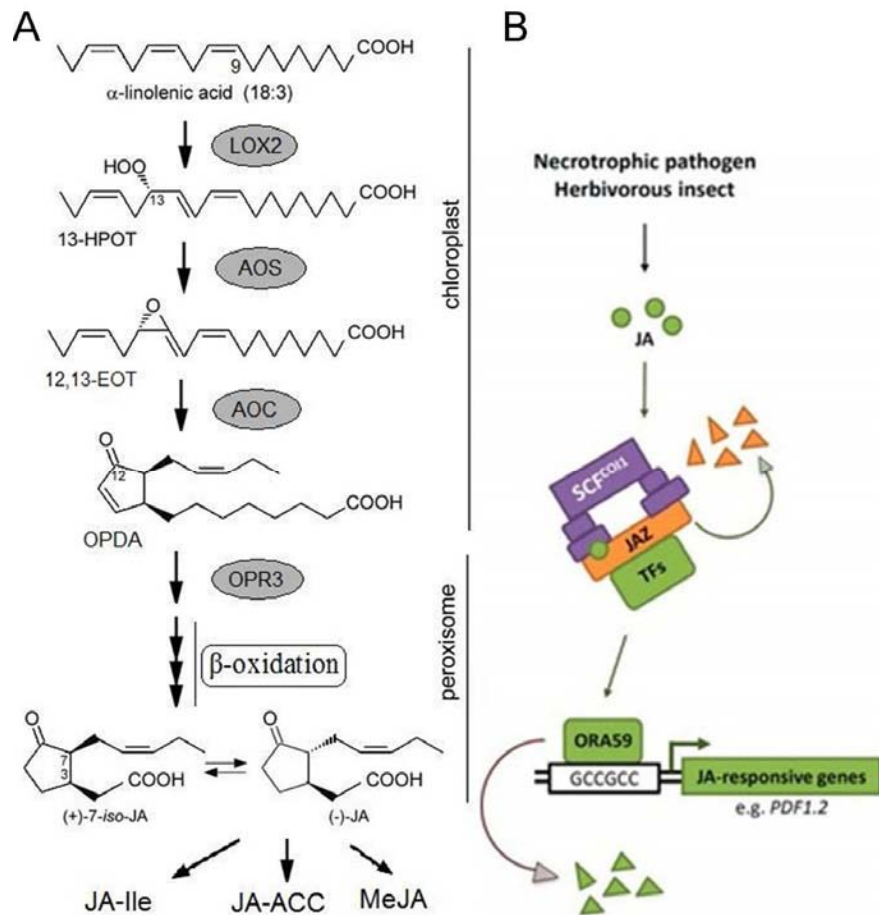


Figure 10 : Biosynthèse du Jasmonate (JA) et mécanisme d'action sur l'expression de gènes.

A) Voie de biosynthèse de JA chez *A. thaliana* (Delker et al., 2006). La production de JA se fait par la voie des octadecanoïdes. Les enzymes et les métabolites intermédiaires sont indiqués en tant que LOX2 (lipoxygénase 2), AOS (allène oxyde synthase), AOC (allène oxyde cyclase), et OPR3 (12-oxophytodienoate réductase 3) ; 13-HPOT (acide 13*S*-hydroperoxy-9*Z*,11*E*,15*Z*-octadecatrienique), 12,13-EOT (acide 12,13-époxyoctadecatrienique), OPDA (acide 12-oxophytodienoïque), JA (jasmonate), JA-Ile (jasmonoyl-isoleucine), JA-ACC (acide jasmonoyl-1-amino-1-cyclopropane carboxylique), et MeJA (méthyl jasmonate).

B) Représentation schématique simplifiée de la signalisation de la voie de JA (Does et al., 2013). Dans la cascade de signalisation de JA, le complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{COI1} et les protéines jasmonate ZIM-domain (JAZ) forment un complexe qui réprime l'expression de gènes. Au cours d'une accumulation de JA, JA-Ile (JA-isoleucine) se fixe sur la F-box COI1 dans le complexe SCF^{COI1}, ce qui induit l'ubiquitination des protéines JAZ. Les protéines JAZ ubiquitinylées sont alors dégradées par le protéasome. La dégradation des protéines JAZ permet l'activation de la transcription grâce aux facteurs de transcription comme ORA59.

La biosynthèse du **jasmonate (JA)** est initiée dans le chloroplaste par l'oxygénation d'un acide α -linoléique (**Figure 10 A**). Il s'ensuit une série de réactions dans le chloroplaste puis dans le peroxyosome pour donner le (+)-7-*iso*-JA. Ce dernier est très instable, et s'épimérise pour donner le JA ((-)-JA). Dans la biosynthèse de JA, les lipoxygénases (LOX) jouent un rôle essentiel. En effet suite à un traitement par des inhibiteurs des LOX, la plante est incapable d'induire l'accumulation de JA et certaines protéines de défenses (Doares et al., 1995). Chez *A. thaliana*, parmi les six gènes codant pour des LOX, les gènes *LOX2*, *LOX3* et *LOX4* sont associés à la production de JA (Bell and Mullet, 1993 ; Caldelari et al., 2011). En plus des LOX, les allène oxyde synthases (AOS) et les allène oxyde cyclases (AOC) jouent un rôle essentiel (Ziegler et al., 2000 ; Park et al., 2002). Le JA peut être converti en plusieurs dérivés dont beaucoup ont une activité biologique : en particulier le méthyl-JA et la forme active de l'hormone (-)-JA-I- isoleucine (Ile-JA)(Wasternack, 2007 ; Wu et al., 2012 ; Fonseca et al., 2009). La formation d'Ile-JA est catalysée par le produit du gène *JAR1* (*Jasmonate Resistant 1*) (Staswick and Tiriyaki, 2004).

Dans les conditions standard, le facteur de transcription des gènes dépendants de JA, le facteur de transcription MYC2 est réprimé par l'interaction avec la protéine JAZ (*JAsmonate ZIM domain*). En condition de stress, *JAR1* augmente la quantité de Ile-JA ce qui favorise la formation du complexe JAZ-CO11 (coronatine insensitif 1). Les protéines JAZ sont alors ubiquitinilées, puis dégradées par le protéasome libérant ainsi MYC2 (**Figure 10 B**). Il y a alors transcription des gènes JA dépendants parmi lesquels les gènes *JAZ*. Les protéines JAZ nouvellement produites vont interagir avec MYC2, ce qui restaure la répression de la transcription (Chini et al., 2007). Ce rétrocontrôle négatif indique une régulation fine de la voie JA. La voie JA est le plus souvent activée en réponse à des pathogènes nécrotrophes et les insectes herbivores (Bari and Jones, 2008 ; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Les gènes de défense régulés par le JA sont PR-3, PR-4, PDF1.2 (défensine, PR-12) et PDF2.2 (thionine, PR-13) (Penninckx et al., 1998 ; Thomma et al., 2001). L'action de JA dans la réponse aux stress biotiques est souvent associée à celle de ET (Robert-Seilaniantz et al., 2011).

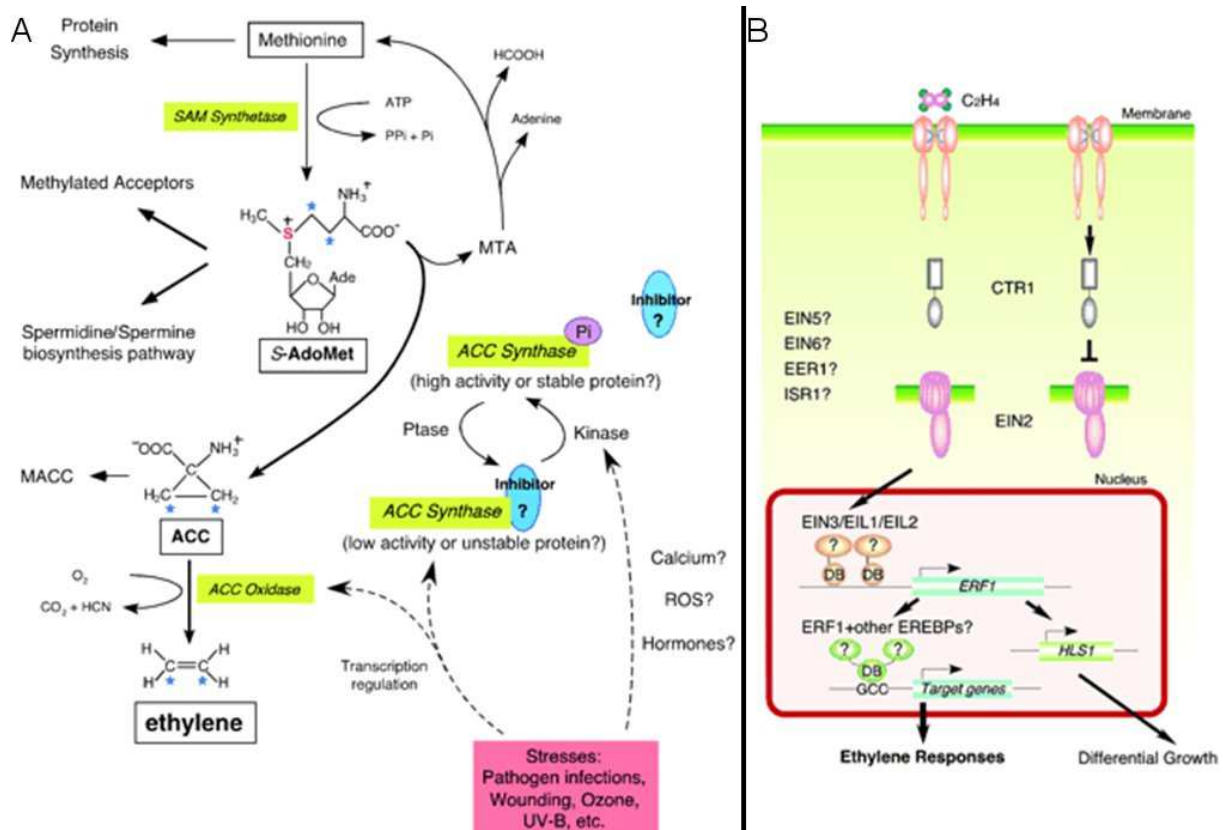


Figure 11 : Biosynthèse de l'éthylène (ET) et mécanisme d'action sur l'expression de gènes d'après Wang et al. (2002).

A) Voie de biosynthèse d'ET chez *A. thaliana*. La production de S-AdoMet (S-adenosylméthionine) est catalysée par des SAM synthétases (S-adenosylméthionine synthétases) à partir de la méthionine. L'étape limitante de la biosynthèse d'ET est la conversion de S-AdoMet en ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) par l'ACC synthase qui est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. La production de MTA (5'-S-méthyl-5'-thioadenosine) permet la conservation de la concentration en méthionine dans la cellule. L'ACC oxydase catalyse la dernière étape permettant la conversion de l'ACC en ET.

B) Dans la signalisation de la voie de l'ET, la perception de l'hormone se fait par ETR1 (ethylene receptor 1) qui est un régulateur négatif de la réponse à l'ET puisqu'en absence d'ET, il permet le maintien du régulateur négatif de CTR1 (constitutive triple response 1). Ce dernier réprime la régulation positive des EIN2 (ethylene insensitive 2). Après la perception de l'ET, la répression de la voie par CTR1 est levée, ce qui permet l'activation de la signalisation par EIN2. En conséquence, les activateurs de l'expression comme EIN3 (ethylene-insensitive 3), sont activés parce que leur dégradation par le protéasome est inhibée. Les facteurs de transcription de type EIN3-like activent les facteurs de transcription comme ERF1 (ethylene response factor 1) permettant ainsi l'expression des gènes.

L'**éthylène (ET)** est une molécule volatile produite à partir de la méthionine (**Figure 11 A**). Cette dernière est transformée en *S*-adenosylmethionine (*S*-AdoMet) par une SAM synthétase. Le *S*-AdoMet est par la suite transformé en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) par l'ACC synthase (ACS), cette réaction est l'étape limitante dans la biosynthèse de l'ET. L'ACC oxydase (ACO) catalyse l'étape finale en convertissant l'ACC en ET (Yang and Hoffman, 1984 ; Wang et al., 2002). Les études montrent que l'ACS et l'ACO appartiennent à des familles multigéniques dont l'expression est régulée par des signaux internes de développement et des stimuli externes de nature biotique ou abiotique (Johnson and Ecker, 1998). Cinq récepteurs d'ET ont été identifiés chez *A. thaliana* : ETR1 (*ethylene-resistant 1*), ETR2, EIN4 (*ethylene-insensitive 4*), ERS1 (*ethylene response sensor 1*), et ERS2. La fixation de l'ET se fait au niveau N-terminal du domaine transmembranaire d'ETR1 (Wang et al., 2002 ; Qiu et al., 2012) (**Figure 11 B**), et nécessite du cuivre qui est délivré grâce à RAN1 (*responsive-to-antagonist 1*). En absence d'ET, les récepteurs activent CTR1 (*constitutive triple-response 1*), une Serine/Thréonine protéine kinase de la famille des Raf-like kinase (Clark et al., 1998). L'activation de CTR1 inhibe l'expression des gènes répondant à l'ET. La fixation de l'ET induit la désactivation de CTR1, ce qui permet l'activité de EIN2 qui, de son côté, active la famille des facteurs de transcription EIN3 dans le noyau. EIN3 active l'expression des gènes des facteurs de transcription ERF1 (*ethylene response factor 1*) en se fixant à leurs promoteurs. ERF1 active l'expression des gènes qui répondent à l'ET dont *PDF1.2* (Wang et al., 2002).

L'**acide abscissique (ABA)** est un dérivé de la voie de biosynthèse des époxy-caroténoïdes (**Figure 12 A**). Sa biosynthèse débute dans les plastides et se termine dans le cytosol. Chez *A. thaliana*, la première étape spécifique dans la biosynthèse d'ABA est catalysée par une Zéaxanthine Epoxidase (ZEP/AtABA1). Ces produits sont isomérisés en 9-*cis* isomères. Par exemple, le all-*trans*-violaxanthine est converti en 9'-*cis*-neoxanthine par une Néoxanthine Synthase (NSY/atABA4) (North et al., 2007). Le clivage des 9-*cis* isomères par une 9-*cis*-époxy-caroténoïde dioxygénase (NCED) pour former la xanthoxine est l'étape limitante de la biosynthèse d'ABA. Ainsi, la mutation

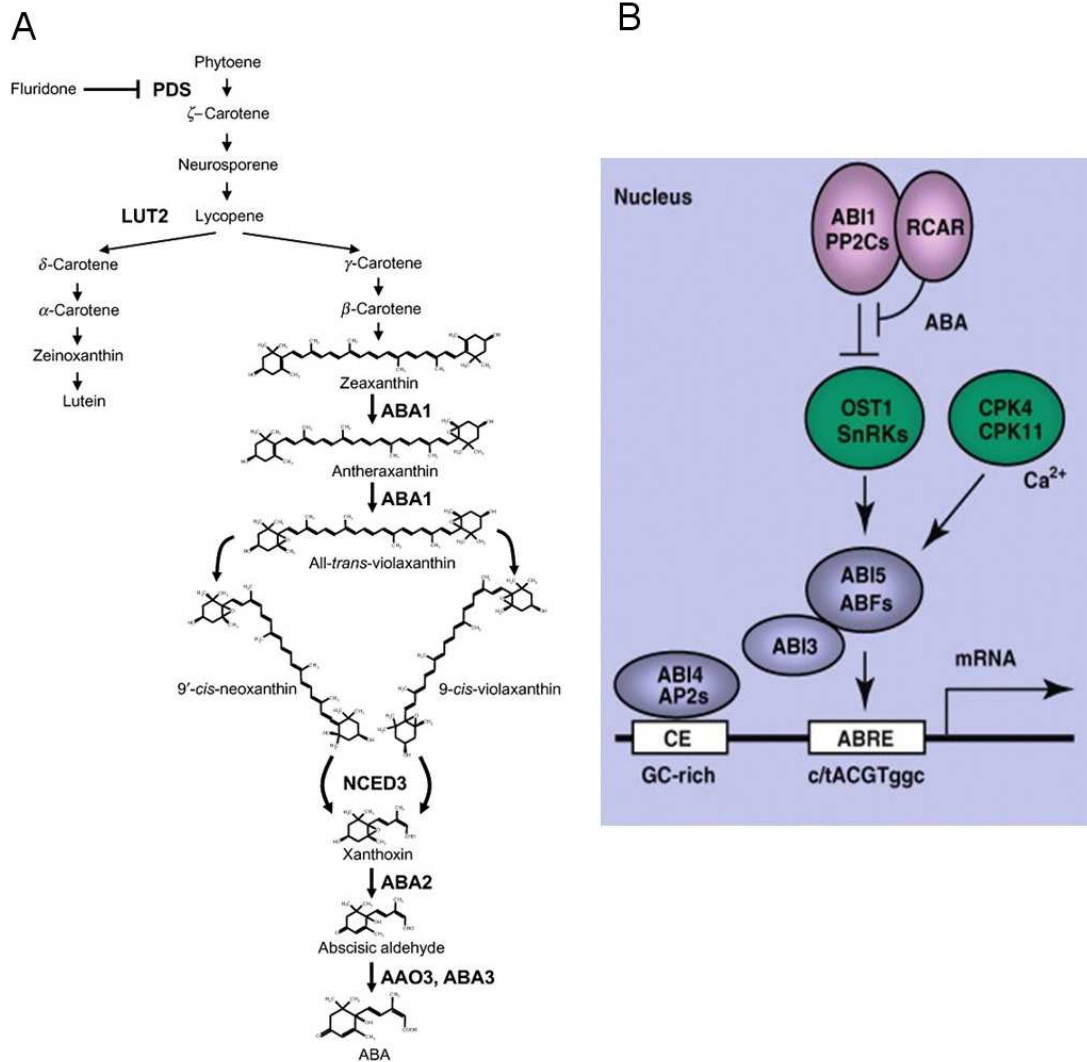


Figure 12 : Biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) et mécanisme d'action sur l'expression de gènes.

A) L'ABA est synthétisé à partir de caroténoïdes oxygénés à 40 carbones impliquant la PDS (phytoene desaturase). LUT2 (lutein-deficient-2) est une α-ε-cyclase. Les étapes catalysées par ABA1 (aba déficient 1), NCED3 (nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3), ABA2 (aba déficient 2), AAO3 (abscisic aldehyde oxidase 3) et ABA3 (aba déficient 3), sont indiquées (Barrero et al., 2008). B) Le récepteur d'ABA est un complexe protéique composé d'une PP2C (proteine phosphatases 2C) comme ABI1 (ABA-insensitive 1) et un membre des ABA-binding RCAR (regulatory component of ABA receptor 1). La phosphatase PP2C inhibe l'activité des protéines kinases OST1 (open stomata 1) et leurs homologues les SnRKs (AMPK/Snf1-related kinases family). Il est possible qu'ils agissent aussi sur les CPKs (calcium-dependent protein kinase 1) comme CPK23. En présence d'ABA, l'activité phosphatase est bloquée. En conséquence, les protéines kinases sont activées. Dans le noyau, les régulateurs clés sont ABI5 (aba insensitive 5), et les ABFs (abscisic acid responsive elements-binding factor 2). Les ABFs phosphorylées se fixent sous forme de dimères sur les ABRE (ABA-responsive cis-element) et, en concert avec les autres éléments régulateurs, activent l'expression. ABI3 fixe ABI5, alors qu'ABI4 et les facteurs de transcription type AP2 se fixent sur les CE (coupling element) riches en GC pour l'optimisation de l'expression (Raghavendra et al., 2010).

d'*AtNCED3* empêche l'accumulation d'ABA au cours d'un stress hydrique, provoquant le flétrissement de la plante (Xiong et al., 2002). A l'inverse, la surexpression d'*AtNCED3* augmente l'accumulation d'ABA et la résistance au stress hydrique (Iuchi et al., 2001). La xanthoxine est convertie en ABA par deux oxydases, la SDR (short-chain dehydrogenase/reductase) et AAO3 (aldehyde oxidase 3). AAO3 nécessite un cofacteur, du molybdène sulfuré (moco/*AtABA3*) (Bittner et al., 2001).

Il existe plusieurs protéines qui sont capables de fixer l'ABA mais une fonction comme récepteur de signal de transduction reste à démontrer. Parmi ces protéines, seule la famille des PYL/RCAR (pyrabactin resistance-like/regulatory component of ABA receptor) ont en effet un rôle dans la signalisation d'ABA (Lee and Luan, 2012). La signalisation implique aussi des type 2C protéine phosphatases (PP2Cs) et trois SNF1-related protein kinases (SnRK), SnRK2.2, 2.3 et 2.6, dont les activités sont contrôlées par l'ABA (**Figure 12 B**) (Soon et al., 2012). En absence d'ABA, les PP2Cs activent les SnRK2 kinases qui interagissent physiquement avec ABI1 (abl-interactor 1), ABI2 et HAB1 (hypersensitive to aba 1), ce qui a pour conséquence de déphosphoryler la sérine (S175) de SnRK2.6. Cette déphosphoration inactive SnRK2.6 ce qui inhibe la voie de signalisation. La fixation d'ABA sur les récepteurs PYR/PYL/RCAR provoque la fixation de celui-ci au site catalytique des PP2Cs, inhibant ainsi son activité enzymatique. L'inhibition des PP2Cs favorise l'activité des SnRK2s qui s'autophosphorylent, ce qui permet aux SnRK2s de relayer le signal (Soon et al., 2012). Dans la résistance aux pathogènes, l'ABA induit des modifications structurales et transcriptionnelles. Par exemple, à la suite de la reconnaissance *Pst* DC3000, ABA induit dans la fermeture des stomates pour empêcher l'entrée des bactéries (Melotto et al., 2006). L'ABA peut aussi être un régulateur négatif des mécanismes de défense (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Par exemple, il empêche l'accumulation de lignine chez les plantes d'*A. thaliana* infectées par *P. syringae* pv. *tomato*, ce qui augmente la sensibilité (Mohr and Cahill, 2007).

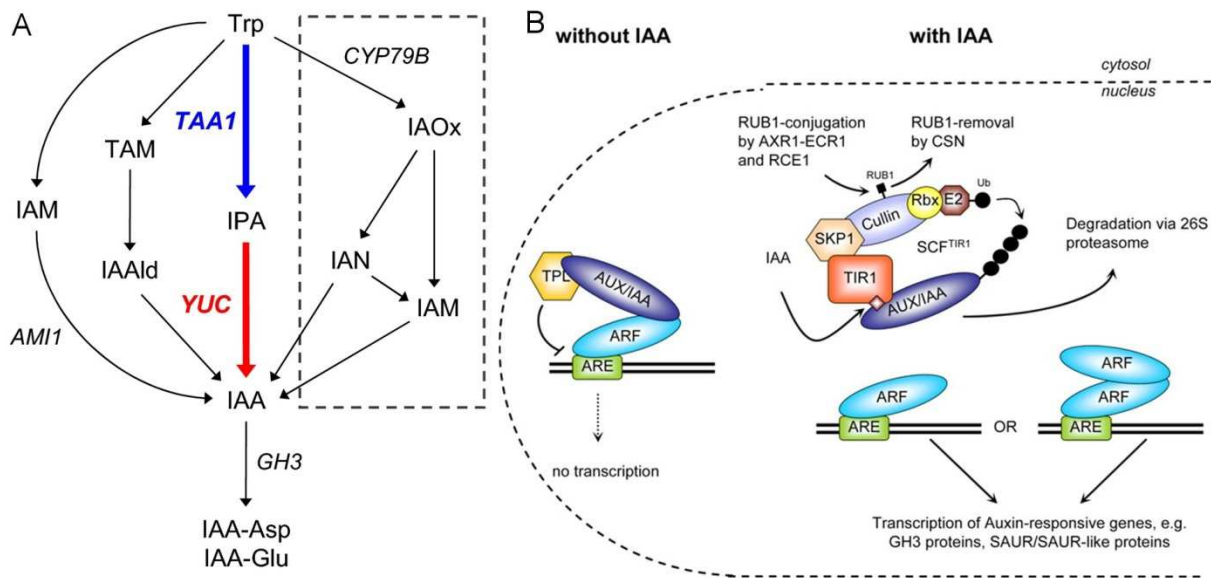


Figure 13 : Biosynthèse de l’auxine acide indole 3-acétique (IAA) et mécanisme d’action sur l’expression de gènes.

A) Voie de biosynthèse de l’IAA proposée par Mashiguchi et al. (2011). Trp (tryptophane), CYP79B (cytochrome p450, family 79, subfamily b, polypeptide 3), TAA1 (tryptophan aminotransférase of Arabidopsis 1), IAOx, voie des indole-3-acetaldoxime, TAM (tryptamine), IPA (indole-3-pyruvic acid), IAM (indole-3-acetamide), IAAid (indole-3-acetal- dehyde, AMI1 (amidase 1), YUC (YUCCA), IAN (indole-3-acetonitrile), GH3 (gamma-glutamyl hydrolase 3), IAA-asp (IAA-acide aspartique), IAA-glu (IAA-Acide glutamique).

B) Voie de signalisation de l’auxine proposée par Hartmann et al. (2011). En absence d’IAA, les facteurs de transcription ARF (auxine responsive factor) se fixent aux AREs (auxin-responsive elements) fixés sur les promoteurs en interaction avec les protéines Aux/IAA (auxin response factor/indole-3-acetic acid inducible), qui à leurs tours recrutent le répresseur TPL (topless). En cas d’accumulation d’IAA, celui-ci se fixe sur les protéines Aux/IAA et la sous unité TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) du complexe SCFTIR1 (S-phase kinase-associated protein 1-Cullin-F-box protein-TIR1) induit la dégradation des Aux/IAA *via* le protéasome 26S. Les facteurs de transcription ARF sont libérés. L’activité du complexe SCFTIR1 peut être régulée par ajout ou suppression de la protéine ubiquitine-like RUB1 (related to ubiquitin 1) grâce à l’action conjuguée de AXR1 (auxin resistant 1), RCE1 (ras-converting enzyme 1) et ECR1 (enzyme 1 c-terminal related 1)) et les enzymes CSN (cop 9 signalosome). Les ARFs libres agissent sous forme de monomères ou de dimères pour activer l’expression des gènes.

Chez les plantes, il existe quatre molécules endogènes qui ont une activité **auxine** : l'acide indole-3-acétique (IAA), l'acide 4-chloroindole-3-acétique (4-Cl-IAA), l'acide phenylacétique et l'acide indole-3-butyrique (IBA)(Simon and Petrášek, 2011). La voie de biosynthèse est plutôt complexe, et plusieurs voies sont pressenties. Toutefois, deux voies semblent contribuer à la majeure partie de la production de la forme d'auxine prédominante, l'IAA. Ces voies sont la voie tryptophane-dépendante et la voie tryptophane-indépendante (Cohen et al., 2003) (**Figure 13 A**). L'auxine est synthétisée surtout au niveau de l'apex foliaire et racinaire. Son transport vers les autres tissus ne se fait pas par diffusion mais grâce à un flux polarisé *via* des transporteurs d'auxines (Ljung et al., 2001 ; 2005). Ce transport motivé par des gradients chimiosmotiques est assuré par les importateurs AUX1/LAX (auxin resistant1/like aux1) et les exportateurs PIN/ABCB (PIN-FORMED/ATP-binding cassette subfamily B)(Peer et al., 2011). Suite à la fixation d'IAA sur les récepteurs TIR1/AFB (Transport Inhibitor Response 1/Auxin Signaling F-box) localisés dans le noyau, on observe la dégradation des Aux/IAA qui sont répresseurs des ARFs (auxin response factors) (**Figure 13 B**). Ces derniers sont des facteurs de transcription qui se fixent sur des éléments présents au niveau des promoteurs des gènes induits par l'auxine. TIR1/AFB sont des protéines F-box qui sont des sous-unités du complexe SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1)-Cullin-F-box protein (SCF) E3-ligase. SKP1 initie alors la dégradation des répresseurs Aux/IAA (auxin response factor/indole-3-acetic acid inducible) par ubiquitination permettant ainsi l'activation de l'expression des gènes (Gray et al., 2001 ; Simon and Petrášek, 2011).

En règle générale, l'auxine joue le rôle de balance dans les processus de développement et dans les réponses de résistance en interagissant de façon antagoniste avec la voie SA (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Un traitement exogène de SA supprime l'expression des gènes dépendants de l'auxine et un traitement exogène d'IAA réprime l'expression des gènes dépendants de SA (Navarro et al., 2006 ; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Navarro et al. (2006) ont montré que suite à la perception du flagelle de *P. syringae* par *A. thaliana*, on observe une répression de la voie de l'auxine ce qui provoque une diminution de la sensibilité puisque la balance penche vers

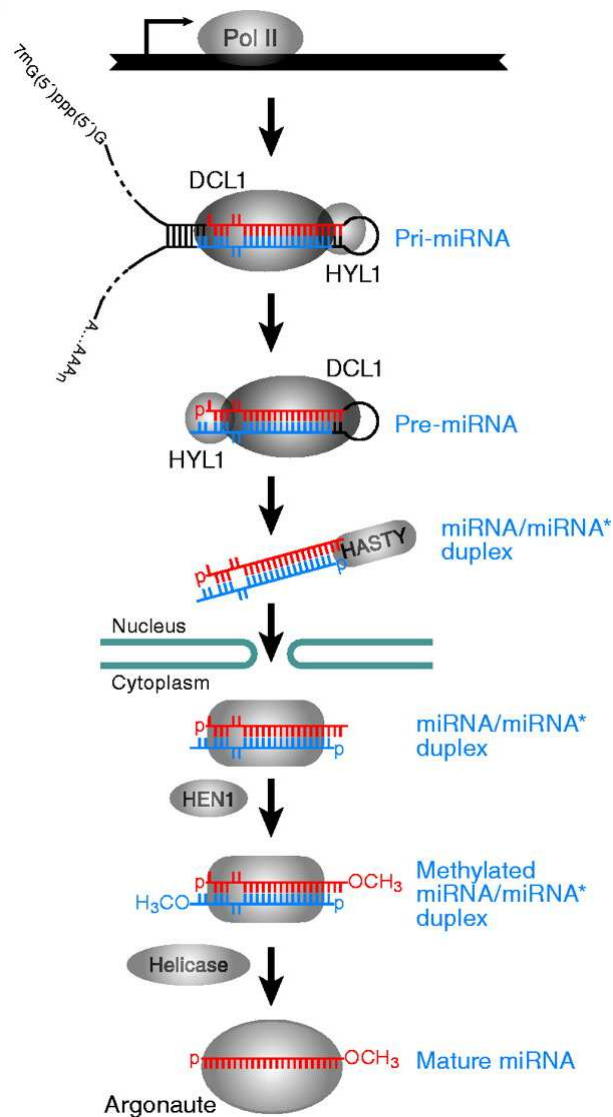


Figure 14 : Voie de biosynthèse des microARN chez les plantes (Du and Zamore, 2005).
Abréviations : Pol II, ARN polymérase II ; pri-miRNA, primary microRNA ; pre-miRNA, precursor microRNA . DCL1, Dicer-like 1 ; AGO1, ARGONAUTE1 ; RISC, RNA-induced silencing complex ; HYL1 (Hyponastic Leaves1) ; HASTY (HST): transporteur de miR ; HEN1, miRNA méthyltransférase.

l'activation de la voie de SA. Cependant, l'activation de la voie de l'auxine augmente aussi la sensibilité d'*A. thaliana* envers des pathogènes nécrotrophes tels que *Plectosphaerella cucumerina* et *Botrytis cinerea* (Llorente et al., 2008). Etant donné que plusieurs pathogènes produisent de l'IAA, on pourrait imaginer que celui-ci joue également un rôle dans la pathogénicité (Gupta, 2004). Toutefois, cela reste encore à démontrer.

5. Le rôle des microARN dans la régulation des gènes des mécanismes de défenses

Parmi les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de gènes chez les eucaryotes, les microARN (miR), des ARN endogènes simple brin non codants qui font entre 20 et 24nt de long, jouent un rôle déterminant. Ce sont des composants majeurs des réseaux de régulation de gènes. De la même façon que les gènes codants pour des protéines, la plupart des gènes de miR sont transcrits par l'ARN polymérase II (**Figure 14**). Il en résulte une molécule d'ARN formant une structure secondaire en épingle à cheveux appelée pri-miR (pour primary miRNA). La production du miR à partir du pri-miR se fait grâce à l'action de l'enzyme DCL1, une endonucléase de la famille des dicer-like (Liu et al., 2014). Le miR fonctionnel est incorporé dans un complexe protéique appelé RISC (RNA induced silencing complex) incluant des protéines AGO (Argonaute). Les complexes RISC sont exclusivement des inhibiteurs post-transcriptionnels qui reconnaissent les gènes cibles par homologie de séquence avec le miR (**Figure 14**). La régulation peut se faire de deux façons selon la complémentarité entre le miR et sa cible : si l'appariement miR/cible est parfait, la cible est clivée au niveau d'un site spécifique grâce à l'enzyme AGO, sinon le complexe RISC crée un obstacle qui bloque l'avancement de la traduction (Zhang et al., 2006).

Plusieurs réseaux de régulation de gènes impliquant les miR ont été établis chez les plantes et les animaux (Chen et al., 2010a). Concernant les plantes, il a été montré que le miR399 joue un rôle majeur dans le réseau de régulation de la voie de signalisation du phosphate. Le miR164 régule la maturation des feuilles d'*Arabidopsis* dans un réseau de régulation qui implique le récepteur de

l'éthylène EIN2 (Kim et al., 2009). Un autre réseau de régulation plus complexe régule la croissance des racines chez *Arabidopsis*. Ce réseau implique le miR160, le miR167, l'"auxin response factor" 6 (ARF6), ARF8 et ARF17 (Gutierrez et al., 2009). Les miR sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus chez les plantes dont la croissance et le développement, la germination des graines, la morphogénèse des feuilles, le développement des fleurs et des racines, et la nodulation (Chuck, et al 2009). Ils sont aussi impliqués dans la régulation de la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Zhang et al., 2006). En ce qui concerne les interactions avec *Verticillium*, il a été rapporté que les miR sont impliqués dans la régulation de la résistance chez le coton (Yin et al. 2012; Zhu et al 2013), l'aubergine (Yang et al., 2013), le colza (Shen et al., 2014) et *Arabidopsis* (Ellendorff et al., 2009).

Notre équipe de recherche a montré récemment que les miR pouvaient également être impliqués dans la régulation de l'interaction entre *M. truncatula* et deux pathogènes racinaires *R. solanacearum* et *V. alfalfae* (Formey et al., in press ; projet MIRMED (microRNA from Medicago) financé par le Génoscope). Le projet MIRMED avait tout d'abord pour objectif de séquencer et répertorier le plus grand nombre possible de miR de *M. truncatula* dans différentes conditions expérimentales permettant d'étudier différents processus de développement (embryogenèse, symbioses nodulaire et mycorhizienne), différents organes (apex racinaire, feuille) ainsi que les réponses à des stress biotiques (interaction avec *R. solanacearum*, *V. alfalfae* V31-2) et abiotiques (stress salin).

6. Résistance contre la verticilliose

Le développement et la culture de variétés résistantes restent le seul moyen de contrôle de la verticilliose. L'identification de *loci* de résistance (simples ou quantitatifs) et la compréhension des mécanismes génétiques sous-jacents sont des prérequis pour le développement de variétés résistantes. Dans cet effort, des gènes et QTL (quantitative trait loci) de résistance ont été identifiés chez plusieurs espèces de plantes dont la pomme de terre, le colza, la laitue, le houblon et *A. thaliana* (Simko et al., 2004 ; Rygulla et al., 2008 ; Wang et al., 2008 ; Häffner et al., 2010 ; Jakse et al., 2013). Les analyses QTL réalisées chez la tomate et le coton ont permis la découverte des seuls gènes de résistance dont les mécanismes sont caractérisés à savoir *Ve1* et *Gb Ve1* (de Jonge et al., 2012 ; Zhang et al., 2012).

a) QTL de résistance contre *Verticillium* identifiés chez différentes plantes

Chez la pomme de terre, 4 QTL (chromosomes 2, 6, 9 et 12) de résistance contre *V. albo-atrum* ont été identifiés chez la variété diploïde *Solanum berthaultii* dont un majeur (40% de la résistance) situé sur le chromosome 2. Chez la variété tétraploïde cultivée (*S. tuberosum* L.), un seul QTL majeur a été identifié sur le chromosome 9. Ce QTL permet la résistance contre *V. dahliae* et *V. albo-atrum* (Simko et al., 2004b). Chez le colza, Rygulla et al. (2008) ont identifié deux QTL majeurs (chromosomes 14 et 15) et deux mineurs (chromosomes 6 et 18). Chez la laitue, les analyses QTL ont permis d'identifier un seul QTL de résistance à effet majeur conférant une résistance élevée contre *V. dahliae* (Hayes et al., 2011). Chez le houblon, un seul QTL a été identifié sur le chromosome 7 (Jakse et al., 2013). Chez *A. thaliana*, pas moins de 15 QTL ont été identifiés, et une découverte importante a été faite. En effet, c'est la première étude qui montre que la résistance contre l'apparition des symptômes et la résistance contre la colonisation systémique d'*A. thaliana* par *V. longisporum* sont contrôlées par deux *loci* différents (Häffner et al., 2010).

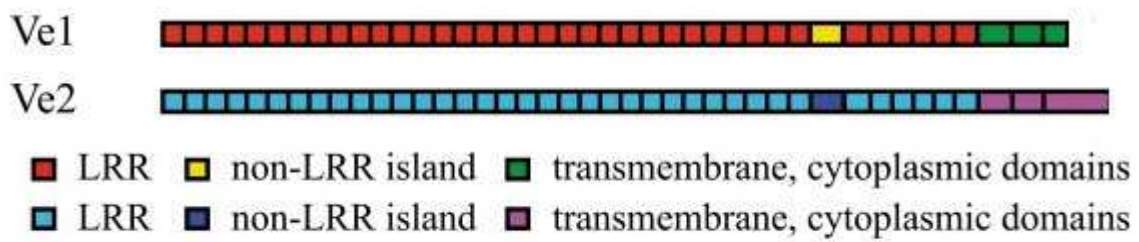


Figure 15. Représentation schématique de la structure des protéines Ve1 et Ve2 d'après Fradin et al. (2014)

a) Résistance *Ve1*-dépendante chez la tomate

A ce jour, seule la résistance chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) contre *V. dahliae* et *V. albo-atrum* est décrite comme totale. Elle est contrôlée par un seul *locus* dominant, le *locus Ve* qui est proche de l'extrémité du télomère du bras court du chromosome 9 (Diwan et al., 1999). Celui-ci a été découvert en 1932 chez l'espèce *Lycopersicon esculentum* (Schaible et al., 1951). Depuis, la plupart des variétés commerciales de tomate portent le *locus Ve*. Il est formé par deux gènes *Ve1* et *Ve2* dont les orientations sont inversées (Kawchuk et al., 2001).

1. Structure de *Ve1* et *Ve2*

L'analyse de la structure primaire de *Ve1* et *Ve2* montre la présence d'un peptide signal, de 38 LRRs imparfaits, d'un domaine transmembranaire et d'un signal d'endocytose cytoplasmique en C-terminal (**Figure 15**). Les motifs structuraux indiquent que *Ve1* et *Ve2* codent pour des récepteurs eLRR qui appartiennent à la classe des RLP auxquels il manque un domaine de signalisation cytoplasmique (Kawchuk et al., 2001 ; Fradin et al., 2009 ; Wang et al., 2010). Les protéines *Ve1* et *Ve2* partagent 84% d'identité au niveau de leurs séquences en acides aminés (aa) (Kawchuk et al., 2001). A l'inverse de *Ve1*, *Ve2* porte un motif Pro-Glu-Ser-Thr (PEST) qui est impliqué dans l'ubiquitination, l'internalisation et la dégradation des protéines ce qui implique que la stabilité de *Ve2* serait beaucoup plus faible comparée à *Ve1* (Rogers et al., 1986 ; Hershko and Ciechanover, 1998). *Ve1* et *Ve2* sont exprimés aussi bien dans les génotypes de tomate résistants que sensibles, et il n'y a aucune mutation au niveau de la séquence codante de *Ve2* entre ces génotypes contrastés dans leur réponse à l'infection. Toutefois, une mutation dans *Ve1* (nucléotide 1220), provoquant un codon stop, est retrouvée dans tous les génotypes sensibles (Fradin et al., 2009).

Ainsi, les génotypes sensibles produisent une protéine *Ve1* tronquée de 407aa au lieu de 1053aa. Cela suggère que seul *Ve1* est impliqué dans la résistance contre

Verticillium (Fradin et al., 2009). Ainsi, les souches de *Verticillium* qui sont contenues par la résistance *Ve1*-dépendante sont dites de race 1 alors que celles qui ne le sont pas sont dites de race 2 (Kawchuk et al., 2001). Des homologues de *Ve1* et *Ve2* ont été identifiés chez d'autres *Solanaceae* comme la pomme de terre (Simko et al., 2004a), *S. lycopersicoides* (Chai et al., 2003), *S. torvum* Swartz (Fei et al., 2004), *S. aethiopicum* et *Nicotiana glutinosa* (Zhang et al., 2013) mais aussi chez d'autres plantes comme la menthe (*Mentha longifolia*) (Vining et al., 2007) et le houblon (*Humulus lupulus* L.) (Majer, 2013).

2. Signalisation de la résistance *Ve1*-dépendante

Une étude réalisée avec des mutants de tomate indique que la voie de signalisation *Ve1*-dépendante nécessite *SIEDS1* (*enhanced disease susceptibility 1 protein*) (Hu et al., 2005 ; Fradin et al., 2009), *SINDR1* (*Non-race-specific Disease Resistance 1*), *SINRC1* (*NB-LRR protein required for HR-associated cell death 1*), *SLMEK2* (*MAP kinase kinase extracellular signal-regulated kinase 2*) et *SISERK3/BAK1* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase3/Brassinosteroid-Associated Kinase1*) (Fradin et al., 2009). L'expression du gène *Ve1* (mais pas celle de *Ve2*) de la tomate chez *A. thaliana* protège celle-ci contre les souches de *V. dahliae* et *V. albo-atrum* de race 1 (Fradin et al., 2011). L'étude de la voie de signalisation de la résistance *Ve1*-dépendante a été réalisée à l'aide de mutants d'*A. thaliana* transgéniques exprimant *Ve1*. Les analyses montrent que la signalisation de la résistance *Ve1*-dépendante est conservée entre ces deux espèces (Fradin et al., 2009 ; Fradin et al., 2011). *SERK1* et *SERK3/BAK1* interagissent avec des récepteurs impliqués dans la perception de brassinostéroïdes et la mort cellulaire programmée, que ce soit pour le développement ou pour la défense (Karlova et al., 2006 ; Roux et al., 2011). D'autres gènes ont été identifiés comme étant nécessaires à la résistance *Ve1*-dépendante chez *A. thaliana*, parmi lesquels *AtNDR1-1* et *AtEDS1-2* dont les homologues sont aussi nécessaires pour la résistance *Ve1*-dépendante chez la tomate.

L'étude de la signalisation hormonale grâce à des mutants d'*A. thaliana* exprimant *Ve1* montre que seule la voie JA serait nécessaire pour la résistance *Ve1*-dépendante (Veronese et al., 2003 ; Fradin et al., 2011). Cette analyse est en accord avec les études d'expression de gènes en réponse à *Verticillium* chez la tomate (Gayoso et al., 2010). En effet, la résistance *Ve*-dépendante implique un stress oxydatif, la production de phénylpropanoïdes, l'induction de la PAL et la production de lignines (Gayoso et al., 2010 ; Robb et al., 2012). Toutes ces réponses sont décrites comme étant induites par la voie de signalisation de JA (Kazan and Manners, 2008 ; Alon et al., 2013).

3. L'effecteur Ave1

Une étude comparative des génomes de souches de race 2 et de race 1 a menée à l'identification d'un gène codant pour l'effecteur reconnu par *Ve1*, à savoir *Ave1* (*Avirulence on Ve1 tomato*) (de Jonge et al., 2012). L'analyse de 85 souches de race 1 montre qu'il n'y a aucune variation au niveau de la séquence nucléotidique d'*Ave1* chez toutes ces souches. *Ave1* code pour une protéine de 134 acides aminés avec quatre cystéines nécessaires pour la virulence. Des homologues du gène *Ave1* existent chez plus de 200 espèces de plantes dont *A. thaliana* et la tomate, alors que chez les micro-organismes, il n'est présent que chez la bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, l'agent causal du chancre mou, le pathogène vasculaire *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et les deux pathogènes fongiques foliaires *Colletotrichum higginsianum* et *Cercospora beticola* (de Jonge et al., 2012).

Ave1 joue un rôle dans la virulence de *Verticillium* chez la tomate et chez *A. thaliana*. En effet, sa délétion provoque une sévère perte d'agressivité des souches (de Jonge et al., 2012). Cette observation est en accord avec le fait que les souches de race 1 sont beaucoup plus agressives que les souches de race 2 (Paternotte and Kesteren, 1993). A part *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aucune implication dans le pouvoir pathogène n'est décrite chez les autres pathogènes (de Jonge et al., 2012). Toutefois l'homologue de *C. beticoli* est aussi reconnu par *Ve1* (de Jonge et al., 2012).

L'expression d'*Ave1* chez *Nicotiana glutinosa* a révélé la présence d'un orthologue de *Ve1* fonctionnel chez cette espèce. Il s'est avéré que celle-ci est aussi résistante contre les souches de race 1 de *V. dahliae*, et elle est sensible à l'infection par une souche de race 1 délaitée d'*Ave1* (Zhang et al., 2013). La recherche du motif d'*Ave1* reconnu par *Ve1* a montré que ce sont les 9 acides aminés (AVNIEFRQI) en extrémité C-terminal qui sont nécessaires et suffisants pour la reconnaissance (Thomma, 2013). La reconnaissance d'*Ave1* par *Ve1* provoque l'induction d'une HR au niveau foliaire chez la tomate et le tabac mais pas chez *N. benthamiana* ou *A. thaliana* (de Jonge et al., 2012 ; Zhang et al., 2013). Cela suggère que la HR n'est pas nécessaire pour la résistance *Ve1*-dépendante.

b) La résistance *Ve1*-dépendante est une PTI

La résistance *Ve1*-dépendante présente les caractéristiques d'une PTI (Thomma et al., 2011 ; de Jonge et al., 2012). En effet, le gène *Ve1* est conservé chez plusieurs espèces de plantes et *Ave1* est conservé chez différents genres de champignons, chez une bactérie et chez plusieurs espèces de plantes (de Jonge et al., 2012 ; Zhang et al., 2013). De plus, la résistance *Ve1*-dépendante est efficace contre *V. dahliae*, *V. albo-atrum* et *F. oxysporum*, transférable d'une espèce de plante à une autre et est conservée chez différentes espèces de plantes (Fradin et al., 2011 ; Zhang et al., 2013). Toutefois, le niveau de résistance reste faible puisqu'elle permet la prolifération (faible) des souches de race 1 dans la plante (Fradin et al., 2009). L'étude de la voie de signalisation montre que BAK1/SERK3 est nécessaire pour la mise en place de la résistance chez la tomate et chez *Arabidopsis* (Fradin et al., 2011). Cette receptor-like kinase joue un rôle crucial dans la PTI déclenchée par fls22 (Chinchilla et al., 2007 ; Heese et al., 2007 ; Kemmerling et al., 2007). L'ensemble de ces données indique une résistance du genre PTI (**voir P 48**).

V. La verticilliose de la luzerne, modèle d'études et objectifs de la thèse

1. La luzerne, *Medicago sativa* L.

La luzerne, *Medicago sativa* L., est une plante légumineuse pérenne de la famille des *Fabaceae*. C'est la plus ancienne plante cultivée uniquement pour le fourrage. En effet, sa culture a été répandue dans l'ancien monde en parallèle avec l'élevage des chevaux. Des signes archéologiques signalent sa présence 2000 ans avant Jésus-Christ dans les pays du Moyen-Orient comme l'Iran, le Turkménistan et les régions du Caucase. Elle a été décrite par des écrivains grecs et romains vers 500 av. JC et introduite en Chine vers 126 av. JC. Par la suite, elle a été introduite en Espagne vers l'an 1100, puis en France vers l'an 1550 (Pegg, 1984). Le nom *Medicago* dériverait de "Médikê", nom donné à la luzerne par Alexandre le Grand qui se serait inspiré de la région de Médie lors de ses conquêtes en Iran. Les romains l'ont nommée "*Lucerna*", mot latin qui signifie "lueur". Les arabes l'appellent "al-fac-facah" (père de toute nourriture) d'où découle le nom Alfalfa. Aujourd'hui, c'est la première plante fourragère cultivée en culture pure au monde avec plus de 35 millions ha de culture (Radovic et al., 2009). Elle est abondamment répandue dans toutes les régions tempérées, tant à l'état sauvage que cultivé. Sa production mondiale était d'environ 436 millions de tonnes en 2006 (FAO, 2006). Les USA sont les premiers producteurs mondiaux et en Europe, la France est deuxième producteur après l'Espagne. Sa popularité est due à sa haute productivité, sa haute adaptabilité aux conditions climatiques et sa haute valeur nutritive. En effet, la luzerne est très riche en protéines, en fibres, en minéraux et en acides aminés essentiels (Bunn et al., 1968). C'est donc une source très importante de protéines bon marché pour l'industrie d'élevage. De plus, la luzerne joue un rôle important dans les rotations de culture. Elle améliore la qualité du sol grâce à ses

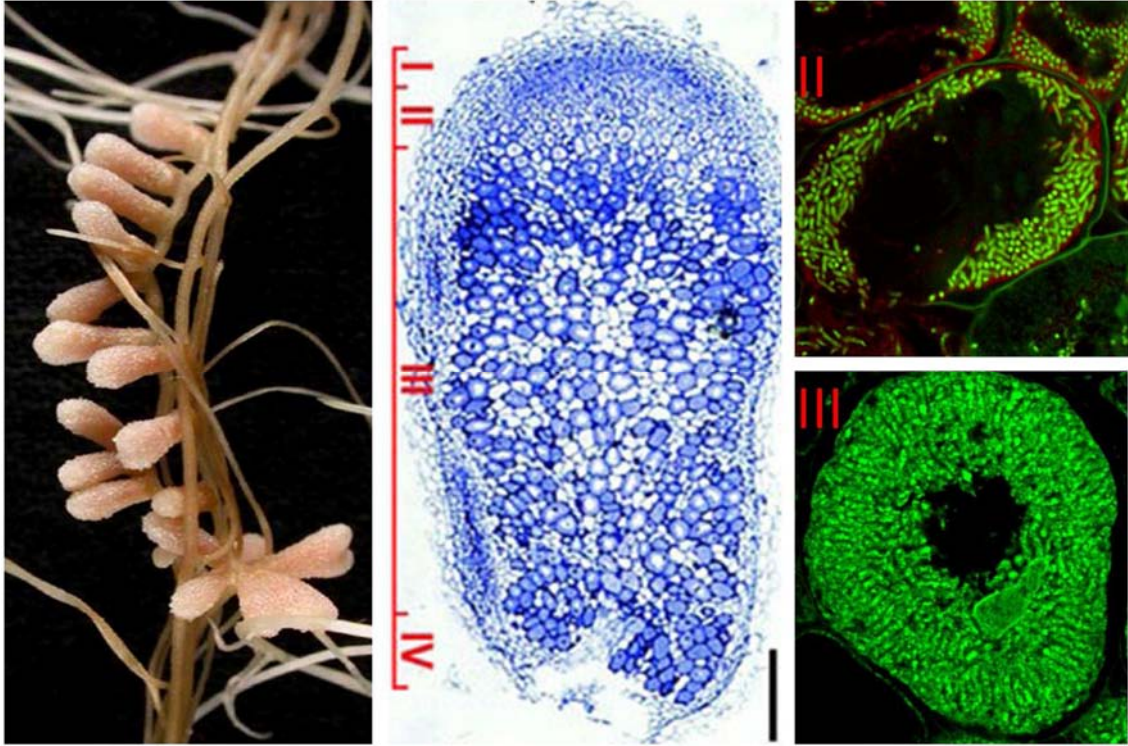


Figure 16. Structure de nodules racinaires fixateurs d'azote formés au cours de la symbiose entre *Sinorhizobium meliloti* et *M. truncatula* (Maróti et Kondorosi, 2014). Les différentes zones des nodules sont indiquées sur la coupe longitudinale au centre de la figure. (I) méristème, (II) Zone d'infection, (III) Zone de fixation de l'azote, (IV) zone de senescence. Les cellules symbiotiques dans la zone II contiennent les endosymbiontes qui sont en voie de différenciation alors que dans la zone III, le cytoplasme de l'hôte est rempli de long bactéroïdes fixateurs d'azote. Les endosymbiontes marqués avec Syto9 expriment une fluorescence verte.

racines qui pénètrent profondément dans le sol et contribue ainsi à son aération et à son enrichissement en matière organique et en azote (Pirhofer-Walzl et al., 2013). La luzerne n'est pas produite uniquement pour le fourrage, mais aussi pour des produits diététiques, phytothérapeutiques et cosmétiques.

Les légumineuses jouent un rôle essentiel dans les écosystèmes du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique par la symbiose avec *Rhizobium* (bactéries aérobies du sol) dans des organes spécifiques formées sur les racines, les nodosités. Elles sont présentes dans de très nombreux écosystèmes, des zones tempérées jusqu'à l'équateur. Il existe plus de 18 000 espèces réparties dans 650 genres, au développement très varié. On y trouve des petites plantes herbacées annuelles, des arbustes, des lianes et des grands arbres qui dominent les forêts tropicales (Young et al., 2003). Dans les principaux foyers d'origine de l'agriculture, des espèces de légumineuses ont été domestiquées. On trouve le pois, le pois chiche et la lentille au Proche-Orient, le haricot en Mésopotamie, l'arachide et le lupin dans les Andes, le soja en Asie et le *Vigna* en Afrique. Les légumineuses fournissent 35 % des protéines végétales utilisées au niveau mondial qu'il s'agisse des graines, comme pour le soja, le lupin ou la féverole, ou de l'ensemble des parties aériennes pour l'alimentation humaine et animale.

La symbiose entre légumineuses et des bactéries fixatrices d'azote de genre *Rhizobium* fait que ces plantes ne nécessitent pas de fertilisant azoté chimique, ce qui est d'un avantage considérable du point de vue économique et écologique. Elle se manifeste par l'apparition de nodosités sur les racines qui résultent de la pénétration des bactéries par les poils racinaires (**Figure 16**). Ces nodosités renferment les bactéries fixatrices d'azote qui se sont transformées en bactéroïdes de plus grande taille (De Faria et al., 1989). Les Rhizobiacées possèdent une nitrogénase, enzyme nécessaire pour la réduction de l'azote dans les nodules. L'activité de cette enzyme est inhibée par l'oxygène d'où la présence de la leghémoglobine dans les nodules fonctionnels pour réguler le taux d'oxygène

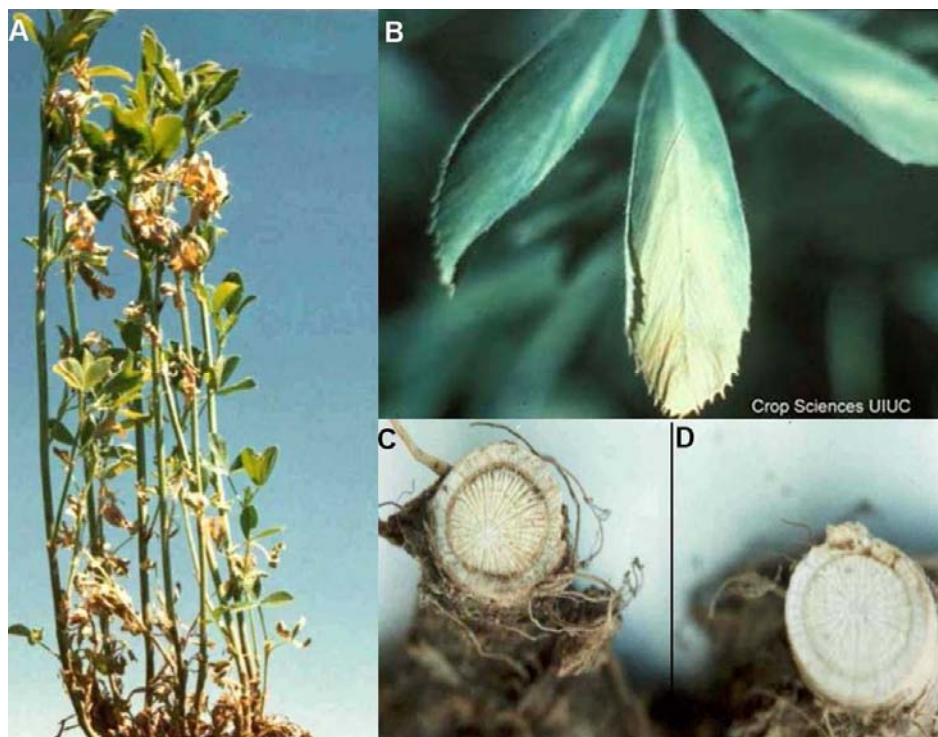


Figure 17 : Symptômes de la verticilliose chez la luzerne cultivée. Images A, C et D de Ghalandar et al. (2004), image B de Crop Sciences (<http://cropdisease.cropsci.illinois.edu/>). A) Symptômes de flétrissement foliaire. B) Dans les phases précoces de la maladie, on observe un jaunissement de la feuille en forme de V aux extrémités des feuilles et les folioles se recourbent vers l'intérieur. C) Brunissement vasculaire typique associé à l'infection en comparaison avec une plante saine (D).

libre (Ott et al., 2005). La symbiose fixerait chaque année, à l'échelon planétaire, autant d'azote que l'industrie mondiale de fabrication d'engrais. Les légumineuses sont utilisées en rotation pour améliorer la qualité du sol et son enrichissement en matière organique et en azote. La nouvelle politique agricole tend à réduire l'utilisation d'engrais chimiques, la culture de légumineuses trouve un regain justifié (Directive Européenne de 1991 dite Directive Nitrate). Toutefois, leur sensibilité aux maladies constitue un obstacle. Il est donc nécessaire de rechercher des sources de résistance durable et efficace.

2. La verticilliose chez *Medicago sativa* L.

La verticilliose reste la maladie la plus dévastatrice de la culture de la luzerne. Le premier symptôme caractéristique observé est un jaunissement en forme de V à l'extrémité des folioles (**Figure 17**). Les feuilles flétries ont tendance à s'enrouler vers l'intérieur et prennent une couleur orange-brun. On observe aussi un retard de croissance des plantes infectées qui perdent toutes leurs feuilles mais souvent les tiges restent vertes. La verticilliose provoque aussi un brunissement des tissus vasculaires au niveau des racines et des tiges (**Figure 17**). C'est une maladie qui se disperse si rapidement que les rendements peuvent baisser de 50% en 3 ans (Peadar et al., 1985). De plus, une fois dans le champ, la maladie devient chronique en raison de la production des structures de dormance. Puisque le contrôle de la maladie n'est efficace que dans le développement de variétés résistantes, toute variété de luzerne commercialisée doit être testée pour sa résistance contre la verticilliose (Larsen et al., 2007). Dans ce but, un test standard basé sur les symptômes foliaires a été mis au point par le North American Alfalfa Improvement Conference Committee.

La verticilliose de la luzerne est causée par *V. alfalfae* (ancienne appellation : *V. albo-atrum*), la seule espèce adaptée à la luzerne (**voir chapitre II à la page 26**). Des études internationales utilisant différentes souches de *Verticillium* isolées à partir de la luzerne provenant

du monde entier montrent que ces isolats sont génétiquement homologues d'une part, et qu'il n'y a aucune différence dans la virulence d'isolats régionaux ou internationaux vis-à-vis des mêmes variétés d'alfalfa (Isaac, 1957 ; Christen and French, 1982). Même si *Verticillium* est un pathogène racinaire, l'infection des cultures de luzerne se fait essentiellement dans les parties aériennes lors de la récolte mécanique. L'infection peut aussi se faire par l'intermédiaire d'insectes vecteurs (Huang et al., 1983 ; Harper and Huang, 1984 ; Huang et al., 1985).

La luzerne est une plante tétraploïde ($2n = 4x = 32$) qui possède donc quatre allèles pour chaque gène. Elle est aussi allogame avec un certain degré d'autocompatibilité et sa pollinisation dépend des insectes. Les plantes d'une même variété ne sont donc pas génétiquement homogènes et sont considérées comme une population (Christie et al., 1985) et représentent un spectre de résistance à *Verticillium* qui va de très sensible à très résistant. Ainsi, on évalue l'index de sévérité de la maladie pour chaque plante d'une population et les populations sont classées de hautement résistante (plus de 50% des plantes sont résistantes) à sensible (moins de 6% des plantes sont résistantes) (Larsen et al., 2007). L'inconvénient de ce test est qu'il ne prend pas en compte le fait que des plantes asymptomatiques peuvent tout de même être infectées et par conséquent servir de réservoir d'inoculum (Christie et al., 1985 ; Pennypacker et al., 1985). Les plantes asymptomatiques ont aussi un rendement réduit (Pennypacker, 1990).

Les mécanismes exacts de résistance sont peu explorés et leurs bases génétiques restent encore inconnues. Plusieurs études ont été menées dans le but de les clarifier. Elles ont permis d'identifier plusieurs variétés à résistance élevée comme Vertus (54% de plantes résistantes) et Maris Kabul (80% de plantes résistantes) desquelles est obtenue directement ou indirectement la majeure partie des variétés avec des niveaux de résistance acceptables sur le marché (Viands, 1985). Chez Vertus, la résistance est multigénique alors que chez Maris Kabul un gène dominant est à l'origine de la résistance (Viands, 1985). La variété Maris Kabul est issue de croisements avec la luzerne sauvage *M. hemicycla* (Heale, 1985). Dans ces deux variétés, on observe une colonisation

discontinue et très limitée au niveau des racines qui pourrait être expliquée par les occlusions vasculaires (Viands, 1985). Les cellules des parenchymes en contact avec les vaisseaux colonisés présentent des modifications dégénératives qui pourraient s'apparenter à celles observées au cours d'une HR (Jane Robb, 2011). D'autres modifications sont observées comme la lignification et la production de callose et de composés phénoliques (Pegg and Brady, 2002 ; Klosterman et al., 2009). La recherche dans ce domaine est très peu fournie et commence à dater. En effet, les propriétés génétiques et reproductives de la luzerne rendent difficiles les études moléculaires, ce qui a poussé les industriels à se focaliser sur la sélection de résistance sans pour autant chercher à connaître les mécanismes sous-jacents.

En utilisant les techniques moléculaires modernes, il sera possible de produire de nouveaux cultivars d'alfalfa avec un niveau de résistance plus élevé à partir d'autres variétés et d'autres espèces. Parmi les *Medicago* spp, *Medicago truncatula* est le meilleur candidat pour identifier de nouveaux *loci* de résistance. En effet des études génétiques et moléculaires sont plus faciles chez *M. truncatula* que chez la luzerne, en raison de son autogamie, sa diploïdie et sa variabilité naturelle.

3. *M. truncatula*, plante modèle des légumineuses

Pour développer les outils nécessaires pour l'analyse génétique et moléculaire des mécanismes qui régulent la réponse des plantes à un pathogène, le choix d'une plante modèle est souvent nécessaire. En effet, la plupart des plantes possèdent un génome de grande taille ou des caractéristiques génétiques complexes comme la luzerne (tétraploïde et allogame), ce qui complique grandement l'analyse génétique. Les plantes modèles présentent des caractéristiques communes comme la petite taille de la plante (pour la commodité de culture et de manipulation), la courte durée de leur cycle de vie, la petite taille de leur génome, la simplicité de leur système génétique (diploïde et autogame) et la proximité évolutive avec les plantes d'intérêt agronomique.

M. truncatula (luzerne tronquée) a été proposée comme plante modèle depuis les années 90 pour étudier la biologie des légumineuses et notamment divers aspects des interactions plantes-micro-organismes (Barker et al., 1990 ; Frugoli and Harris, 2001). *M. truncatula* est une espèce sauvage annuelle du pourtour méditerranéen adaptée aux conditions semi-arides qui pousse pendant l'hiver (Lesins and Lesins, 1979). Comme la luzerne, *M. truncatula* est une plante légumineuse cultivée dans plusieurs régions du monde, notamment comme plante fourragère sur plus de 10 millions d'hectares en Australie. Il existe plusieurs milliers d'accessions qui ont été collectées, et des variétés commerciales comme Jemalong. Elles sont pour la plupart cultivées en rotation avec des céréales. Depuis des années, des populations ont été collectées autour de la Méditerranée, représentant un réservoir de variations génétiques naturelles d'adaptation. *M. truncatula* a un petit génome (~500 Mb) qui est réparti sur 8 chromosomes et est diploïde ($2n = 16$) (Bennett and Leitch, 1995). De plus, l'espèce est autogame avec un temps de génération court. La première transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* a été réalisée en 1990 (Barker et al., 1990), même si la régénération est limitée à quelques génotypes. Nolan et al. (1989) ont montré qu'il est aussi possible de transformer des cellules *in vitro*, d'obtenir des plantes composites (seule la partie racinaire est transformée) (Boisson-Dernier et al., 2001) et des "hairy roots" (racines transgéniques qui peuvent croître très rapidement de façon stable sur un milieu dépourvu de phytorégulateurs) (Crane et al., 2006). De nombreuses ressources génétiques sont disponibles comme des banques de BAC (Bacterial Artificial Chromosome), d'EST (expressed *sequence tag*), des banques de mutants ainsi que des populations de lignées recombinantes et des cartes génétiques et physiques (<http://www.medicago.org/>). Toutes ces caractéristiques en font une plante modèle de choix. Même si *M. truncatula* et *Lotus japonicus* (le lotier qui constitue l'autre plante modèle des légumineuses) ont des caractéristiques génétiques similaires, le développement de leurs nodules est différent. De plus, *M. truncatula* est plus proche phylogénétiquement des légumineuses cultivées en Europe, puisque contrairement à *L. japonicus*, elle appartient au groupe des *Galégoïdes* qui renferment les Trifoliées (luzernes, trèfles), les Viciées (pois, féveroles, lentilles, vesces) ainsi que les

Cicérées (pois chiche). En effet, au niveau génomique, une synténie entre *M. truncatula* et les légumineuses les plus cultivées a été démontrée (Choi et al., 2004 ; Zhu et al., 2005). Cette conservation du génome indique une forte possibilité d'observer des résultats similaires entre *M. truncatula* et les autres légumineuses telles que la luzerne dans les mécanismes en réponse à un pathogène. C'est pour ces différentes raisons que des ressources ont été développées plus vite et à plus grande échelle que pour *L. japonicus* (<http://www.medicago.org/>). Le génome de *M. truncatula* est séquencé et la lignée A17 est désignée comme lignée de référence (Young et al., 2011).

Au tout début, *M. truncatula* était surtout utilisée dans l'étude des processus symbiotiques que ce soit avec les *Rhizobium* ou avec les mycorhizes arbusculaires (Barker et al., 1990 ; Harrison and Dixon, 1994 ; Cook et al., 1995). En effet, *Arabidopsis thaliana*, qui sert couramment d'espèce modèle est incapable d'établir des endosymbioses racinaires. Mais il s'avère que la distribution de *M. truncatula* est influencée par des facteurs édaphiques, climatiques mais aussi biotiques (Tivoli et al., 2006). De nos jours, elle est aussi utilisée pour l'étude des effets de ces différents facteurs chez la plantes. Des études QTL ont permis d'identifier des *loci* de résistance contre les stress biotiques comme la salinité (Arraouadi et al., 2012, Foroozanfar et al., 2014), le froid (Avia et al., 2013), ainsi que pour des stress biotiques comme l'infection par *R. solanacearum* (Ben et al., 2013b), *Phoma medicaginis* (Kamphuis et al., 2008), *Aphanomyces euteiches* (Djébali et al., 2009), encore *Colletotrichum trifolii* (Mackie et al., 2007).

4. *M. truncatula* est une plante hôte de souches de *Verticillium* isolées de luzerne

Dans le cadre d'un projet sur la résistance de la luzerne à la verticilliose, financé par le Ministère de l'Agriculture et en collaboration avec des entreprises semencières et l'INRA, notre laboratoire a mis au point le pathosystème *M. truncatula* – *Verticillium* sp.. La souche de *Verticillium* utilisée (V31-2) a été isolée à partir de la luzerne (Molinéro-Demilly et al., 2006). Dans un premier temps, six lignées parentales (Jemalong A17, A20, DZA45.5, DZA315.16, F83005.5 et

TN1.11) de populations de lignées recombinantes (RILs, pour recombinant inbred line) ont été étudiées, pour savoir si *M. truncatula* est une plante hôte de la souche de luzerne d'une part, et d'autre part, pour identifier des interactions compatibles et incompatibles dans le but de cartographier des QTLs (Quantitative Trait Loci) responsables des phénotypes de l'interaction avec le pathogène (Ben et al., 2013a). Dans le cas de *loci* de résistance, on parle souvent de QRLs (Quantitative Resistance Loci) (Poland et al., 2009). Les résultats montrent des symptômes typiques de flétrissement prononcés chez les lignées F83005.5 et DZA315.16, qui à terme provoquent la mort des plantes, alors que les lignées A17 et DZA45.5 ne montrent pas ou que très peu de symptômes. On obtient les mêmes résultats si l'inoculation se fait de la façon standard utilisée pour *M. sativa* à savoir une inoculation des parties aériennes après blessure comme décrit par Molinéro-Demilly et al. (2006). Dans cette étude, les lignées les plus contrastées sont A17 et F83005.5, respectivement résistante et sensible (Ben et al., 2013a).

Pour la recherche de QTL, les populations LR3 (DZA45.5 × F83005.5) (Hamon et al., 2010), LR4 (A17 × DZA315.16) (Julier et al., 2007) et LR5 (A17×F83005.5) (Arraouadi et al., 2012), ont été retenues (Ben et al., 2013). Les résultats montrent que dans les populations LR4 et LR5 qui ont un parent en commun à savoir A17 qui est la lignée résistante, on ne détecte qu'un seul QTL, *Mt Va I* qui explique 20,6% de la résistance dans la population LR4 et 42.5% dans la population LR5. On peut aussi conclure que les plantes sensibles F83005.5 et DZA315.16 ne portent pas de *loci* de résistance à fort effet (Ben et al., 2013a). En ce qui concerne la population LR3 (F83005.5×DZA45.5), on détecte deux QTLs à effets mineurs situés sur le chromosome 2 et le chromosome 6. A eux deux, ils expliquent 22% de la résistance (Ben et al., 2013a). La résistance apportée par A17 est donc différente de celle apportée par DZA45.5. Ces deux lignées auraient sans doute des mécanismes de résistance différents.

Une autre recherche de QTL de résistance a été réalisée avec une souche de *V. nonalfalfae* isolée de la pomme de terre (LPP0323) et la population LR5 (A17xF83005.5). Dans ce cas, les phénotypes sont inversés par rapport à la souche V31-2. En effet, la lignée A17 est sensible alors que la lignée F83005.5 est résistante. Au total, quatre QTL de résistance ont été détectés. Ils sont situés sur le chromosome 1, 2, 6 et 8, et expliquent 36% de la résistance (Negahi et al., 2014). Les mécanismes génétiques de résistance contre l'isolat de la pomme de terre sont donc différents de celles contre l'isolat V31-2. Ceci soulève la possibilité d'un mécanisme de résistance spécifique contre la souche V31-2.

5. Objectifs de la thèse

Basé sur les résultats décrits ci-dessus, mon objectif était de caractériser finement l'interaction entre *M. truncatula* et la souche V31-2 et d'identifier des mécanismes moléculaires (perception, signalisation, défenses) impliqués dans la résistance et sensibilité par une approche de transcriptomique. A terme, la compréhension de ces mécanismes devrait permettre d'améliorer la résistance à la verticilliose chez *M. truncatula*, *M. sativa* et peut-être aussi d'autres légumineuses. Dans un premier temps, j'ai étudié le processus d'infection chez les deux lignées A17 et F83005.5, respectivement résistante et sensible, par une étude microscopique. Une souche exprimant la GFP était déjà disponible au laboratoire. Ce travail était nécessaire non seulement pour comprendre les étapes de l'interaction, mais aussi pour à déterminer les conditions pour l'étude transcriptomique à grande échelle par une technique proche du RNAseq, la MACE (Massive Ananlysis of cDNA Ends). Cette étude comparative (lignée résistante comparée à lignée sensible, condition non-inoculée comparée à condition inoculée) devait permettre d'identifier des gènes régulés spécifiquement en réponse à l'infection, et différemment chez les deux lignées. Face à la quantité des données de séquençage par la MACE, le travail de cette thèse a été limité à l'étude des réponses précoces à l'infection qui sont supposées être déterminantes pour le devenir de l'interaction. De plus, puisque ce type d'étude et les analyses bioinformatiques qui en font partie sont longues, il était clair que

l'étude transcriptomique ne pouvait pas aboutir à une validation fonctionnelle dans le temps de la thèse. En tant qu'étude fonctionnelle préliminaire, j'ai donc aussi réalisé une étude de l'implication de phytohormones dans la défense contre *Verticillium* par des traitements exogènes.

B. MATERIEL ET METHODES

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CULTURE

1. *Verticillium*

Un isolat de la luzerne (Molinéro-Demilly et al., 2006) appelé V31-2 et qui nous a été fourni par Barenbrug Tourneur Recherches (Negadis, France) a été utilisé dans l'ensemble de ces travaux. Les souches exprimant la GFP, C3A1a, C3A1b, C3A1b' et C3D2c' ont été obtenues par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens* dans notre laboratoire avant le début de cette thèse. Les souches de *Verticillium* sont cultivées sur du milieu PDA (Potato Dextrose Agar, BD Difco) à 24°C dans le noir, pendant 2 semaines pour l'obtention de spores.

Pour la conservation, les boîtes de cultures âgées de 2 semaines sont gardées à 14 °C ou des suspensions de spores sont congelées à -80 °C dans 25% de glycérol.

L'obtention de mycelium pour les extractions d'ADN nécessite une culture en milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth, BD Difco), dans les mêmes conditions d'incubation.

2. Matériel végétal

Les graines des lignées A17 et F83005.5 de *M. truncatula* proviennent de multiplications réalisées dans nos serres.

Les graines de NF2859 proviennent de la banque de mutants *Tnt1* de The Samuel Roberts Noble Foundation (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/>). Huit plantes ont été cultivées en serre pour la multiplication en janvier 2012.

Les graines de *Medicago* sont scarifiées à l'aide d'un papier de verre, puis laissées dans de l'eau pendant 30min. Du papier absorbant est posé dans des boîtes de Petri et les graines y sont dispersées sur toute la surface. Les boîtes sont fermées avec du Parafilm pour conserver l'humidité

Tableau M. 1 : Composition du milieu Fahraeus

Milieu de culture de *M. truncatula* en conditions hydroponiques : Milieu Farhaeus

Macro-éléments

| Produit | MW(g /mol) | Références | Qtité pour 100ml | Stock | Pour 1L de milieu |
|--|----------------------|--------------------|------------------|--------|-------------------|
| CaCl ₂ , 2H ₂ O | 147,02 | Merck 102 382 1000 | 13,20g | 1000 X | 1ml |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 246 | ICN 191 422 | 12,00g | 1000 X | 1ml |
| KH ₂ PO ₄ | 136,09 | Prolabo 26 936 293 | 10,00g | 1000 X | 1ml |
| Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O | 177,99 | Merck 6580 1000 | 7,50g | 500 X | 2ml |
| citrate d'ammonium ferrique | 16,5 - 18,5 % fer | SIGMA F-5879 | 0,50g | 1000 X | 1ml |

Micro-éléments

| Produit | MW(g /mol) | Références | Qtité pour 100ml | Stock | Pour 1L de milieu |
|--|------------|-------------------------------|------------------|---------|-------------------|
| MnCl ₂ , 4H ₂ O | 197,91 | Merck 0 145 265 | 10mg | 10000 X | 100µl |
| CuSO ₄ , 5H ₂ O | 249,68 | Merc A 45 22 90 | 10mg | 10000 X | 100µl |
| ZnCl ₂ | 136,28 | Prolabo purifié 29 144 230 | 10mg | 10000 X | 100µl |
| H ₃ BO ₃ | 61,83 | Prolabo Norm. 20 185 297 | 10mg | 10000 X | 100µl |
| Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O | 241,95 | Merck 2 324 553 | 10mg | 10000 X | 100µl |

puis enroulées dans de l'aluminium pour l'obscurité et placées à 4°C pendant 4 jours pour lever la dormance, puis 1 jour à 14°C.

Pour les cultures en substrat tourbe Jiffy (marque déposée), les plantules de *M. truncatula* sont repiquées directement après germination et placées dans une chambre de culture à 25°C avec une photopériode 16h (170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à 23°C.

Pour la culture en hydroponie, nous avons utilisé des boîtes de cônes de micropipettes de 1ml. Toute la surface du portoir des cônes a été recouverte de papier adhésif. Un scalpel a été utilisé pour faire des incisions sur l'adhésif à raison d'un trou sur deux. Les boîtes de culture sont ensuite remplies de milieu Fahraeus contenant une source d'azote avant de transférer les plantules (**Tableau M. 1**). Les racines des plantules sont passées à travers ces incisions (à l'aide de pinces) pour éviter que les plantes tombent dans le milieu de culture. Après le transfert, il est souvent nécessaire de rajouter du milieu. Les boîtes de cultures sont ensuite placées en chambre de culture à 25°C avec une photopériode de 16h (170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à 23°C. Les cultures en Jiffy et en hydroponie sont maintenues dans une mini-serre fermée les 2 premiers jours après le repiquage pour éviter le stress du changement brusque d'humidité. Pour la préparation du milieu de culture, des solutions stocks des macro- et microéléments sont préparés puis autoclavées (Tableau M. 1). Par la suite, les éléments sont mélangés dans un bécher contenant un peu d'eau Milli-Q pour éviter la précipitation des composés, excepté le CaCl_2 . Pour la source d'azote, du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, 101 211 1000) est ajouté à raison de 0,33g/l. Le volume est ajusté après avoir ajusté le pH à 7,5 en utilisant du KOH. Le milieu est par la suite autoclavé à 120°C pendant 20mn. Le CaCl_2 n'est rajouté qu'après le refroidissement du milieu pour éviter sa précipitation. Dans mon cas, le pH du milieu a été réajusté à 7,5 avant utilisation mais cela n'est pas nécessaire.

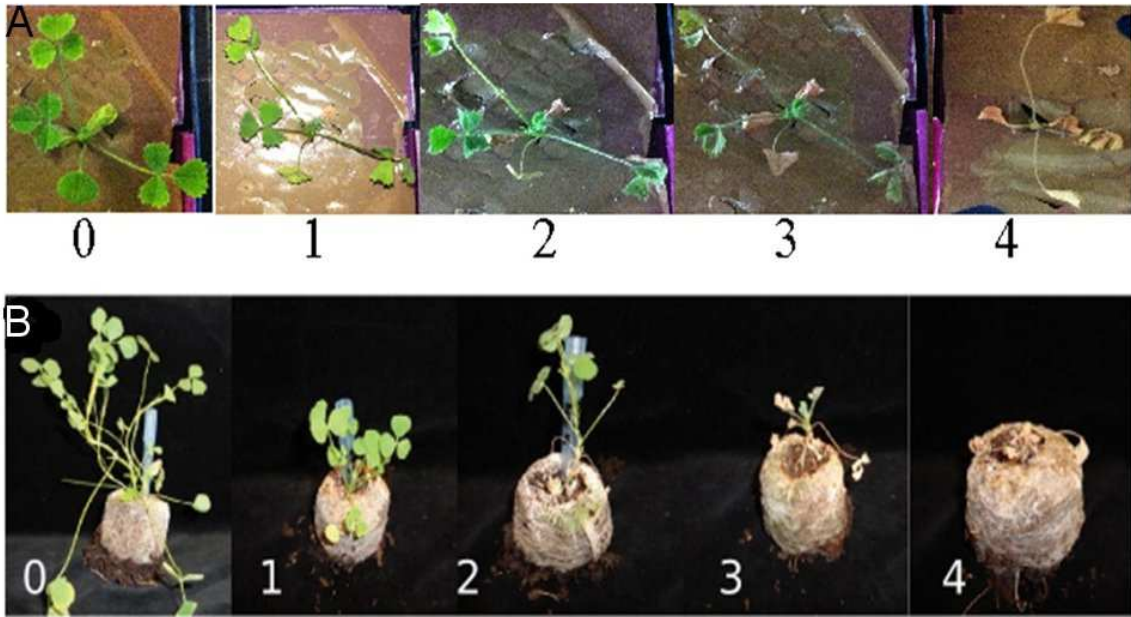


Figure M.1 : Échelle de symptômes en hydroponie (A) et en Jiffy (B).

II. BIOESSAIS

1. Inoculation et notation des symptômes

La suspension de spores est obtenue à partir d'une culture de 15 jours sur milieu PDA. Sous la hotte, la colonie est recouverte d'eau stérile. Un râteau confectionné à partir d'une pipette Pasteur est utilisé pour racler doucement le mycelium afin de libérer les spores. La concentration en spores de la suspension est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez. Une dilution au 10^{ème} est souvent nécessaire pour un comptage correct. La suspension de spores est ajustée à 10⁶ spores par ml avec de l'eau stérile.

Pour l'inoculation, on utilise 800 ml de solution de spores par boîte (condition hydroponique) ou plateau de (30cmx30cm ; condition Jiffy).

Pour les cultures en hydroponie, les extrémités des racines de plantules de 10 jours sont coupées pour couper et exposer les extrémités des racines. Par la suite, les racines sont plongées directement dans la suspension de spores pendant 1h, puis 10min dans de l'eau stérile avant de les remettre dans le milieu Fahraeus. La culture continue dans une chambre à 20°C avec une photopériode de 16h (170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Pour l'inoculation des cultures en Jiffy, les bases des Jiffy (environ 1cm) sont coupées. Les Jiffy sont ensuite trempés dans la suspension de spores pendant 30min, puis transférés sur des plateaux contenant du terreau et placés dans une chambre de culture à 20°C avec une photopériode de 16h (170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Pour noter le score des symptômes, une échelle de 0 (plante saine) à 4 (plante morte) mise au point dans notre laboratoire a été utilisée (**Figure M. 1** ; Ben et al., 2013a). Les symptômes sont notés tous les jours. En général, ils commencent à apparaître au bout d'une semaine après l'inoculation.

Pour déterminer les poids frais des racines, les racines sont brièvement posées sur du papier absorbant avant de faire la pesée plante par plante. Pour les poids secs, les échantillons (racines ou feuilles) sont mis à sécher l'étuve à 65°C pendant 48h avant d'être pesés.

2. Traitement hormonaux

Des solutions stock de 10mM d'ABA (Sigma), ACC (MP Biomedicals), IAA (Sigma), MeJA (Sigma), ou SA (Sigma) ont été préparées et conservées à 4°C pour une semaine au maximum. Pour ABA, IAA et SA qui sont solubles dans l'alcool, les poudres ont été dissoutes avec un petit volume d'alcool avant d'ajuster le volume avec de l'eau.

Pour les traitements, les dilutions finales à 10 µM ont été réalisées directement dans le milieu de culture de plantes de 9 jours (une boîte contient ~600ml) avant de remettre les plantes en chambre de culture à 25°C. L'inoculation est faite après 24 heures de culture puis les boîtes de culture sont transférées dans la chambre à 20°C. Les hormones sont maintenues jusqu'à la fin de l'expérience, soit 21 jours après l'inoculation.

Pour la mesure de croissance de la colonie de *Va V31-2*, les solutions stock d'hormones à 10mM ont été stérilisées par filtration avec un filtre Millipore 0,22µm puis mélangées au milieu PDA avant de le couler dans les boîtes de Petri. Des carrés de 1cm² de gélose d'une culture de *Verticillium* ont été posés sur le milieu PDA au centre de la boîte de Petri. Le diamètre est mesuré sur le long de deux lignes perpendiculaires tracées au début de la culture.

3. Analyse statistique des données phénotypiques

a) Développement de la maladie

Pour les analyses statistiques, l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curves) a été calculé pour chaque plante phénotypée en utilisant le package agricolae du logiciel R (The R Project for Statistical Computing). Les graphiques ont aussi été obtenus avec le même package. L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée et la comparaison des moyennes a été faite avec le test de Tukey.

b) Poids frais et secs racinaires et foliaires

Les résidus de l'ANOVA ne suivaient pas une distribution normale et leurs variances n'étaient pas homogènes. Il a donc fallu faire une transformation en log des poids pour l'analyse des variances. La comparaison des moyennes a été réalisée par la méthode de Newman-Keuls.

III. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

1. Extraction d'ADN

Les échantillons végétaux ont été récoltés et mis à sécher à 65°C pendant 48h minimum dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 3 à 4 billes de verre. Pour la quantification de *Verticillium in planta*, les racines ont été traitées auparavant avec 1% NaOCl pendant 1 min puis rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile pour détruire l'ADN fongique à la surface des racines (Maciá-Vicente et al., 2009). Les échantillons sont réduits en poudre à l'aide du broyeur mécanique pendant 30 secondes à puissance maximale (Retsch MM300, 30 pulses par seconde).

Le mycelium fongique a été obtenu par filtration d'une culture liquide d'une semaine en milieu PDB (Potato dextrose broth, BD Difco). Les échantillons fongiques ont été congelés puis broyés sous azote liquide dans un mortier à l'aide d'un pilon.

Pour l'extraction, la poudre a été mélangée avec 600µl de tampon CTAB (100mM Tris HCl pH8, 1,4M NaCl, 20mM EDTA pH8, 2% de Hexadecyltrimethylammoniumbromide) autoclavé puis agitée vigoureusement à l'aide du vortex. Les échantillons ont été par la suite mis au bain marie à 65°C pendant 15 minutes pour inactiver les DNases. Les étapes suivantes ont été réalisées en portant des gants et en travaillant sous la hotte chimique.

Après les 15 minutes d'incubation, 600µl de chloroforme ont été rajoutés avant de les placer sur un agitateur rotatif à 40 tours/minute pendant 15min. Une centrifugation de 5 minutes à 13200rpm est réalisée et la phase aqueuse est récupérée dans un tube propre. Pour la précipitation de l'ADN, 400µl d'isopropanol sont ajoutés. Pour cette étape, il est important d'inverser les tubes manuellement 3 à 4 fois avant de centrifuger 1min à 13200rpm. Le culot a été gardé après avoir jeté le surnageant et l'excès de liquide est éliminé en laissant égoutter le tube retourné sur du papier absorbant.

Le culot a été repris dans 700µl d'éthanol 70% et les tubes ont été inversés 3 à 4 fois manuellement puis laissés reposer 10min avant de centrifuger 1min à 13200rpm. Le culot a été récupéré et l'excès d'éthanol est éliminé à l'aide d'une micropipette. Les tubes ont été laissés ouverts pour que l'éthanol s'évapore entièrement (le culot devient translucide).

Le culot a été repris dans 100µl d'eau ultra-pure ou de l'eau contenant 0,1% (v/v) de RNase A (Sigma) dans le cas de quantification de *Verticillium*. Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C.

Les dosages des échantillons ont été réalisés à l'aide du Nanodrop Spectrophotometer ND-100 (Thermo Fisher Scientific).

Tableau M. 3: Programme PCR

| Programme PCR | | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------------|--------------|
| Étapes | Nombre de cycles | Température | Temps |
| Dénaturation préliminaire | 1 cycle | 94°C | 4 min |
| Dénaturation | 38 cycles | 94°C | 30 sec |
| Hybridation* | | °C | 30 sec |
| Elongation | | 72°C | 30 sec |
| Elongation final | 1 cycle | 72°C | 6 min |

* Température d'hybridation varie selon les amorces utilisées, voir **Tableau M. 4**.

Tableau M. 2: Mélange réactionnel pour la PCR pour un échantillon**Mélange réactionnel**

| Produits | Concentration stock | Volume (µl) |
|---------------------|----------------------------|--------------------|
| H ₂ O | | 13 |
| PCR Buffer | 10x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 50mM | 1,25 |
| dNTPs | 1,25mM | 4 |
| Mélange des amorces | 5µM | 2 |
| Taq Pol. | 35u/µl | 0,25 |
| ADN génomique | 10ng/µl | 2 |

2. PCR

Des réactions de PCR simples ont été réalisées pour la caractérisation de la souche de *Verticillium* et des mutants *npr-1* de *M. trunctatula*. Le mélange réactionnel est présenté dans le **Tableau M. 2**, le programme PCR dans le **Tableau M. 3** et les amorces utilisées dans le **Tableau M. 4**.

3. Quantification de l'ADN de *Verticillium* par qPCR

Cette analyse a pour but d'estimer la quantité d'ADN du champignon *in planta* par rapport à la quantité d'ADN de *M. trunctatula* dans un échantillon donné. Pour cela, l'ADN de *Va V31-2* est quantifié d'un côté, et l'ADN de *M. trunctatula* de l'autre.

Une gamme étalon de 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,001 et 0,0001µg d'ADN de *Va V31-2* dans 3µl a été réalisée. Pour l'amplification, les amorces vert853F-CGAGTTCGCGGCAGGTA et vert927R-GGCCACGCTAGCCTTCACTA (Larsen et al., 2007) ont été utilisées.

Une gamme étalon de 100, 50, 25, 12,5 et 6,5µg d'ADN de *M. trunctatula* F83005.5 dans 3µl a été réalisée. Les amorces pour amplifier l'actine (F-TGCCTACCGTCGATGTTTCAGT ; R-TTGCCCTCTGATTCCTCCTTG) ont été utilisées (Ariel et al., 2010).

La concentration de l'ADN de l'échantillon est déterminée grâce au Nanodrop Spectrophotometer ND-100 (NanoDrop Technologies) puis ajustée à 50ng/µl pour la quantification l'ADN de *V31-2*. Pour la quantification de l'ADN de *M. trunctatula* dans l'échantillon, les 50ng/µl sont dilués au 10^{ème}.

Le mélange réactionnel contient 5µl de "Power SYBR® Green PCR Master Mix reagent" (AppliedBiosystems), 3µl d'ADN et 2 µl du mélange des d'amorces à 5µM. Les conditions d'amplification sont : 50°C pendant 2 min, 95°C pendant 10 min, puis 40 cycles de 95°C pendant

Tableau M. 4 : Amorces utilisées pour les PCR

Amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire des souches de *Verticillium*

| Nom d'amorces | Séquence | Température d'hybridation | Bibliographie |
|---------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| VdAve1F | AAGGGGTCTTGCTAGGATGG | 62°C | de Jonge et al., 2012 |
| VdAve1R | TGAAACACTTGTCTCTTGCT | | |
| verti-AaTR | CTGGATGGAGACGTAGAAGGC | 62°C | Inderbitzin et al., 2013 |
| verti-AaF | GGCCTCGATAGCATCGCC | | |
| verti-AlfD1R | TGCCGGCATCGACCTTGG | 62°C | |
| verti-AlfF | TCATGCCCCCTTTGTTCATCGAT | | |
| verti-NoF | CCTCGAAAAATCCACCAGCTCTA | 64°C | |
| verti-NoNuR | GTGGTTGAGATCCTCACGCTTC | | |
| verti-DF | CCGGTCCATCAGTCTCTCTG | 55°C | |
| verti-DR | CTGTTGCCGCTTCACTCG | | |

Amorces utilisées pour le génotypage du mutant *Npr1*

| Nom d'amorces | Séquence | Température d'hybridation | Bibliographie |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------|--|
| Tnt1-F* | ACAGTGCTACCTCCTCTGGATG | 62°C | Informations fournies par la NOBLE Fondation |
| Tnt1-R* | CAGTGAACGAGCAGAACCTGTG | | |
| Medtr5g090770.1 NPR1 LIKE_3_F | GAGTAGCAAGGTCTGACATGGA | 60°C | |
| Medtr5g090770.1 NPR1 LIKE_3_R | GTGCAGTGCATAGGCATCAT | | |

15 sec et 60°C pendant 1 min, dans l'ABI PRISM® 7900 HT SequenceDetection System (AppliedBiosystems). Les données sont analysées avec le logiciel SDS 2.3 (AppliedBiosystems). Les quantités d'ADN sont déterminées par le logiciel d'après les gammes étalons qui permettent la conversion des cycles seuils (ct ou threshold cycle) en quantité. La quantité d'ADN du pathogène est exprimée en ng/μg d'ADN de *M. truncatula*.

4. Extraction d'ARN

Les échantillons ont été récoltés et emballés dans du papier aluminium avant d'être congelés dans de l'azote liquide pour être conservés à -80°C. Par la suite, ils ont été broyés dans de l'azote liquide en utilisant pilon et mortier précédemment refroidis dans de l'azote liquide.

La poudre obtenue a été transférée dans un tube (30ml) et plongée dans l'azote liquide avant d'être conservée à -80°C (il est important de peser le tube avant et après ajout de l'échantillon pour déterminer le poids de l'échantillon).

Les étapes suivantes ont été réalisées sous la hotte chimique et en portant des gants.

Pour l'extraction, 1ml de Trizol (Invitrogen) pour 250mg de tissu broyé a été ajouté. Le tout a été mélangé au vortex pendant 15s puis incubé pendant 15min à 37°C pour permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. 200μl de chloroforme pour 250mg de tissu broyé ont été ajoutés puis mélangés au vortex pendant 15s. Une centrifugation de 15min à 4°C à 12000g a permis la séparation des phases aqueuse et organique. La phase aqueuse a été transférée dans un tube propre.

Pour la précipitation de l'ARN, 500μl d'isopropanol (froid) pour 250mg de tissu broyé ont été ajoutés puis mélangés par inversion du tube 3 à 4 fois manuellement avant d'incuber le tube 15min dans la glace. Une centrifugation de 20min à 4°C à 8000g a été réalisée puis le surnageant

Tableau M. 5 : Mélange pour la transcription inverse

Synthèse des ADNc avec le KIT ImProm-II™ Reverse Transcription System

Mélange pour la transcription inverse

| Produits | | Volume unité (µl) |
|-------------------------------|-------|--------------------------|
| reaction Buffer | 5X | 4 |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,2 |
| dNTP mix | 10mM | 1 |
| RNAsin Ribonuclease Inhibitor | 2500u | 0,5 |
| Reverse Transcriptase | | 1 |
| | Total | 7,7 |

a été éliminé. Le culot a été repris dans 1ml d'éthanol 70% (froid) puis centrifugé 10min à 4°C à 8000g.

Le culot a été séché en ouvrant les tubes (dans la glace) puis repris dans 100µl d'eau ultra-pure. Cette eau a été auparavant traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate, SIGMA) et autoclavée.

L'ARN a été quantifié en utilisant un Nanodrop Spectrophotometer ND-100 (Thermo Fisher Scientific) et la qualité a été vérifiée en utilisant l'Agilent 2100 BioAnalyser avec des puces RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies).

5. qRT-PCR pour l'étude d'expression de gènes

a) Traitement à la DNase

Les traitements à la DNase ont été réalisés avec le Kit DNase Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Le mélange réactionnel a été composé avec 1µl du Reaction Buffer, 2µl du RNase-Free DNase, 2µg d'ARN et le volume a été ajusté à 10µl.

Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30min. La réaction a été stoppée en ajoutant 1µl RQ DNase Stop suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min avant de les conserver à -80°C.

b) Synthèse des ADN complémentaires

Pour la synthèse des ADN complémentaires nous avons utilisé le kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). 500ng d'ARN traités à la DNase dans 11,3µl ont été mélangés avec 1µl d'OligodT15 puis incubés à 70°C pendant 5 min avant de les incuber dans la glace pour au moins 5 min. En suite, 7,7µl de mélange pour la transcription inverse sont ajoutés (**Tableau M. 5**), ce qui fait un volume finale de 20µl.

Tableau M. 6 : Amorces utilisées pour les qRT-PCR

| ID Mt v3.5 | Forward | Reverse |
|---|---------------------------|--------------------------|
| Validation de la MACE par qRT-PCR | | |
| IMGA_Contig_240964_1.1 | GCAACAAGAGGAGCTTTGGT | GGACCCCATATGCTCAAGAA |
| IMGA_contig_55783_1.1 | CGATTCATGGGTGATGACAG | TCCCCACCTGAGAAGAAAAG |
| IMGA_contig_70372_1.1 | CTTGCCCTTCTCCTTATTTC | CACACTTTTGCTTCCACCTC |
| IMGA_contig_73988_1.1 | GGATTCAACCGTCGAGTCAT | TGCTGCTCTGATTCTGGAAC |
| IMGA_contig_83034_1.1 | AGGTGCTGAGCAATGCAA | TCCACAAGGTCCTTTCATCC |
| Medtr1g083950.1 | CGGCAACCATGGAGAAGTAT | GTGGCTTCCCATAACCAAGA |
| Medtr2g035440.1 | GGTTCATCTGCGCCATATAC | GCTGGAAGAATCACATCTCG |
| Medtr2g099470.1 | ACGGGTATTGTGGTAATGGTG | GGAGTCATCCAAAGATCCAGAC |
| Medtr2g101370.1 | TTGGAGCTGGTGAAGGAGTT | ATTGACCCACCAGAGAATGG |
| Medtr3g047140.1 | ACCTTATGCGAATGTAGGC | TGAAAGCGGTAGTGTGATCG |
| Medtr3g089970.1 | CACATTTTCCCTCGCTAGTC | ACGCCATGAGATTGCATAC |
| Medtr4g021260.1 | CGGTGTTTCAGAATGGTACG | CTCCGCCAGTAGGATCAAAAT |
| Medtr4g126920.1 | GGTTCCTCTTGTCTTCCAA | GCCTTGAGGAAATCGCTTAG |
| Medtr5g040430.1 | GGTGTTTGAAGAAGGGGTCA | TGCTTCGTAGGTGCAAGAAG |
| Medtr5g089580.1 | CCTTCTCAAGCCATTCCATC | GTGGATCTTGTGGCTCCATT |
| Medtr7g016700.1 | TGAGGCTTTTGTAGCCATTG | AGCACTTCTCTGGTTGCATT |
| Medtr8g022300.1 | ACAGGTTTGGGTAAGCTTCG | GAGGTGTTGTAGCAGCAGAAGA |
| TC175803 | TGTTGGTGAAGGTGAAGCAG | TATGTGCCCTTGAAGACTGTG |
| TC183087 | TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAC | AGCCAGAAGCTAAGAAAGCTG |
| TC191486 | AGCGATGTTGGAGTGATGAG | AGGGACTTTAGATGAGGACACC |
| Medtr8g018570.1 | GGTCAATGCCGAGGGTATTA | AGGCCTTGCTCAGTGAAAAC |
| TC179073 | CCTCAGCTTGTGAAAATCC | GCTAATTTGGTGGCCAACTC |
| TC176982 | GGCAAATCACTTCCTCACC | CACATAGTTTCTCCTCCGGTTC |
| TC197452 | GTCTTGAGGACTTAGCATAGCTC | CTGGCAGAATTCAGTGTCCA |
| Medtr4g100380.1 | GCGGCTTTGGCTTATGATAG | TGTTGTGCCACTTGACTTCC |
| Medtr1g093600.1 | TCCAGAAATCTACGGCGTCT | CACGCTGGTGTCTCTCGTAA |
| Medtr3g109160.1 | GGAAGGAGGAGGATCAAACA | GAGCCAAATACTCGGTTGGT |
| Medtr8g022440.1 | CGTGAACCTCCGATGTCATTC | CCCCAATTGTGTCTCACCTT |
| Gène impliqués dans la voie du jasmonate | | |
| TC93960 (VSP) ^c | GACCTTTGGGTGTTGACATTGA | TCCTTCTGTTGAGTGGTCTTCCT |
| TC100490 (PI) ^c | GCTGAACCAGAGGCAGTAGTAGACA | GAGAGTTGGAATGTAATCAAGACC |
| Medtr4g068550 (AOS) ^c | GGTTTATTGGCGATGGAGAG | AGTGGGACCCAAAACAGATG |
| Normalisation | | |
| Medtr2g099090.1 | CAGGTGATTGGTTCAGCAAC | CCGCAAAGTAGAAGCTGATG |
| Medtr2g033910.1 | GATGCTGCTCGTTACGTTTG | ACTTGAGGCCGAGTATTCCA |
| Medtr3g085850.1 ^a | TGCCCTACCGTCGATGTTTCAGT | TTGCCCTCTGATTCCCTCCTTG |
| TC117750 ^b | ATTCCAAAGCGGCTGCATA | CTTTGCTTGGTGCTGTTTAGATGG |

^c (Gao et al., 2007) ; ^a (Ariel et al., 2010) ; ^b Ben et al. 2013

pour le cycle d'amplification, les échantillons sont incubés à 25°C pendant 5 min, puis à 42°C pendant 60 min et enfin, à 70°C pendant 15 min.

c) PCR quantitative

Pour les réactions de q-PCR, la machine ABI PRISM® 7900 HT SequenceDetection System (AppliedBiosystems), le Kit Power SYBR® Green kit (AppliedBiosystems) et des plaques 384 puits ont été utilisés. Deux réplicats techniques ont été réalisés pour chaque échantillon. Le volume réactionnel est de 10µl soit 5µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix, le mix d'amorces spécifiques à 5µM chacune et 3µl d'ADNc à 3ng/µl. Les conditions d'amplification sont : 50°C pendant 2 min, 95°C pendant 10 min, puis 40 cycles de 95°C pendant 15s et 60°C pendant 1 min. Les données sont analysées avec le logiciel SDS 2.3 (Applied Biosystems).

La variation de l'expression (Fold) a été déterminée par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où ΔCt = valeur Ct du gène d'étude – valeur Ct du gène de référence interne et $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt de l'échantillon inoculé – ΔCt de l'échantillon non inoculé (Livak and Schmittgen, 2001).

Pour la référence interne, nous avons utilisé la moyenne harmonique des Ct de 4 gènes : Medtr2g099090.1, Medtr2g033910.1, Medtr3g085850.1 et TC117750 (Glyoxalase 2, Phosphatase 2C, G3PDH et H3L respectivement).

Toutes les séquences utilisées pour les amplifications sont présentées dans le **Tableau M. 6**.

I. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Les racines ont été rincées brièvement dans de l'eau stérile. Des fragments de 1 cm de longueur ont été inclus dans de l'agarose (low melting point) à 5%. Des sections d'une épaisseur de 80µm (transversale) et 45µm (longitudinale) ont été réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S) et montées entre lame et lamelle dans de l'eau distillée.

La coloration à la WGA-FITC (Wheat-Germ-agglutinin-fluorescein isothiocyanate, Molecular Probes) permet de visualiser la paroi fongique grâce à son affinité pour la N-acétylglucosamine contenue dans la chitine. Les coupes de racines incluses dans l'agarose ont été incubées dans le tampon PBS (PBS Sigma : 50 mM potassium phosphate 150 mM NaCl ; pH 7.2) pendant 15 min, puis dans la solution de WGA-FITC (50 µg/ml dans du PBS) pendant 30 min. L'excès de solution de WGA-FITC a été éliminé par 3 lavages de 5 min dans le tampon PBS avant de monter les sections entre lame et lamelle dans de l'eau distillée.

Les images de microscopie confocale ont été obtenues avec un système de scan laser confocal spectral (SP2 SE, Leica, Germany) équipé avec un microscope upright (DM 6000, Leica, Allemagne). Les observations ont été réalisées en utilisant les objectifs 10× (HCPL Fluotar, N.A. 0.3) et 40× (HCX PL APO, N.A. 0.8), respectivement à sec ou en immersion dans de l'eau. Le rayonnement de 488 nm d'un laser argon a été utilisé pour détecter l'émission de la fluorescence GFP (spectre d'émission 490 à 540nm).

Les observations des racines pour la visualisation des composés phénoliques ont été réalisées avec le microscope d'inversion (DMIRBE, Leica, Rueil-Malmaison, France) sous champ brillant et sous fluorescence. Ce microscope est équipé avec une illumination d'épifluorescence (filtre d'excitation, BP 450-490nm, filtre de suppression LP 515) et avec une camera CCD (colourCoolview, Photonic Science, Robertsbridge, UK). Les images ont été analysées par le logiciel Image Analysis (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, SilverSpring, MD, USA).

II. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES

1. Identification des gènes différentiellement exprimés

Nous sommes partis de l'hypothèse que les données sont distribuées selon une binomiale négative, ce qui permet de tenir compte du fait que les variances observées des comptages des transcrits dans les différentes conditions sont supérieures à celles attendues selon une loi binomiale. Les comptages normalisés des séquences (orientées dans le sens du gène prédit et qui comptent au minimum 5 comptes par million dans au moins 2 librairies) ont été analysés en utilisant le package DESeq package (Anders and Huber, 2010) de "R/Bioconductor statistical language" avec des scripts personnalisés.

Brièvement, après avoir ajusté la taille des librairies, les données ont été distribuées selon une binomiale négative, ce qui permet d'augmenter la dispersion des comptages, puis ajustés en utilisant un modèle linéaire généralisé pour tester l'abondance des différentiels. L'expression différentielle est calculée avec la méthode du maximum de vraisemblance dans laquelle la distribution des séquences observée est maximisée par rapport à la courbe de dispersion ajustée. Cette méthode permet de minimiser le nombre de faux positif. La régression logistique des proportions des séquences a été aussi utilisée (Collett, 2002). Les P -values ont été ajustées pour le contrôle de faux positifs avec la méthode de Benjamini-Hochberg ($FDR < 0.05$). Les diagrammes de Venn ont été générés en utilisant le package Vennable de R.

2. Construction du réseau de coexpression de gènes par la méthode Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA).

Le réseau WGCNA a été créé à l'aide du package WGCNA de R (The R Project for Statistical Computing) en utilisant les comptages normalisés. Les lignées ont été traitées séparément et les bibliothèques utilisées sont T0, Early-Mock et Early-Inoculé des deux répétitions biologiques. Les modules ont été obtenus en utilisant les réglages standards excepté un seuil de "fusion" des modules de 0,25.

Pour maximiser l'ajustement de l'échelle de liberté topologique ($R^2 \geq 0,8$), la puissance β a été réglée à 20. Pour chaque réseau, la valeur du "eigengene" de chaque module a été calculée et utilisée pour tester l'association avec plusieurs contrastes linéaires d'intérêt biologique.

La visualisation des réseaux a été faite sur Cytoscape v3.0.1.

3. Annotation fonctionnelles

a) Analyse des données avec le logiciel MapMan

Etant donné que plusieurs banques de données de séquences ont été utilisées pour l'annotation des séquences, il y a des gènes ne faisant pas partie du fichier mapping de *M. truncatula* qui est basé sur le génome V3.5. Il a donc fallu créer un autre fichier mapping. Pour cela nous avons combiné les données existantes sur le fichier mapping de *M. truncatula* Mt_Mt3.5_v3_0411.m02 avec une annotation manuelle des séquences absentes de ce fichier. Les BIN de ces dernières ont été désignés grâce aux annotations TIGR (TAIR 7.0) dans la banque de données GabiPH (<https://www.gabipd.org/>). L'annotation avec InterProScan 4.8 a été utilisée pour une annotation plus précise si nécessaire.

b) Analyse des GO term

Pour les annotations GO, un BLASTx a été réalisé sur Blast2Go (<http://www.blast2go.com>) en utilisant le réglage standard avant de réaliser l'annotation des Go terms.

Pour la détermination des GO enrichis, nous avons utilisé le programme AgriGo (Du et al., 2010).

Pour les analyses statistiques, un test de Fisher a été réalisé et l'ajustement a été faite par la méthode de Bonferroni.

Pour l'analyse des voies de régulation du module Greenyellow, une annotation KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) a été réalisée.

La recherche d'orthologues de gènes candidats impliqués dans la signalisation chez la tomate et le coton et *A. thaliana* a été réalisée par un BLASTx sur NCBI (National Center for Biotechnology Information). Puis les séquences protéiques des meilleurs candidats ont été alignées sur Phylogeny.fr: "One Click" Mode pour obtenir les arbres phylogéniques.

C. RÉSULTATS

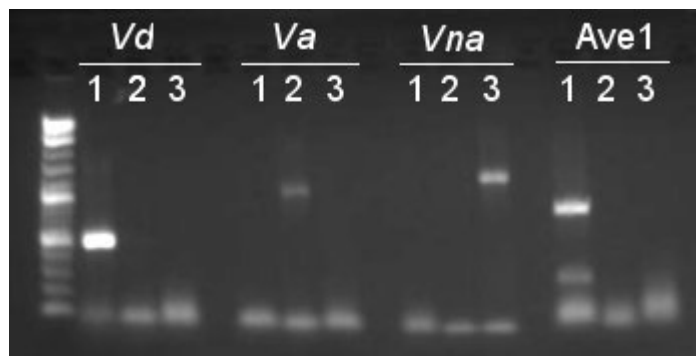


Figure I. 1 : Caractérisation moléculaire de la souche V31-2. Migration sur gel d'agarose de produits PCR. 20ng d'ADN fongique ont été amplifiés par les paires de primers Df/Dr spécifiques à *V. dahliae* (Vd), AlfF/AlfD1r spécifiques à *V. alfalfae* (Va), NoF-NoNuR spécifiques à *V. nonalfalfae* (Vna) et Ave1 spécifiques à la race 1. De l'ADN de V31-2, JR2 et LPP0323 a été soumis à l'analyse. Ligne 1: *Vd* JR2. Ligne 2: V31-2. Ligne 3: LPP0323. Piste à gauche : marqueur de taille 2-log.

I. Etude du mécanisme d'infection de *M. truncatula* par *Verticillium alfalfae*

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent les bases du système expérimental et les étapes de colonisation de *M. truncatula* par V31-2. Dans un premier temps, nous allons caractériser la souche V31-2 et présenter le pathosystème en conditions hydroponiques. Par la suite, les mécanismes d'infection des deux lignées contrastées A17 et F83005.5 seront étudiés par des approches de microscopie, de microbiologie et de biologie moléculaire.

1. Caractérisation moléculaire de la souche V31-2 et présentation du pathosystème.

La taxonomie du genre *Verticillium* a été mise à jour (voir introduction, page 27), avec la définition d'une nouvelle espèce, *V. alfalfae* pour les isolats pathogènes de la luzerne (Inderbitzin et al., 2011). Récemment, des amorces ont été créées permettant une identification précise par PCR des différentes espèces (Inderbitzin et al., 2013). Nous avons utilisé ces amorces dans le but d'identifier l'espèce à laquelle la souche utilisée pour dans nos travaux est attribuée. La souche V31-2 a été isolée à partir de plantes de luzerne présentant des symptômes de verticilliose (Molinéro-Demilly et al., 2006), mais aucune caractérisation taxonomique est décrite. Nos analyses PCR montrent que la souche V31-2 appartient à l'espèce *V. alfalfae* contrairement à la souche LPP0323 décrite aussi précédemment comme *V. albo-atrum* et qui appartient à l'espèce *V. nonalfalfae*. La souche JR2 qui est connue pour être un *V. dahliae* sert de témoin, et son identité comme *V. dahliae* est confirmée (**Figure I. 1**). Pour identifier la race à laquelle appartient V31-2, des amorces amplifiant *Ave1* sont utilisées. JR2 est décrite comme appartenant à la race 1 et possède le gène *Ave1*. En comparant nos souches avec ce témoin positif, on peut suggérer que V31-2 et LPP0323 appartiennent à la race 2 puisque nous n'avons pas obtenu de produit d'amplification à partir de



Figure I. 2 : Dispositif expérimental en conditions hydroponiques. Vue du haut d'une boîte remplie de milieu Fahraeus contenant des plantules qui viennent d'être mises en culture. A gauche, plantules de la lignée A17 et à droite celles de la lignée F83005.5.

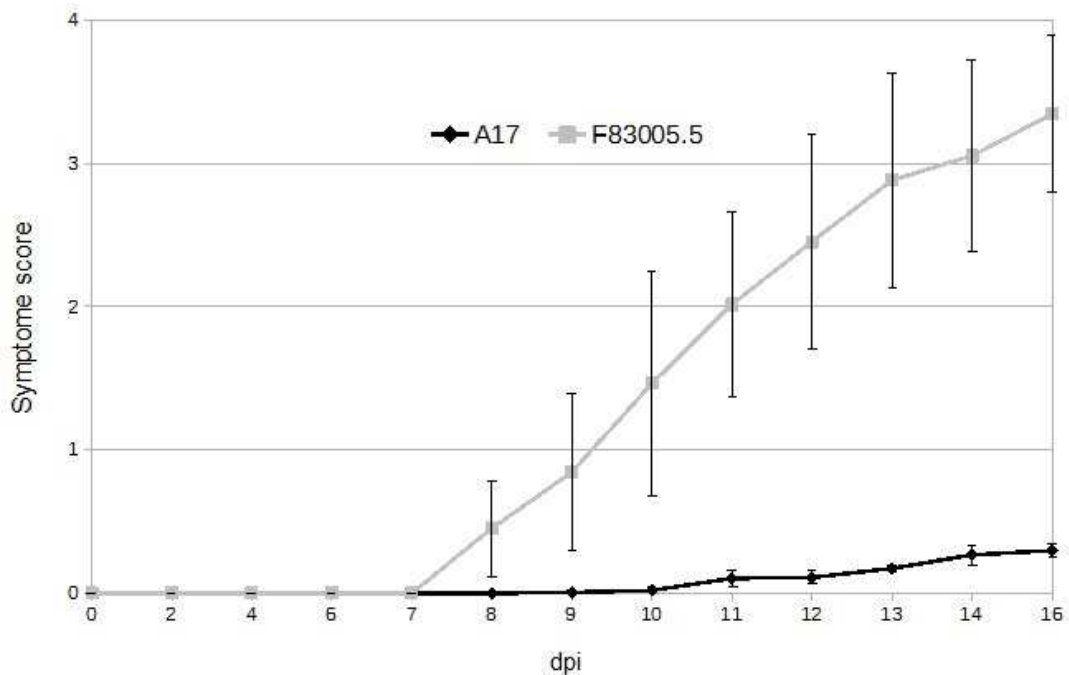


Figure I. 3 : Evolution des symptômes chez A17 et F83005.5 inoculées avec V31-2 en culture hydroponique. Les courbes représentent les scores moyens en fonction des jours après inoculation (dpi pour "days after inoculation") de six expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent les variabilités (écartypes) centrées sur la moyenne.

leurs ADNs génomiques (**Figure I. 1**). En conclusion, la souche V31-2 appartient à l'espèce *V. alfalfae* et à la race 2. Dorénavant cette souche sera donc mentionnée comme étant *V. alfalfae* V31-2.

2. Interaction entre *M. truncatula* et V31-2 en conditions hydroponiques

Pour étudier la colonisation des racines et les mécanismes de résistance racinaires, il est nécessaire d'avoir un accès direct aux racines. Pour cette raison, les plantes sont cultivées en condition hydroponique en utilisant le milieu Fahraeus supplémenté d'azote (Fåhraeus, 1957). Le dispositif de culture a été mis au point avant le début de cette thèse (décrit dans Ben et al., 2013), mais n'était pas décrit en détail. Il est présenté dans la **Figure I. 2**. Après dix jours de culture, les plantules d'A17 et de F83005.5 ont été inoculées avec la souche V31-2 en plongeant les racines dans une suspension de spores. Leurs extrémités ont été coupées préalablement pour favoriser l'homogénéité de l'inoculation et la synchronisation des symptômes. Puis les plantes sont mises en culture et les symptômes sont suivis et notés régulièrement plante par plante à l'aide de l'échelle de symptômes mise au point par Ben et al. (2013).

Les résultats présentés sur la **Figure I. 3** montrent les courbes moyennes obtenues à partir de six expériences indépendantes. On observe que les symptômes commencent à apparaître chez F83005.5 à partir d'une semaine après l'inoculation et augmentent graduellement. Au bout de 16 jours après inoculation, la majorité des plantes est morte. La lignée A17 ne développe pas de symptômes de la maladie mais elle paraît moins adaptée à l'hydroponie puisque des plantes peuvent montrer des symptômes de stress liés aux conditions de culture. Toutefois, ces symptômes de stress sont différents de ceux provoqués par l'inoculation et sont donc facilement reconnaissables. Les cultures peuvent être gardées jusqu'à trois semaines après inoculation comme montré sur la **Figure I. 4**. En conclusion, les conditions de culture en hydroponie n'ont pas d'effet sur le pathosystème

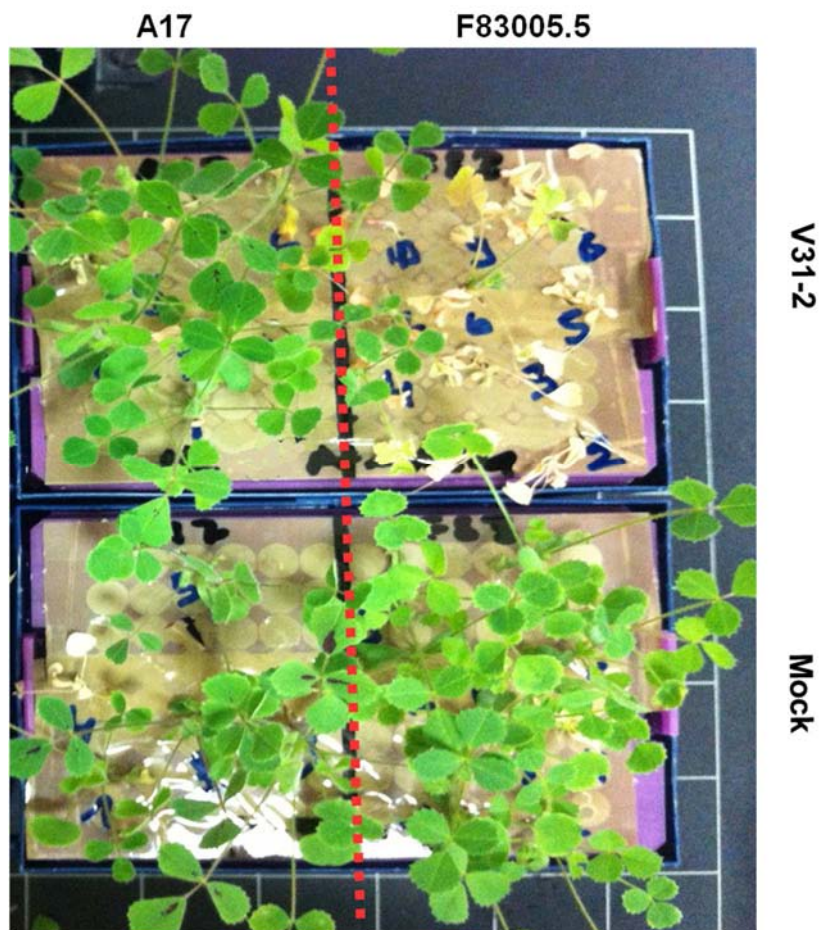


Figure I. 4 : Dispositif expérimental en conditions hydroponiques. Photo prise à 21 jours après inoculation montrant une vue du haut de la boîte remplie de milieu Fahraeus contenant des plantes d'A17 à gauche et des plantes de F83005.5 à droite. Les plantes de la boîte du bas ne sont pas inoculées alors que celles de la boîte du haut sont inoculées avec la souche *Va* V31-2.

M. Truncatula / Va V31-2. Celle-ci peut donc être utilisée pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'interaction entre *V. alfalfae* et *M. truncatula*.

3. Étude comparative de la colonisation racinaire au cours d'une interaction compatible et incompatible entre *M. truncatula* et *V. alfalfae* V31-2.

Les plantes hôtes des champignons du genre *Verticillium* peuvent présenter trois types de réponse. On peut observer une résistance, une sensibilité ou une tolérance (Pegg and Brady, 2002). La différence entre ces trois réponses est directement liée à la capacité de la plante à inhiber la croissance du pathogène. La réponse clairement identifiable est la résistance totale. Celle-ci est observée lorsque l'hôte supprime complètement la croissance du pathogène. Dans le cas de la sensibilité et de la tolérance, la différence se situe dans l'étendue des symptômes. En effet, dans les deux cas, le pathogène arrive à se développer chez son hôte. Toutefois, on n'observe pas ou très peu de symptômes dans le cas de la tolérance. En d'autres termes, les mécanismes de résistance protègent contre l'infection alors que les mécanismes de tolérance protègent contre les symptômes (Roy and Kirchner, 2000).

Pour identifier le type de réponse développé par l'hôte, il est nécessaire d'étudier les mécanismes d'infection de celui-ci. La chronologie et le processus d'infection du genre *Verticillium* ont déjà été étudiés. Parmi ces études, on trouve par exemple des travaux concernant la colonisation du colza et *A. thaliana* par *V. longisporum* (Eynck et al., 2007), ou encore celle de la laitue (Vallad and Subbarao, 2008) et d'*A. thaliana* par *V. dahliae* (Zhao et al., 2014). Ces études montrent que suite à la germination de la structure de dormance, l'hyphe rentre en contact avec la surface racinaire, pénètre l'épiderme, traverse le cortex et progresse jusqu'aux vaisseaux du xylème. Le développement de *Verticillium* semble être restreint aux vaisseaux du xylème malgré le fait que c'est un habitat pauvre en nutriments (Andersen and Brodbeck, 1989). Après une courte période,

on observe la production de spores qui vont être entraînées par le courant de la sève vers la partie aérienne de la plante. Leur progression est stoppée au niveau des plaques criblées situées aux extrémités des vaisseaux (Eynck et al., 2007). La colonisation se poursuit par la germination des conidies dont les tubes germinatifs arrivent à passer à travers les plaques criblées. Les observations ont montré que le pathogène infecte les autres tissus comme le cortex que lorsque la plante est moribonde, marquant ainsi l'entrée dans une phase saprophyte. C'est à ce moment que sont produites les structures de dormance, la première source d'infection (Pegg and Brady, 2002).

A ce jour, le processus d'infection du genre *Medicago* par *Verticillium* reste peu connu. Pour étudier les étapes d'infection de *V. alfalfae* V31-2 nous avons utilisé une souche exprimant la GFP (green fluorescent protein) sous le contrôle d'un promoteur fongique et la microscopie de type CLSM (confocal laser scanning microscopy). Le marquage par la GFP est couramment utilisé dans les interactions plantes/pathogènes. Dans le cas de *Verticillium*, cette méthode a déjà été utilisée pour l'étude de la cinétique d'infection et de colonisation de *V. dahliae* chez le colza (Eynck et al., 2007), la laitue (Vallad and Subbarao, 2008), l'olivier (Prieto et al., 2009), l'épinard (Maruthachalam et al., 2013) et *A. thaliana* (Zhao et al., 2014). Elle a également été utilisée dans le cas de *V. longisporum* chez le colza (Eynck et al., 2007).

Le but de nos travaux décrits dans ce chapitre était (1) d'étudier les mécanismes de colonisation de V31-2 chez *M. truncatula*, (2) de comparer les cinétiques de colonisation d'A17 et F83005.5 et (3) d'identifier le type de réponse des deux lignées. Les données de microscopie ont été complétées par la quantification de l'ADN du pathogène par qPCR.

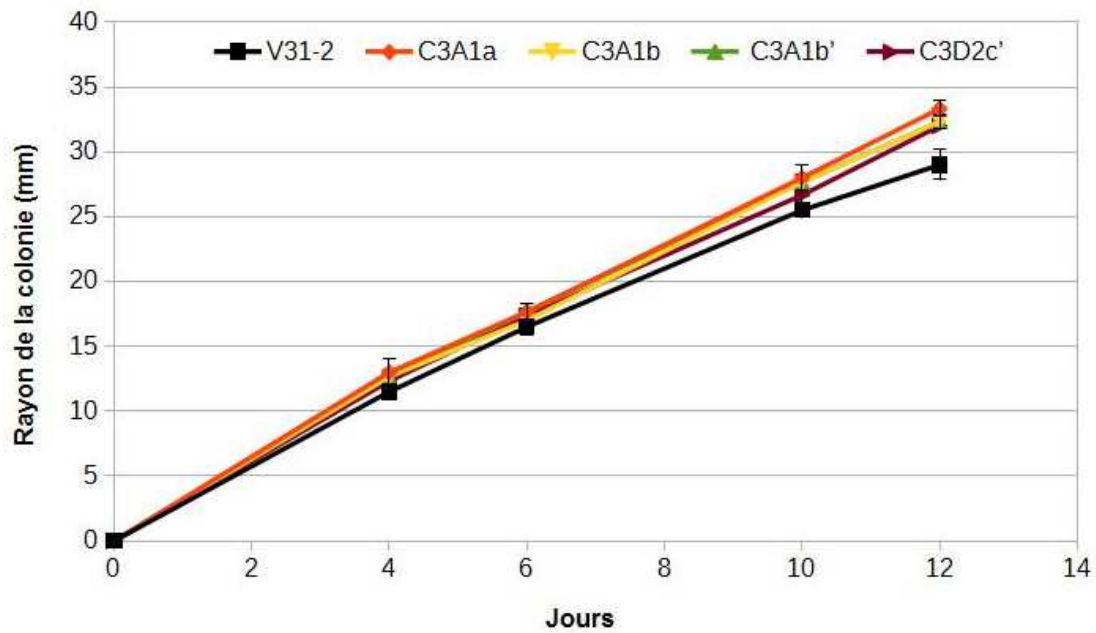


Figure I. 5. Croissance de V31-2 et des souches transformées avec le gène de la GFP. La vitesse de croissance des souches a été suivie en mesurant le rayon des colonies sur milieu PDA sur 3 réplicats techniques. V31-2, la souche sauvage ; C3A1a, C3A1b, C3A1b' et C3D2c', les souches exprimant la GFP. Les barres d'erreurs représentent les écarts types.

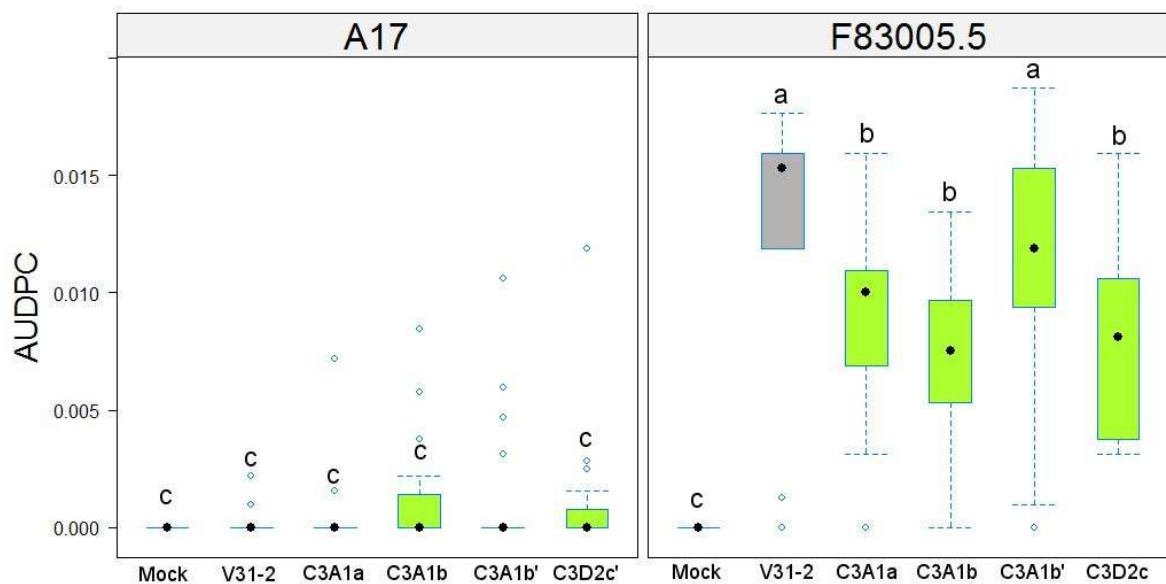


Figure I. 6. Box plot montrant la distribution des AUDPC chez A17 et F83005.5 inoculées ou pas avec la souche V31-2 ou avec une des souches exprimant la GFP. Après inoculation, les symptômes ont été relevés régulièrement jusqu'à 16dpi. Les AUDPC ont été calculées plante par plante et leur distribution a été évaluée pour chaque souche et par lignée. Mock, condition non-inoculée ; V31-2, la souche sauvage ; C3A1a, C3A1b, C3A1b' et C3D2c', les souches exprimant la GFP. Les lettre a, b et c représentent les groupes de moyennes calculés avec le test de Tukey.

a) Sélection d'une souche monosporique exprimant la GFP.

Pour cette étude, nous disposons de quatre souches monosporiques exprimant une fluorescence stable obtenues après transformation avec *A. tumefaciens*. Ces souches sont nommés C3A1a, C3A1b, C3A1b' et C3D2c'. Il était nécessaire de s'assurer que ces souches se comportent comme la souche non-transformée avant toute étude de microscopie. Pour cela, nous avons étudié leurs vitesses de croissance et leurs niveaux de pathogénicité.

L'étude a commencé par la mesure de la croissance sur milieu nutritif à 24°C, à 4, 6, 10 et 12 jours de culture après inoculation des boîtes. Les résultats montrent que les courbes de croissance des souches sont très similaires (**Figure I. 5**). L'analyse statistique sur l'aire en dessous de la courbe de croissance montre qu'il n'y a pas de différence significative sur la croissance des souches transformées comparée à la souche sauvage ($\alpha = 0,05$). On peut donc conclure que la transformation n'a pas modifié la croissance des mutants *in vitro*.

Pour étudier l'effet de la transformation sur la pathogénicité, les lignées A17 et F83005.5 ont été inoculées avec la souche V31-2 ou avec une des souches transformées. Les symptômes ont été suivis régulièrement jusqu'à 16 jours après inoculation. Les surfaces sous les courbes de symptômes (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC) ont été analysées (**Figure I. 6**) par ANOVA. Les résultats montrent qu'il y a une différence significative entre la pathogénicité de la souche sauvage et les souches C3A1a, C3A1b et C3D2c' ($p\text{-value} < 2e-16$). En revanche, aucune différence significative n'est observée avec la souche C3A1b', qui en plus montrait une plus forte intensité de fluorescence. La souche C3A1b' a donc été retenue pour l'étude des mécanismes d'infection et de colonisation. Une partie de ces résultats a été publiée dans l'article de Ben et al. (2013).

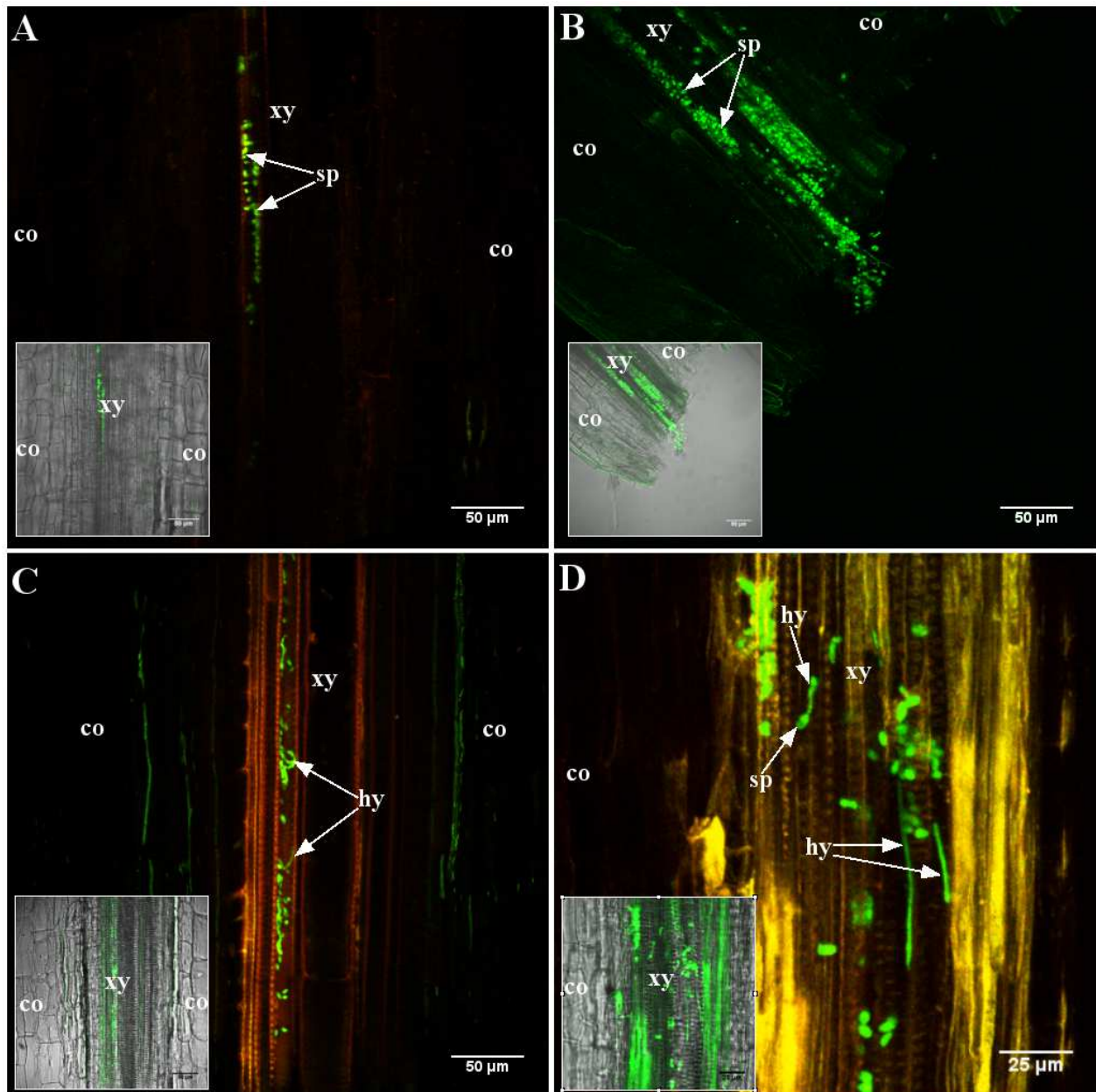


Figure I. 8 : Etapes précoces de la colonisation des racines des lignées A17 et F83005.5 par *Va V31-2-GFP*. Coupes longitudinales de racines d'A17 (A et C) et F83005.5 (B et D) observées par microscopie confocale. (A et B) observations faites 2 heures après l'inoculation, on voit des conidies dans les vaisseaux du xylème des deux lignées. (C et D) observations faites 24 heures après l'inoculation, début de la germination des spores. Des images prises en lumière visible (inserts) sont ajoutées pour pouvoir repérer le cortex (co) et les vaisseaux du xylème (xy). hy = hyphe ; sp = spore.

- b) Étude des mécanismes d'infection et de colonisation de la lignée A17 et F83005.5 par la souche V31-2-*GFP*

Pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction entre *Va* V31-2 et *M. truncatula*, des plantules d'A17 et de F83005.5 ont été inoculées avec la souche C3A1b' exprimant la GFP, et les racines ont été récoltées à différents temps après l'inoculation, et préparées pour la microscopie. Des coupes longitudinales et transversales ont été observées au microscope confocal de type "scan laser confocal spectral" (SP2 SE, Leica, Allemagne).

Les premières observations ont été réalisées 2 heures après l'inoculation. Étant donné que les extrémités des racines sont coupées avant l'inoculation, les conidies sont entraînées directement dans les vaisseaux du xylème par le flux de transpiration, et ceci chez les deux lignées (**Figure I. 8 A et B**). On peut observer des amas de conidies au niveau des parois des plaques criblées (**Figure I. 7**). Vingt-quatre heures après l'inoculation, on observe la germination des conidies dans le xylème et l'initiation de la colonisation dans les deux lignées (**Figure I. 8 C et D**). On n'observe pas ou très peu de mycélium à la surface des racines et aucune infection causée par du mycélium poussant à la surface des racines. A ce stade de l'inoculation, il n'y a aucune différence notable entre les deux lignées. Au vu des résultats, *V. alfalfae* ne semble pas capable de former une structure d'infection comme un appressorium. Il semble aussi qu'il soit incapable d'infecter les racines en pénétrant directement à travers l'épiderme, les zones de formation de racines latérales ou en passant par les poils absorbants.

A partir de 5 jours après l'inoculation, des différences très marquées ont été observées entre les deux lignées (**Figure I. 9**). En effet, tandis que les vaisseaux de la lignée F83005.5 sont colonisés par le pathogène, ce dernier est totalement absent des vaisseaux de la lignée A17. Sept jours après l'inoculation, on note la présence de cellules corticales remplies de composés auto-fluorescents au niveau des racines de la lignée A17 (**Figure I. 11 A**). En ce qui concerne la lignée F83005.5, la colonisation est strictement restreinte dans les vaisseaux du xylème (**Figure I. 10**). On note aussi que le mycélium est capable de traverser les parois des vaisseaux pour coloniser les vaisseaux

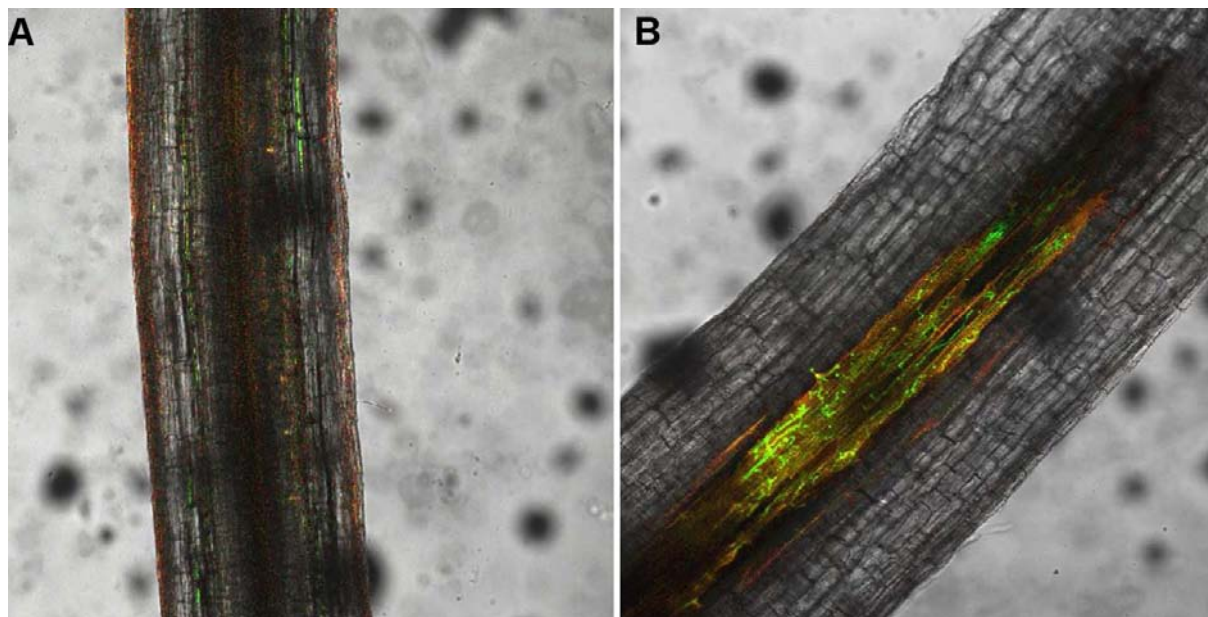


Figure I. 9 : Etapes intermédiaires de la colonisation des racines d'A17 et F83005.5 par *Va V31-2-GFP*. Coupes longitudinales de racines d'A17 (A) et F83005.5 (B) observées par microscopie confocale. Observations faites 5 jours après l'inoculation ; à ce stade, on voit la présence du champignon dans le cylindre central de la lignée F83005.5 mais pas chez la lignée A17.

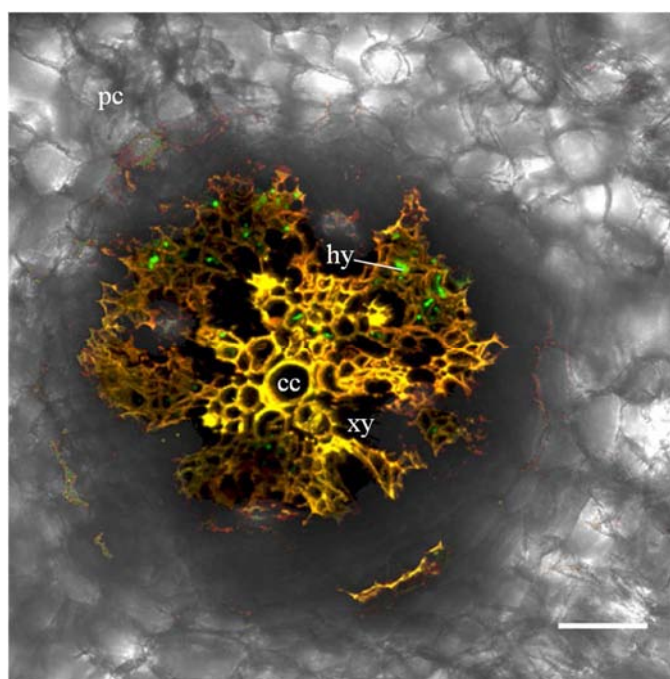


Figure I. 10 : Etapes intermédiaires de la colonisation des racines de F83005.5 par *Va V31-2-GFP*. Coupe transversale d'une racine de F83005.5 observée par microscopie confocale. Observation faite 6 jours après l'inoculation, on voit la présence du champignon dans le cylindre central. Parenchyme cortical (pc) ; cylindre central (cc). xy = vaisseaux du xylème ; hy = hyphes.

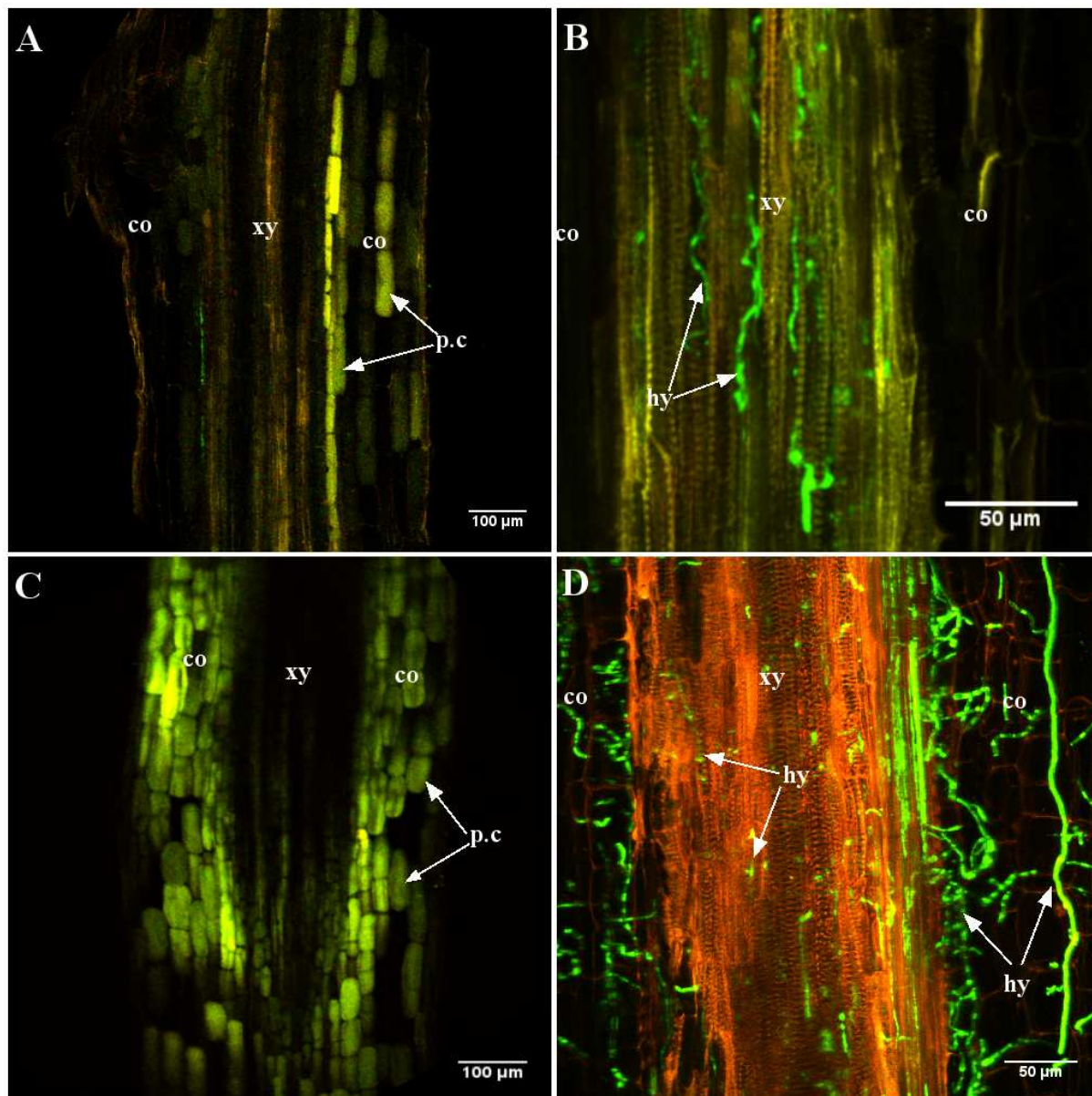


Figure I. 11 : Etapes tardives de la colonisation des racines d'A17 et F83005.5 par *Va* V31-2-*GFP*. Coupes longitudinales de racines d'A17 (A et C) et F83005.5 (B et D) observées par microscopie confocale. (A) observations faites 7 jours après l'inoculation, on ne voit pas de mycélium dans les vaisseaux de la lignée A17 alors que (B) la colonisation se poursuit dans la lignée F83005.5. (C et D) observations faites 12 jours après l'inoculation. (C) Présence de cellules remplies de composés autofluorescents (p.c = composés phénoliques). (D) Le mycélium sort du xylème et envahit le cortex (co). xy = vaisseaux du xylème ; hy = hyphe.

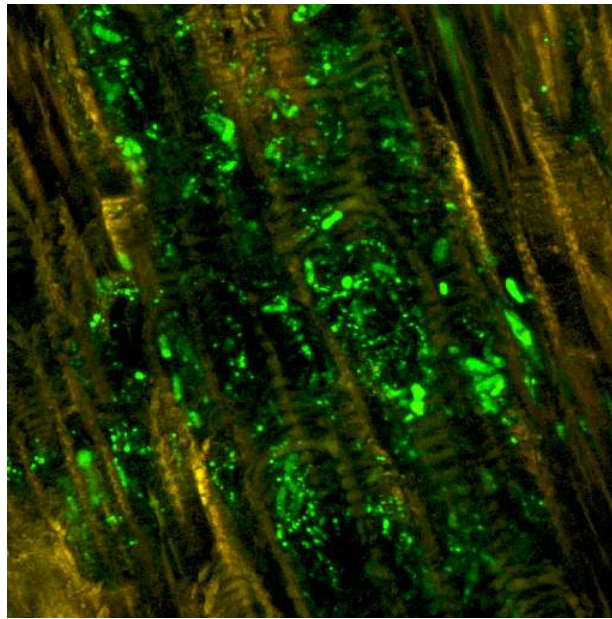


Figure I. 12 : Etapes tardives de la colonisation de la lignée F83005.5 par *Va* V31-2-GFP. Coupe longitudinale de la tige principale de F83005.5 observée par microscopie confocale. Observation faite 12 jours après l'inoculation, on voit le champignon dans les vaisseaux de la partie foliaire de la lignée F83005.5.

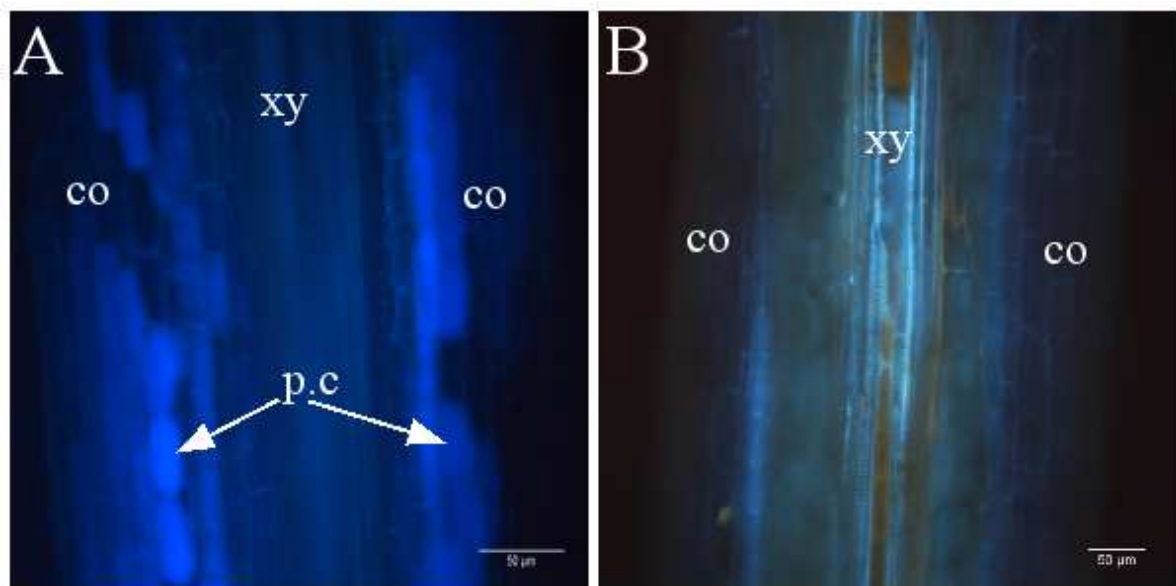


Figure I. 13 : Observation des composés phénoliques produits en réponse à *Va* V31-2 chez *M. truncatula*. Coupes longitudinales de racines des lignées A17 (A) et F83005.5 (B) observées à 7 jours après inoculation sous UV (émission maximum à 365 nm). Les composés autofluorescents bleus ne sont observés que dans la lignée A17. co = cortex ; hy = hyphe; sp = spore ; xy = xylème ; p.c = composés phénoliques.

adjacents. Le mycélium peut aussi traverser les perforations aux niveaux des plaques criblées (**Figure I. 11 B**).

Dans les stades avancés de la maladie chez la lignée sensible, (**Figure I. 11 C et D**), on observe une colonisation massive du tissu cortical par du mycélium provenant des vaisseaux de xylème. On a aussi observé la présence du champignon dans les vaisseaux des parties foliaires (**Figure I. 12**). En ce qui concerne la lignée résistante, on note une forte augmentation des cellules corticales qui accumulent des composés auto-fluorescents. Des observations de coupes longitudinales de racines d'A17 et F83005.5 à 7 jours après inoculation réalisées sous microscope à champs large avec une lumière ultraviolette (**Figure I. 13**) confirment que ces composés auto-fluorescents sont observés uniquement dans les racines de la lignée résistante.

L'expression de la GFP est sous le contrôle du promoteur fongique de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*gapdh*), une enzyme jouant un rôle essentiel dans plusieurs voies métaboliques dont la glycolyse (Winkel, 2004). Il est connu que dans les conditions de stress extrêmes, les champignons peuvent ralentir leur activité métabolique (Fuller et al., 2013). Cet état appelé la dormance métabolique est surtout étudié dans le cas des spores (Feofilova et al., 2012). Un ralentissement de l'activité métabolique réduirait certainement l'expression de la GFP ce qui affecterait notre capacité à détecter la présence du champignon. Dans le but d'écarter cette possibilité, un marquage au WGA (Wheat Germ Agglutinin) a été réalisé. Le WGA lie les chitosaccharides dont la chitine de la paroi fongique. Les coupes longitudinales de racines d'A17 et F83005.5 prélevées à 10 jours après inoculation ont été observées au microscope confocal après incubation avec la WGA couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (**Figure I. 14**). F83005.5 a été utilisée comme témoin positif. Comme attendu, chez la lignée sensible, le pathogène, est détecté clairement (**Figure I. 14 B**). On note aussi une forte présence de spores en plus du mycélium. Chez A17, aucun marquage n'a été détecté (**Figure I. 14 A**). Cela écarte donc la possibilité d'absence de détection du pathogène en raison d'une dormance métabolique.

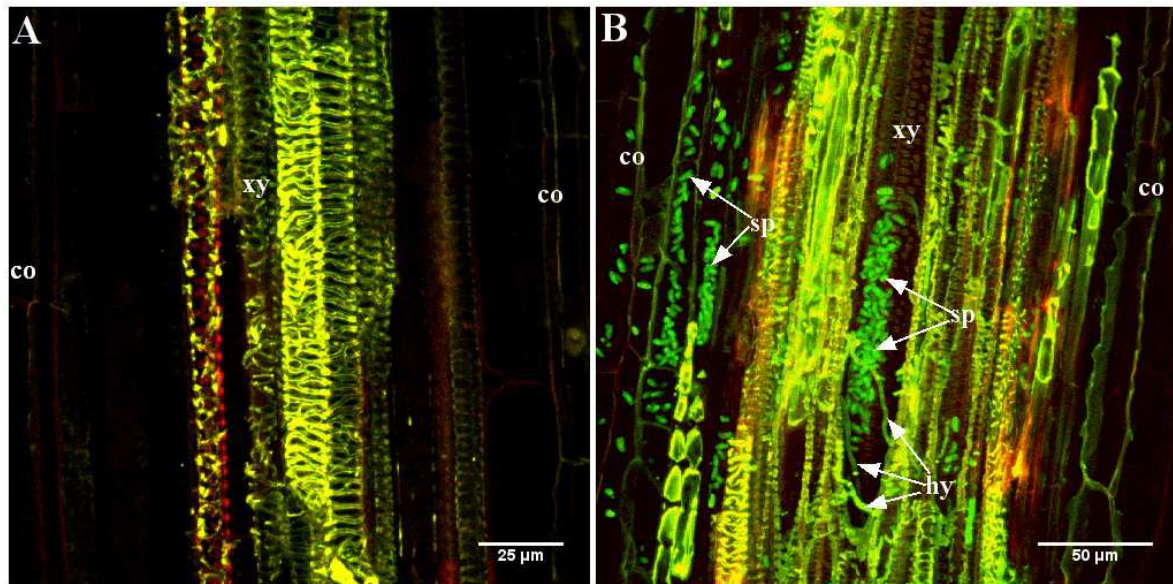


Figure I. 14 : Colonisation des racines d'A17 et F83005.5 par *Va* V31-2-GFP. Observation de coupes longitudinales de racines d'A17 (A) et F83005.5 (B) à 10 jours après inoculation en microscopie confocale. Le pathogène, coloré à la WGA-FITC, apparaît en vert chez la lignée F83005.5 et est absent chez la lignée A17. co = cortex ; hy = hyphe; sp = spore ; xy = xylème.

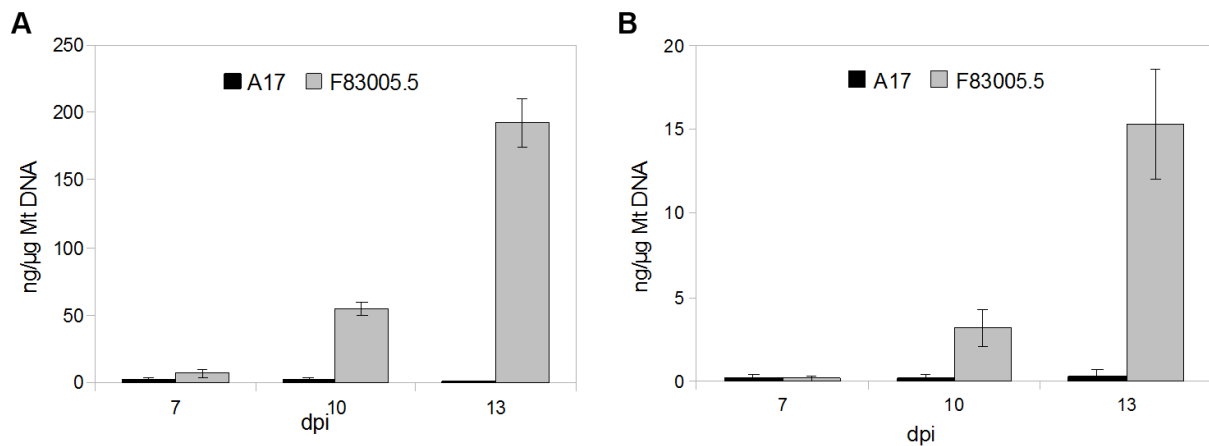


Figure I. 15 : Quantification de l'ADN de *Va* V31-2 *in planta*. L'ADN du pathogène a été quantifié dans les racines (A) et dans la partie foliaire (B) par qPCR à 7, 10 et 13 jours après inoculation. Les valeurs représentent la moyenne de deux réplicats biologiques à raison de 3 plantes par réplicat. La quantité d'ADN est exprimée en ng d'ADN génomique du champignon pour 1 µg d'ADN génomique de *M. truncatula*. Les barres d'erreurs représentent les écarts types.

En plus des études histologiques, l'ADN de *Va* V31-2 a été quantifié par qPCR au niveau des racines et de la partie aérienne (**Figure I. 15**). L'ADN n'est détecté dans les racines de la lignée sensible qu'à partir de 7 jours après inoculation. Les résultats sont en accord avec les observations histologiques. La quantité d'ADN augmente avec le temps dans les racines et la partie foliaire de la lignée sensible. En revanche on n'observe que le signal de fond dans la lignée résistante. L'ensemble de ces observations montrent clairement que le pathogène est totalement éliminé dans les premiers jours suivant l'infection chez la lignée A17. Cette lignée présente donc une résistance totale vis-à-vis de la souche V31-2.

4. Discussion

La verticilliose de la luzerne est une maladie de flétrissement vasculaire causée par *V. alfalfae*, une espèce adaptée à la luzerne (Inderbitzin et al., 2013). La souche utilisée dans cette étude est une souche de *Verticillium* isolée de la luzerne. Comme on pouvait s'y attendre, la caractérisation moléculaire a confirmé que celle-ci appartient à l'espèce *V. alfalfae* définie par Inderbitzin et al (2011 ; 2013). Elle sera dorénavant mentionnée comme étant la souche *Va* V31-2. Des études antérieures ont montré que cette dernière est capable d'induire des symptômes de flétrissement foliaire chez la plante modèle *M. truncatula* (Ben et al., 2013 ; Negahi et al., 2014). Les lignées A17 et F83005.5 se sont montrées respectivement résistante et sensible. Ces deux lignées ont été sélectionnées pour réaliser des études moléculaires dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre *M. truncatula* et *V. alfalfae*. Notre caractérisation de la souche par PCR a également montré que V31-2 ne contenait pas le gène *Ave1* et par déduction n'appartient pas à la race 1. Le séquençage de 85 souches de *Verticillium* isolées à partir de différentes plantes hôtes et différentes zones géographiques a montré que la séquence du gène *Ave1* est très conservée. En effet, aucun SNP (single-nucleotide polymorphism) n'a été détecté sur les 85 souches testées (de Jonge et al., 2012). A noter que la souche de *V. alfalfae* séquencée VaMs102

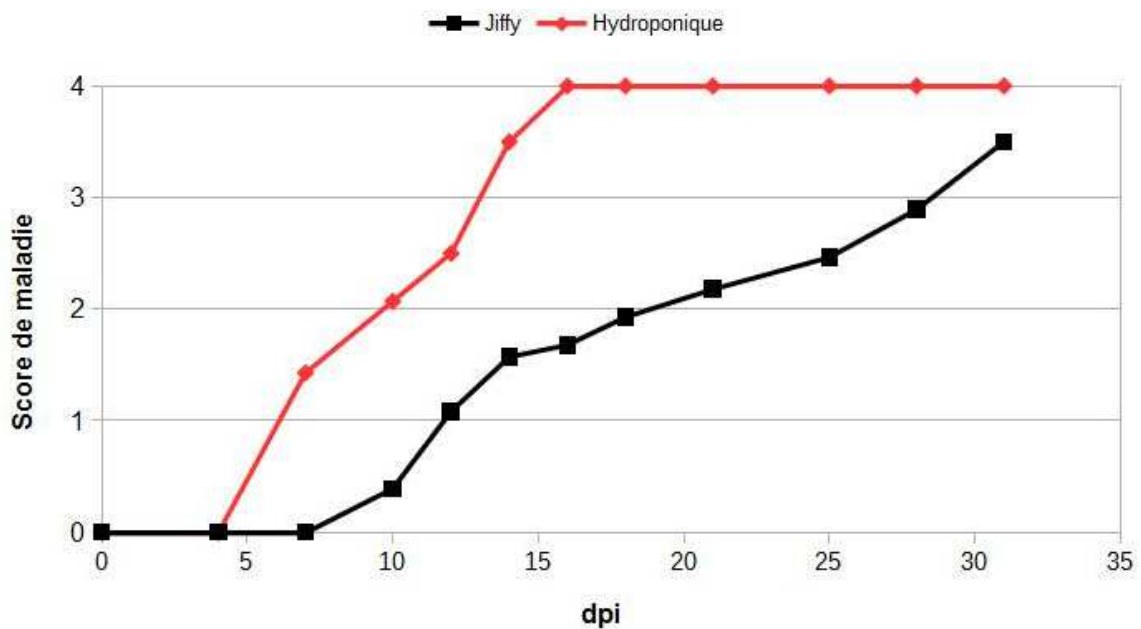


Figure I. 16 : Comparaison de l'évolution des symptômes chez F83005.5 inoculées avec *Va* V31-2 cultivée en Jiffy ou en hydroponique. Courbes des scores moyens en fonction des jours après inoculation (dpi pour "days after inoculation"). L'expérience de Jiffy a été réalisé par Mélanie Mazurier.

possède le gène *Ave1*. L'absence d'*Ave1* chez V31-2 et d'un homologue très similaire de Ve1 chez *M. truncatula* (Ben et al., 2013) indiquent que la résistance chez la lignée A17 pourrait présenter des caractéristiques nouvelles, différentes de ce qui est décrit chez d'autres espèces.

a) Caractéristiques du pathosystème en condition hydroponique

La plus grande partie des travaux antérieurs sur l'interaction *M. truncatula* – *V. alfalfae*, était réalisée avec des plantes cultivées en Jiffy, des conditions qui ne donnent pas un accès direct aux racines. Un système de culture en hydroponie a été mis au point pour pouvoir avoir un accès facile aux racines (Ben et al., 2013). L'analyse de la cinétique de symptômes a montré que comme en substrat Jiffy, on observe des symptômes de flétrissement foliaire et les premiers symptômes apparaissent au bout d'une semaine après l'inoculation. Cependant, une fois les premiers symptômes apparus, la maladie évolue plus vite en culture hydroponique. En effet, la majorité des plantes de la lignée sensible meurt au bout de deux semaines après l'inoculation alors qu'en Jiffy, cela prend plus de 3 semaines. Cette accélération des symptômes est probablement liée à l'augmentation de l'évapotranspiration qui accélère la circulation des composés présents dans le xylème. Les conditions environnementales influencent la sévérité de la verticilliose. Il a été montré que l'augmentation de l'évapotranspiration causée par les fortes températures ou l'irrigation augmente très fortement la verticilliose de la luzerne (Jefferson and Gossen, 2002).

b) Mécanisme d'infection de *M. truncatula* par *V. alfalfae*

Pour que la maladie se développe, le champignon doit entrer dans les vaisseaux du xylème et coloniser ces derniers. Le pathogène doit donc traverser l'épiderme, le cortex et enfin l'endoderme pour atteindre les vaisseaux. Dans le cas de *V. dahliae* et *V. longisporum* la pénétration de ces différentes couches cellulaires se fait de manière directe. Aucune blessure n'est nécessaire pour

l'infection. En effet, *V. dahliae* forme un appressorium et chez *V. longisporum*, la pénétration se fait grâce aux hyphes (Eynck et al., 2007 ; Vallad and Subbarao, 2008 ; Zhao et al., 2014).

La différenciation de la cellule apicale d'un hyphe en appressorium est un phénomène très commun chez les champignons pathogènes mais le mécanisme sous-jacent reste encore inconnu (Freitag et al., 2011). En revanche, toutes les procédures d'inoculation avec *V. alfalfae* nécessitent une blessure d'une façon ou d'une autre (Grau et al., 1991). En effet, nous n'avons observé aucun symptôme si l'inoculation se fait sur des racines qui soient indemnes de toute blessure. Nos observations sont en accord avec ceux de Jiménez-Díaz et Millar (1986) et Calpas et Rahe (1995). Il semble que *V. alfalfae* soit incapable d'infecter les plantes de manière directe contrairement aux autres *Verticillium*. Des études antérieures ont montré que celui-ci a perdu la capacité de former des appressoriums matures. A la place, on observe des structures hyalines avec une fine membrane et non délimitées par rapport au tube germinatif. Cette structure est incapable de pénétrer les surfaces intactes ni les stomates (Jiménez-Díaz and Millar, 1986). Toutefois, une infection directe par les hyphes de *V. alfalfae* a été observée sur le pollen de la luzerne (Huang, 1985). Toutes ces observations reportées dans la littérature expliquent le choix d'effectuer nos infections après coupures des extrémités des racines permettant ainsi un contact direct avec les vaisseaux de la plante.

c) Processus de colonisation de *M. truncatula* par *V. alfalfae*

Grâce à la souche exprimant la GFP, nous avons étudié le processus de colonisation de *V. alfalfae* dans une interaction compatible et incompatible avec *M. truncatula*. La fluorescence de la GFP est stable et homogène ce qui fait qu'aucune coloration supplémentaire n'a été nécessaire. Malgré le fait que les racines soient plongées dans la suspension de spores, des hyphes étaient très peu présents à la surface des racines. Cela est probablement lié au fait que les plantes ont été cultivées en

hydroponie. Durant toutes nos observations, aucune infection résultant d'une pénétration directe de la racine n'a été observée. Ceci est en accord avec les observations de Calpas et Rahe (1995). Deux heures après l'inoculation, des amas de spores ont été observés au niveau de l'extrémité des vaisseaux. Il semble que les structures des vaisseaux soient capables de ralentir la progression des spores. La germination intravasculaire n'a été observée qu'au bout de 24 heures après inoculation. Au cours de ces étapes précoces de l'infection, aucune différence notable n'est observée entre la lignée résistante et la lignée sensible. A partir de 5 dpi, des différences significatives ont été observées entre la lignée résistante la lignée sensible. En effet, le pathogène est absent des vaisseaux du de la lignée A17 alors que ceux de lignée F83005.5 sont colonisés par le champignon. Il est connu que dans les toutes premières phases d'infection, *Verticillium* est capable d'infecter et initier la colonisation aussi bien dans un hôte sensible que résistant. Ce n'est que quelques temps après que les différences sont observées, et que la plante résistante va éliminer le pathogène de ces vaisseaux (Klosterman et al., 2009). A ce stade, nous observons une grandes quantité de cellules remplies de composée autofluorescents chez la lignée résistante. Ces derniers sont décrits comme étant des composés phénoliques.

Après la germination des spores, les événements observés dans la lignée sensible sont très similaires à ce qui est observé dans le cas de *V. dahliae* et *V. longisporum* chez leurs hôtes. En effet, comme ces deux autres espèces, *V. alfalfae* se développe rapidement dans la lignée sensible et colonise le système vasculaire de façon acropète. Comme *V. longisporum* et *V. albo-atrum* (isolé de la tomate), *V. alfalfae* est capable de traverser les parois des vaisseaux pour infecter les vaisseaux adjacents (Eynck et al., 2007). Tant que la plante n'est pas à un stade avancé de maladie, le pathogène ne se développe que dans les vaisseaux du xylème. Ces observations sont en accord avec les autres études sur les mécanismes de colonisation par *Verticillium* (Eynck et al., 2007 ; Vallad and Subbarao, 2008 ; Prieto et al., 2009 ; Zhao et al., 2014). Cette restriction de la colonisation est semblable à ce qu'on observe dans le cas d'un endophyte.

Nous avons observé la production de spores à 10 jours après inoculation. La sporulation intravasculaire est toujours observée au cours d'une infection par le genre *Verticillium* (Klosterman et al., 2009b), et a été décrite chez la luzerne par Pennypacker et Leath (1983) 6 jours après l'inoculation. Des travaux de réisolement de *V. alfalfae* à partir de racines infectées indiquent que la colonisation est discontinue (Pennypacker et Leath, 1983). La production de spores capables d'être transportées par le flux du xylème peut expliquer à la fois la rapidité de la colonisation et le profil discontinue. Nos résultats de qPCR et de microscopie ont montré que le champignon est détectable dans la partie foliaire des plantes sensibles à partir de 7 jours après inoculation.

La lignée A17 exprime une résistance totale contre *V. alfalfae*. Chez le coton, la tomate, le colza, la laitue et *Arabidopsis*, la différence entre une plante résistante et sensible repose essentiellement sur la capacité de l'hôte à limiter le développement et la progression de *Verticillium* afin d'empêcher la colonisation systémique (Pegg and Brady, 2002 ; Harrison and Beckman, 1982 ; Vallad and Subbarao, 2008 ; Eynck et al., 2007 ; Häffner et al., 2010). Larsen et al. (2007) ont montré une forte corrélation entre la quantité de *V. alfalfae* et la sévérité des symptômes. Toutefois, ils ont montré aussi que parmi les plantes asymptomatiques, on en trouve un grand nombre qui est colonisé par le pathogène. Ce découplage entre la colonisation et les symptômes pourrait être expliqué l'existence de mécanismes de défense distincts qui protègent contre l'infection et les symptômes et dont les *loci* ségrégent dans une population.

Dans cette étude, nous avons montré par microscopie et par qPCR que *V. alfalfae* est incapable de coloniser la lignée A17. Celle-ci exprime donc une résistance totale, contrairement à ce qui est décrit chez le coton en réponse à *V. dahliae* (Zhang et al., 2013b). Mais cela ne permet pas d'exclure l'existence d'un mécanisme à double barrière chez *M. truncatula*, une contre l'infection et l'autre contre les symptômes. En effet, d'autres expériences menées au laboratoire ont montré l'existence de lignées asymptomatiques mais fortement colonisées (Sbeiti et al., non publié). Une étude génétique avec une population issue d'un croisement entre une de ces lignées tolérantes et un parent sensible ou totalement résistant pourrait nous permettre de répondre à cette question.

L'existence d'un tel découplage génétique entre l'inhibition de la colonisation et l'inhibition des symptômes n'a jusqu'à présent été montré que chez *A. thaliana* (Häffner et al., 2010).

Il est clair que la ligné A17 est une plante résistante puisqu'elle met en place des réponses capables de supprimer totalement le pathogène. La présence d'un grand nombre de cellules remplies de composés auto-fluorescents a été observée uniquement chez la lignée résistante. Les molécules induites en réponse à une infection présentant une auto-fluorescence sont des composés phénoliques solubles (Beckman, 2000). Nos résultats sont en accord avec ceux de Pegg and Brady (2002) et Eynck et al. (2007) qui rapportaient la production de composés phénoliques chez la luzerne en réponse à *V. alfalfae* et chez le colza après inoculation avec *V. dahliae*. La production de composés phénoliques fait partie des évènements les plus observés en réponse à l'infection par *Verticillium* (Pegg and Brady, 2002 ; Fradin and Thomma, 2006). Ce type de composés a des effets antimicrobiens et la particularité d'absorber dans le domaine UV (Zhang et al., 2013a). Il reste à savoir si ces molécules jouent un rôle crucial dans la défense de *M. truncatula* contre *V. alfalfae*.

Quels que soient les mécanismes impliqués dans la résistance de *M. truncatula* A17 contre V31-2, il apparaît que ceux-ci arrivent très rapidement à supprimer le développement du pathogène. Il est donc clair que la ligné A17 est résistante puisqu'elle met en place des réponses capables de supprimer totalement le pathogène.

II. Étude de l'implication des hormones dans l'interaction entre *V. alfalfae* et *M. truncatula* par traitements exogènes

Pour activer ses mécanismes de défense contre les pathogènes, la plante a à sa disposition, un réseau complexe impliquant plusieurs voies de signalisation. Parmi ces voies de signalisation, certaines sont régulées par les phytohormones. Ainsi, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (MeJA), l'éthylène (ET), l'auxine et l'acide abscissique (ABA) sont des acteurs essentiels dans l'induction de réponses de défense (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Ils peuvent agir en synergie ou de façon antagoniste pour la mise en place des mécanismes de défense efficaces contre un agresseur (Grant and Jones, 2009 ; Denance et al., 2013). Leur rôle est très bien étudié chez *Arabidopsis* du fait de l'existence d'une grande collection de mutants affectés dans les voies hormonales (Peng et al., 2009). Chez *M. truncatula*, le seul mutant de signalisation hormonale caractérisé est le mutant *sickle* dérivé d'A17 (Voir Introduction Figure 10). Le gène muté code pour l'orthologue d'*Ein2* (*ethylene-insensitive 2*) d'*Arabidopsis* qui est nécessaire pour l'activation de la voie de signalisation de l'éthylène (Varma Penmetsa et al., 2008). Des études réalisées dans notre laboratoire ont montré une hausse du niveau de résistance à Va V31-2 chez ce mutant (Ben et al., 2013).

En absence de mutants, une autre stratégie possible pour étudier leur rôle est l'application exogène des hormones (Conrath et al., 2002). Le traitement exogène permet de provoquer une accumulation de l'hormone *in planta*, ce qui va activer la voie de régulation et modifier la réponse de la plante face au pathogène (Esmailzadeh et al., 2008 ; Gaige et al., 2010). Dans le but d'identifier les voies hormonales susceptibles de jouer un rôle dans l'interaction entre *M. truncatula* et *V. alfalfae*, des plantules d'A17 et F83005.5 ont été prétraitées avec 10 μ M de SA, MeJA, ABA, IAA ou le précurseur d'ET, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC). Les traitements ont été réalisés un jour avant l'inoculation en ajoutant les hormones dans le milieu hydroponique et sont maintenus dans le milieu jusqu'à la fin des essais soit 21 jours après l'inoculation. Avant d'étudier les effets de ces traitements sur l'interaction entre l'hôte et le pathogène, nous avons analysé leurs effets potentiels sur le développement des plantes et du pathogène.

| Hormone | Diamètre de la colonie (mm) | | Concentration en spores (10 ⁷ /ml) ± SD |
|----------|-----------------------------|------------|--|
| | 8 jours | 15 jours | |
| Contrôle | 43,0 ± 2,6 | 79,0 ± 1,0 | 1,02 ± 0,22 |
| SA | 41,3 ± 1,2 | 77,3 ± 0,6 | 0,97 ± 0,19 |
| ABA | 43,0 ± 1,0 | 79,0 ± 1,0 | 0,9 ± 0,15 |
| IAA | 42,7 ± 1,2 | 77,0 ± 1,0 | 0,98 ± 0,28 |
| MeJA | 42,3 ± 2,1 | 78,7 ± 2,1 | 1,02 ± 0,07 |
| ACC | 42,0 ± 4,0 | 78,3 ± 4,5 | 1,07 ± 0,28 |

Tableau II.1 : Effet des hormones sur la croissance de *Va V31-2* et sa sporulation *in vitro*. La croissance a été mesurée sur le milieu PDA supplémenté ou non de 10µM SA, MeJA, ABA, IAA ou ACC, à 25°C ; la concentration de spores a été mesurée après 15 jours de croissance en remettant la culture en suspension dans 15ml d'eau stérile. Les valeurs sont les moyennes de 3 réplicats biologiques.

1. Effets des traitements hormonaux sur la croissance de *Va* V31-2

Les plantes ainsi que les champignons produisent des phytohormones (Baca and Elmerich, 1970). Ceci a été rapporté pour le genre *Verticillium* (Pegg and Brady, 2002), mais de façon générale, le rôle des hormones chez les champignons reste peu connu. Toutefois, il a été montré que des fortes concentrations en SA (Amborabé et al., 2002) et en auxine (Al-Masri et al., 2002) peuvent avoir des effets antifongiques *in vitro*. Pour s'assurer que 10 μ M est une concentration qui ne va pas avoir d'effets directs sur le pathogène, nous avons mesuré sa croissance radiale et son taux de sporulation en présence d'hormones. Un centimètre carré d'une culture de V31-2 a été déposé sur du milieu PDA supplémenté ou pas d'hormone. La croissance de la colonie a été évaluée en mesurant le diamètre après 8 et 15 jours de culture. Au 15^{ème} jour, la culture a été remise en suspension dans 15ml d'eau stérile et la concentration en spores a été déterminée en utilisant une cellule de Malassez. Trois répétitions techniques ont été réalisées. Les résultats montrent que les traitements n'ont pas eu d'effet sur la croissance de V31-2 (aire sous la courbe de croissance *p-value* = 0.954) ni sur sa capacité à sporuler (*p-value* = 0.931) (**Tableau II. 1**).

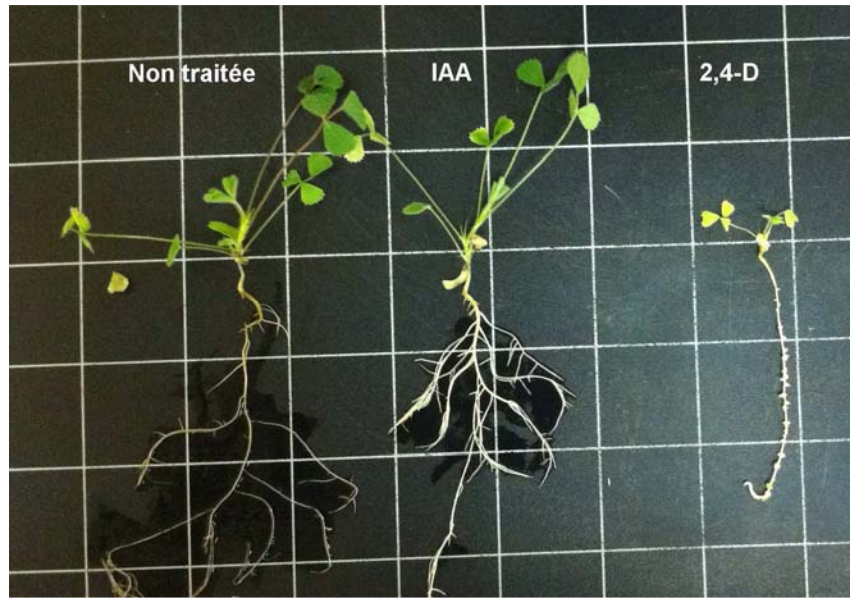


Figure II. 1 : Effet des auxines IAA et 2,4-D sur le développement de *M. truncatula*. Les plantes cultivées en hydroponique ont été traitées ou non avec 10 μ M d'IAA ou de 2,4-D ajoutés au milieu Farhaeus. La photo a été prise 22 jours après le début du traitement. IAA = acide indole-3-acétique, 2,4-D = 2,4-dichlorophénoxyacétique.

2. Effet des traitements hormonaux sur le développement de la maladie

a) Mise au point du dispositif expérimental.

Pour le traitement à l'auxine, nous avons essayé l'IAA et le 2,4-D (2,4-dichlorophénoxyacétique). Dans nos premiers essais, le 2,4-D a montré une toxicité très élevée sur les plantes contrairement à l'IAA. Cette différence n'est pas étonnante vu que l'IAA est la forme naturelle de l'auxine alors que le 2,4-D est une molécule de synthèse qui agit comme l'auxine mais qui est aussi utilisée comme désherbant. Les observations montrent que contrairement à l'IAA, le traitement avec 2,4-D a provoqué chez *M. truncatula* une diminution de la croissance générale de la plante ainsi qu'une inhibition de la croissance des racines latérales (**Figure II. 1**). Nous avons donc choisi d'utiliser l'IAA pour les traitements à l'auxine.

Pour étudier les effets des traitements hormonaux sur l'interaction compatible et incompatible entre de *Va* V31-2 et *M. truncatula*, des plantules de 9 jours d'A17 et de F83005.5 cultivées en culture hydroponique ont été traitées avec 10 μ M de MeJA, ACC, ABA, SA ou IAA un jour avant l'inoculation avec le champignon. Des plantes contrôles permettant d'observer l'effet de l'inoculation (plantes non traitées et non inoculées) et l'effet des traitements hormonaux (plantes traitées mais non inoculées) ont également été analysées. Après l'inoculation avec *Va* V31-2, les symptômes ont été notés régulièrement jusqu'à 16 dpi. Pour chacune des conditions étudiées, les parties racinaires et foliaires de 3 plantes ont été récoltées à 7, 10 et 13 dpi pour quantifier l'ADN du pathogène *in planta*. Les plantes ont ensuite été gardées en culture une semaine supplémentaire, avant de mesurer le poids frais foliaire (SFW, pour shoot fresh weight), le poids frais racinaire (RFW, pour root fresh weight), le poids sec foliaire (SDW, pour shoot dry weight), le poids sec racinaire (RDW, pour root dry weight) et le poids sec total (TDW pour total dry weight) sur trois réplicats biologiques.

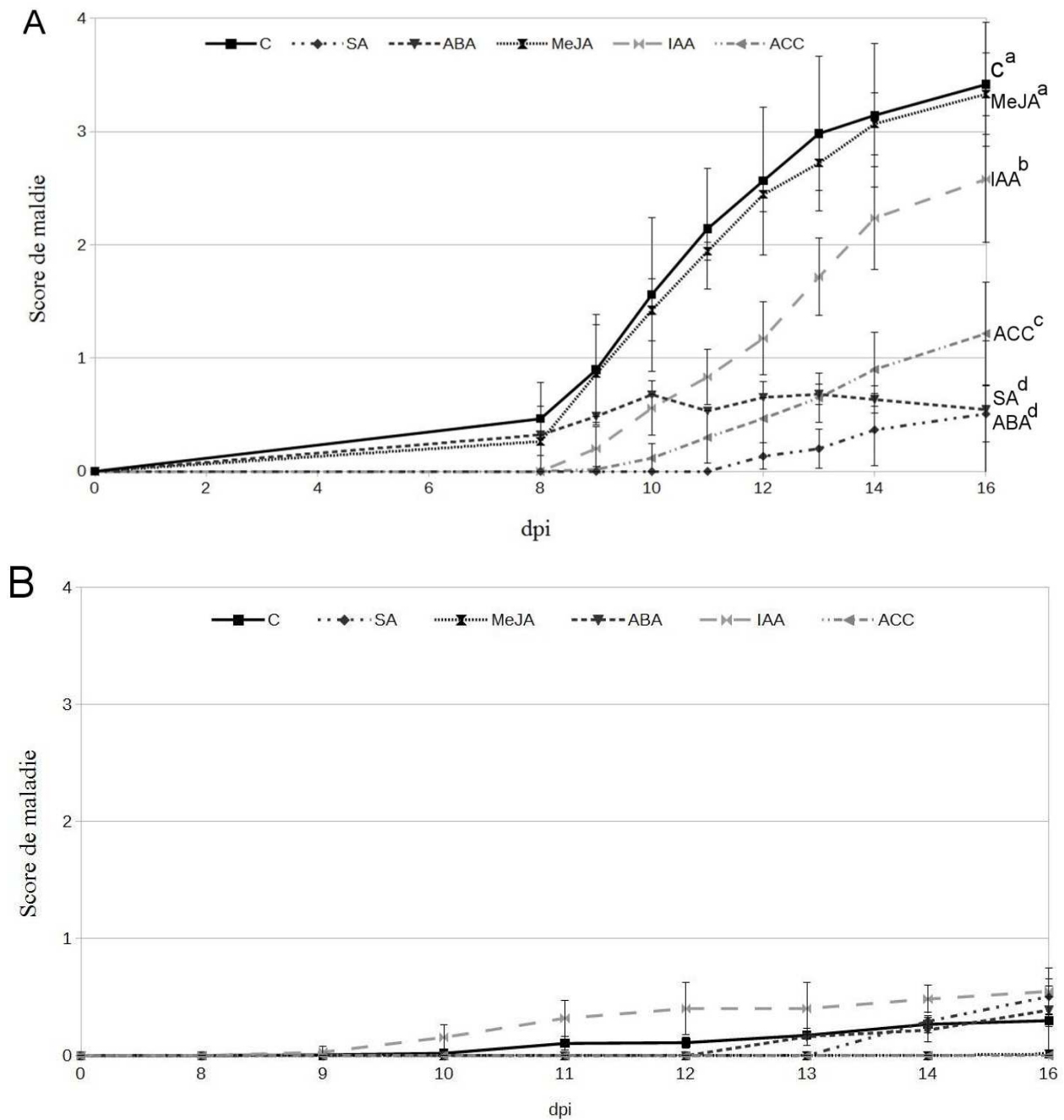


Figure II. 2 : Effet des prétraitements hormonaux sur le développement des symptômes de flétrissement. Les plantes ont été traitées 24 heures avant l'inoculation avec 10 μ M de SA, ABA, MeJA, IAA, ACC. Les symptômes des plantes F83005.5 (A) et A17 (B) ont été notés sur une échelle de 0 à 4. Les courbes représentent le score moyen des symptômes sur 3 réplicats biologiques. Les barres d'erreurs représentent les écartypes des scores moyens des trois répétitions biologique. Les valeurs d'AUDPC ont été analysées par ANOVA pour déterminer les groupes de moyennes (p -value = 0.05). Pour la lignée A17, aucun effet significatif n'a été observé. Pour la lignée F83005.5, les groupes de moyennes sont représentés par des lettres à côté du nom de l'hormone. C = plantes contrôles, SA = acide salicylique, ABA = acide abscissique, MeJA = méthyl jasmonate, IAA = acide indole-3-acétique, ACC = acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique.

b) Effets des traitements sur le développement des symptômes chez A17 et F83005.5

La **Figure II. 2** montre illustre l'effet des prétraitements sur la progression des symptômes chez la lignée F83005.5 (A) et A17 (B). Ces résultats montrent que la résistance d'A17 n'est affectée par aucun de ces traitements ($\alpha= 0.05$). Dans le cas de la lignée sensible, on observe une diminution des symptômes à l'exception du prétraitement avec MeJA. Le paramètre AUDPC (Area Under Progress Curve) a été utilisé pour réaliser les études statistiques. L'ANOVA suivie d'une comparaison multiple des moyennes montre que les traitements avec l'ABA et le SA permettent la meilleure protection. Ces deux hormones diminuent très fortement l'apparition des symptômes chez la lignée sensible. Dans l'échelle d'efficacité de protection, après l'ABA et le SA, on trouve l'ACC, puis l'IAA qui ont des effets intermédiaires. Toutefois, nous avons observé que l'ACC retarde seulement l'apparition des symptômes. En effet, les plantes atteignent le même score final que les plantes non traitées à 21dpi (données non présentées).

Va V31-2 induit des symptômes de flétrissement foliaire chez la lignée sensible et à terme provoque la mort prématurée des plantes. On observera alors une très forte diminution des traits de développement des plantes sensibles comparées à ceux des plantes résistantes. Pour étudier les effets de l'infection sur la plante, nous avons choisi de mesurer le SFW, le SDW, le RFW, le RDW et le TDW comme marqueurs de l'état sanitaire de la plante à 21dpi. Les résultats montrent que l'infection n'a pas d'effet significatif ($\alpha= 0.001$) sur le développement de la lignée résistante (**Tableau II. 2**). En revanche, les paramètres SFW, SDW, RFW et TDW sont fortement diminués chez la lignée sensible. On n'observe pas d'effet significatif sur le RDW.

Les hormones sont connues pour être impliquées dans le développement de la plante. Pour voir l'effet des traitements sur le développement, nous avons comparé le SFW, le SDW, le RFW des plantes non traitées-non inoculées avec ceux des plantes traitées-non inoculées (non traitée vs. traitée-Mock). On peut voir que l'effet des traitements est différent selon la molécule et la lignée. Le traitement avec l'ACC provoque une diminution du SDW chez les deux lignées. Chez F83005.5, on peut voir que le SA et l'ABA diminuent les traits foliaires alors que l'IAA diminuent les traits foliaires

| A17 Résistante | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|--|
| Non traitée | | | SA | | | MeJA | | | ABA | | | IAA | | | ACC | | |
| | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | |
| SFW (g) | 0,143ab | 0,137ab | 0,129ab | 0,140ab | 0,156ab | 0,180a | 0,155ab | 0,159ab | 0,122b | 0,123b | 0,138ab | 0,139ab | 0,122b | 0,123b | 0,138ab | 0,139ab | |
| SDW (g) | 0,024bc | 0,022c | 0,028abc | 0,032ab | 0,032ab | 0,035a | 0,031ab | 0,032ab | 0,026abc | 0,022c | 0,013d | 0,015d | 0,026abc | 0,022c | 0,013d | 0,015d | |
| RFW (g) | 0,052ab | 0,047ab | 0,061ab | 0,053ab | 0,058ab | 0,080a | 0,067ab | 0,085a | 0,048ab | 0,055ab | 0,034b | 0,054ab | 0,048ab | 0,055ab | 0,034b | 0,054ab | |
| RDW (g) | 0,005bc | 0,005bc | 0,007ab | 0,007ab | 0,006bc | 0,010a | 0,007ab | 0,007ab | 0,004bc | 0,004bc | 0,003c | 0,006abc | 0,004bc | 0,004bc | 0,003c | 0,006abc | |
| TPDW | 0,030bcd | 0,028bcd | 0,035abc | 0,039ab | 0,037abc | 0,045a | 0,038abc | 0,039ab | 0,031bcd | 0,027cd | 0,016e | 0,022de | 0,031bcd | 0,027cd | 0,016e | 0,022de | |
| F83005.5 Sensible | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Non traitée | | | SA | | | MeJA | | | ABA | | | IAA | | | ACC | | |
| | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | Mock | V _a V31-2 | |
| SFW (g) | 0,178a | 0,010d | 0,109b | 0,087b | 0,159a | 0,011d | 0,124b | 0,099b | 0,098b | 0,048c | 0,170a | 0,018d | 0,098b | 0,048c | 0,170a | 0,018d | |
| SDW (g) | 0,034a | 0,010d | 0,023bc | 0,026bc | 0,029ab | 0,011d | 0,024bc | 0,022bc | 0,023bc | 0,018c | 0,020c | 0,010d | 0,023bc | 0,018c | 0,020c | 0,010d | |
| RFW (g) | 0,048a | 0,014ef | 0,043ab | 0,032bcd | 0,053a | 0,009f | 0,045ab | 0,040abc | 0,029bcd | 0,024de | 0,042ab | 0,026cde | 0,029bcd | 0,024de | 0,042ab | 0,026cde | |
| RDW (g) | 0,007b | 0,004bc | 0,005bc | 0,010a | 0,006b | 0,006b | 0,005bc | 0,006b | 0,004bc | 0,007b | 0,004bc | 0,002c | 0,004bc | 0,007b | 0,004bc | 0,002c | |
| TDW | 0,040a | 0,014c | 0,028abc | 0,036ab | 0,036ab | 0,018bc | 0,029abc | 0,028abc | 0,027abc | 0,039a | 0,025abc | 0,012c | 0,027abc | 0,039a | 0,025abc | 0,012c | |

Tableau II. 2 : Effet des traitements hormonaux sur des traits de développement des lignées A17 et F83005.5 inoculées ou non avec Va V31-2. Les plantes ont été traitées 24 heures avant l'inoculation avec 10µM de SA, ABA, MeJA, IAA, ACC. A 21 dpi, le poids frais foliaire (SFW), le poids frais racinaire (RFW), le poids sec racinaire (SDW) et le poids sec racinaire (RDW) des plantes ont été mesurés. Trois réplicats biologiques ont été réalisés. Des plantes contrôles non traitées et non inoculées (effet de l'inoculation) et des plantes traitées mais non inoculées (effet des traitements hormonaux) ont été rajoutées. Mock = non inoculé, Va V31-2 = inoculé. Les résultats ont été analysés par ANOVA (*p-value* = 0,001), les lettres représentent les groupes de moyennes. Mock = plantes non-inoculées, SA = acide salicylique, ABA = acide salicylique, MeJA = méthyl jasmonate, IAA = acide indole-3-acétique, ACC = acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique. Les valeurs en rouge sont celles qui montrent une différence significative par rapport au contrôle non inoculé.

et le RFW (**Tableau II.2**).

Pour analyser l'effet des traitements sur les plantes inoculées, nous avons donc comparé les plantes traitées non inoculées et les plantes traitées inoculées (traitée-Mock vs. traitée- *Va* V31-2). L'application exogène d'hormones préalablement à l'inoculation avec V31-2 n'affecte pas la réponse vis-à-vis du pathogène chez la lignée résistante A17 en termes de développement foliaire et racinaire (**Tableau II.2**). Chez la lignée sensible F83005.5, on n'observe pas de diminution du SFW, du SDW et du RFW lorsque les plantes inoculées ont été traitées avec le SA ou l'ABA, ce qui n'est pas le cas lorsque les plantes ont été traitées avec le MeJA. Le SA et l'ABA protègent donc de l'infection mais pas le MeJA. Dans le cas du traitement avec l'IAA, on observe une diminution du SFW mais pas du SDW et du RFW des plantes inoculées. Toutefois, le SFW des plantes inoculées et traitées avec l'IAA reste supérieur à celui des plantes inoculées contrôles (inoculées et non traitées par les hormones). Globalement, le traitement de l'IAA protège les plantes infectées mais son effet est surtout observé au niveau des poids secs foliaires (et racinaires), comme on peut le voir avec le poids sec total. Dans le cas de l'ACC, on observe que le traitement ne protège pas contre les effets de l'inoculation sur le SFW, le SDW et le RFW. Il faut savoir que les symptômes sont notés seulement jusqu'à 16 dpi alors que les marqueurs de développement de la plante ont été mesurés à 21dpi. L'ACC ne protège donc pas les plantes sensibles jusqu'à 21dpi. Il ne fait que ralentir l'apparition des symptômes.

c) Effet des traitements sur la colonisation racinaire et foliaire par *Va* V31-2.

Des traitements par apport exogène d'ABA, de SA et d'IAA protègent contre les symptômes de la verticilliose alors que le traitement avec l'ACC ralentit le développement de la maladie. La suppression des symptômes par ces traitements peut être soit liée à une résistance semblable à celle qu'on observe chez A17 qui permet l'élimination du pathogène, soit à une tolérance. Pour savoir laquelle de ces deux hypothèses est impliquée dans le phénomène de protection par ces hormones, l'ADN de V31-2 a été quantifié par qPCR dans les racines et feuilles de plantes de F83005.5

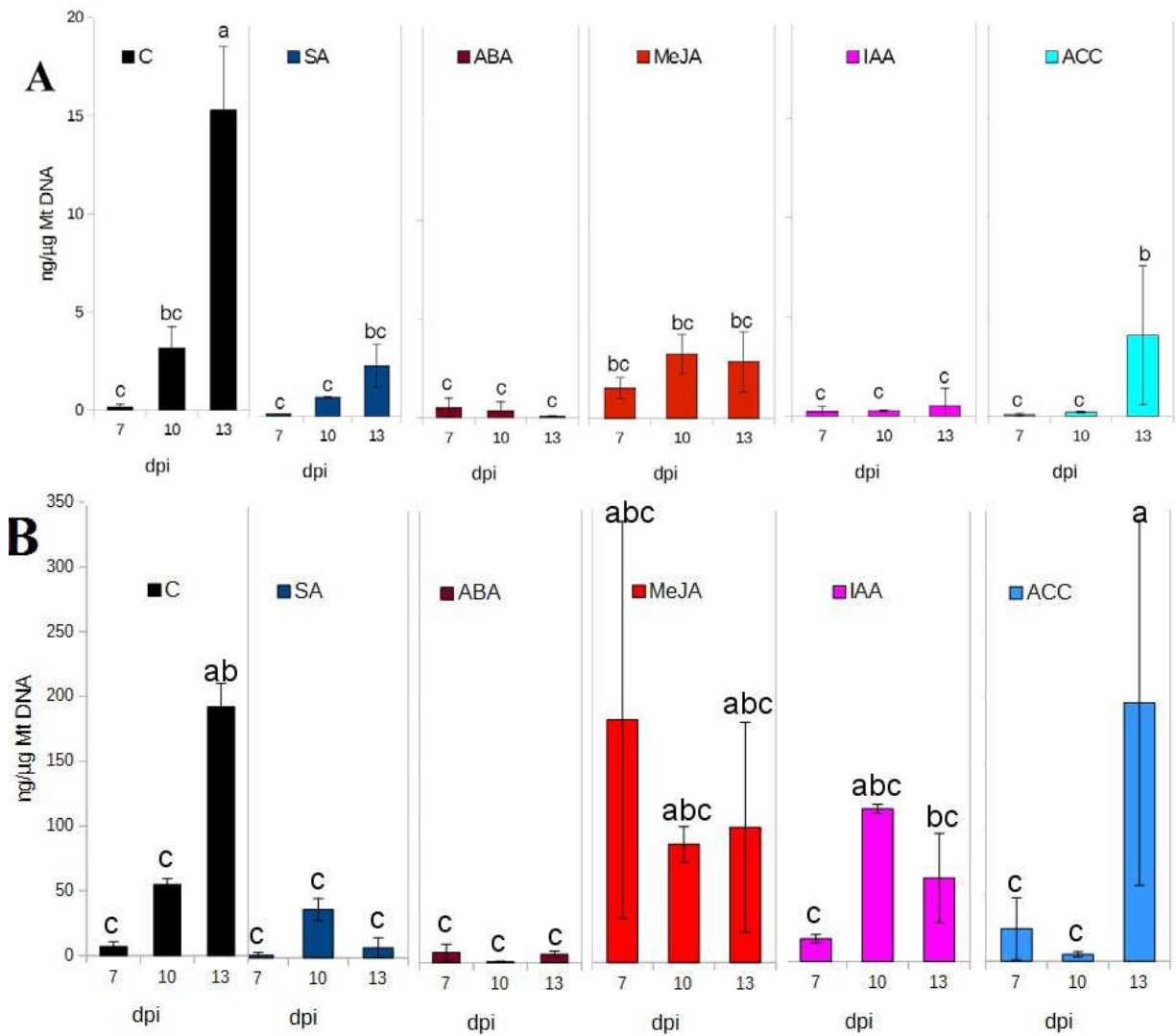


Figure II. 3 : Effets des traitements hormonaux sur la croissance de V31-2 *in planta*. L'ADN de V31-2 a été quantifié à 7, 10 et 13 dpi dans les parties foliaires (A) et racinaires (B) des plantes sensibles traitées avec 10 μ M de SA, ABA, MeJA, IAA, ACC. Les résultats de 2 réplicats biologiques ont été analysés par ANOVA (p -value = 0.05) et les lettres représentent les groupes de moyennes. Les barres d'erreurs représentent les écartypes. C = plantes contrôles non-traitées, SA = acide salicylique, ABA = acide abscissique, MeJA = méthyl jasmonate, IAA = acide indole-3-acétique, ACC = acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique.

inoculées à 7, 10 et 13 dpi (**Figure II. 3**). La quantité d'ADN du pathogène reflète la biomasse fongique. Les résultats montrent une augmentation progressive de la quantité d'ADN de V31-2 au niveau racinaire et foliaire dans les plantes non traitées avec les hormones. La quantité d'ADN est 10 fois plus élevée dans les racines ; dans la partie foliaire le seuil de détection n'est atteint qu'à partir de 10 dpi. Ces observations sont accord avec le fait que l'inoculation est faite au niveau des racines et que la colonisation se fait de façon acropète.

Dans le cas des plantes traitées avec les hormones, l'effet sur la quantité d'ADN du pathogène est différent dans les racines et les parties aériennes. Toutes les hormones réduisent la colonisation de la partie aérienne, y compris le MeJA qui ne protège pas contre les symptômes (**Figure II. 3 A**). En effet, quel que soit le traitement hormonal, au bout de 13 jours la quantité d'ADN du pathogène dans la partie foliaire ne dépasse pas 5ng/μg d'ADN de *M. truncatula* alors que dans les plantes contrôles (non-traitées) elle atteint 16ng/μg d'ADN de *M. truncatula*.

Concernant la quantité d'ADN fongique dans les racines, la protection contre les symptômes par le SA et l'ABA est associée à une forte inhibition de la colonisation. L'IAA qui conférait une protection intermédiaire, l'ACC qui ralentit le développement des symptômes, et le MeJA qui ne protège pas, n'ont pas d'effet significatif sur les quantités d'ADN de V31-2 comme montré par l'analyse statistique et les groupes de moyennes (**Figure II. 3 B**). Cependant, il pourrait y avoir un effet sub-significatif dans le sens d'une stimulation de la colonisation aux temps précoces par le MeJA, et d'une inhibition partielle par l'IAA dans les temps tardifs.

Les traitements avec le SA et l'ABA ont permis de diminuer très fortement les symptômes et la biomasse du pathogène *in planta* mais sans l'éliminer totalement. La **Figure II. 4** montre une coupe longitudinale d'une racine de la lignée F83005.5 traitée avec le SA et inoculée avec la souche exprimant la GFP. Comme on peut le voir, 9 jours après l'inoculation, le champignon a colonisé les vaisseaux du xylème. Ceci confirme que le traitement avec SA augmente la tolérance contre Va V31-2 mais n'empêche pas la colonisation. Dans le cas de l'ABA, quel que soit le temps après inoculation, on ne détecte pas d'ADN du champignon au-delà du bruit de fond. Il est possible que

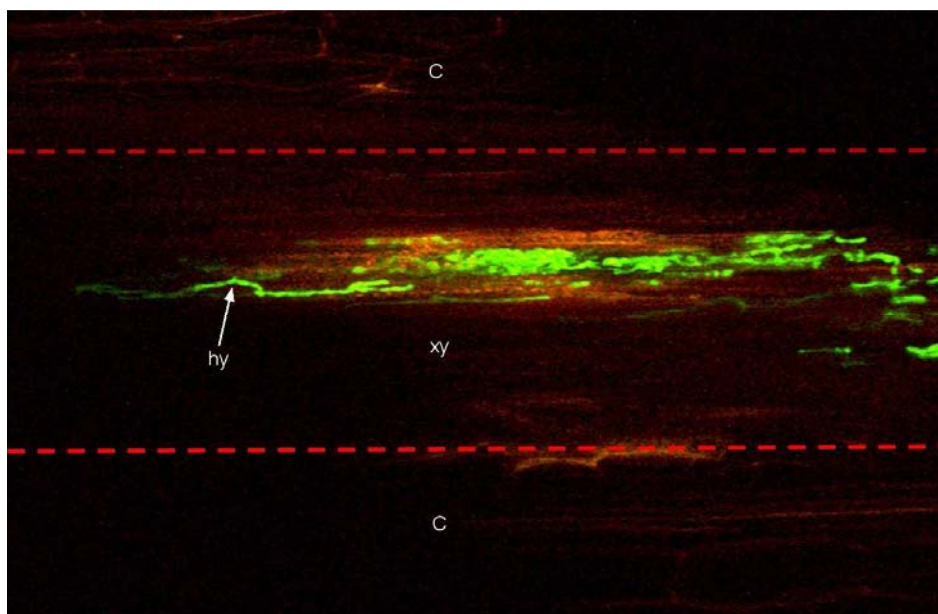


Figure II. 4 : Observation microscopique de V31-2 dans les racines d'une plante de la lignée F83005.5 traitée avec SA. Les plantes ont été traitées avec 10 μ M de SA 24 heures avant l'inoculation avec la souche exprimant la GFP. Cette observation a été réalisée à 9dpi. On observe la présence de mycélium (vert) dans les vaisseaux du xylème. Les traits rouges en pointillés délimitent la zone vasculaire. C, cortex ; xy, xylème ; hy, hyphe.

| A17 | | | | | |
|---------------|------------|------|------|------|------|
| Gène | Annotation | RB1 | | RB2 | |
| | | 1dpt | 2dpt | 1dpt | 2dpt |
| TC93960 | VSP | 24,2 | 19,1 | 46,5 | 23,8 |
| TC100490 | PI | 38,5 | -2 | 16,8 | 7,4 |
| Medtr4g068550 | AOS | 4,1 | 6,8 | 1,1 | 18,6 |

| F83005.5 | | | | | |
|---------------|------------|-------|-------|------|------|
| Gène | Annotation | RB1 | | RB2 | |
| | | 1dpt | 2dpt | 1dpt | 2dpt |
| TC93960 | VSP | 136 | 12,6 | 16,8 | 1,2 |
| TC100490 | PI | 205,2 | -12,2 | 6,1 | -10 |
| Medtr4g068550 | AOS | 9,1 | 6,9 | 6,7 | 3,2 |

Tableau II. 3 : Effets du traitement de plantes de *M. truncatula* au MeJA sur l'expression de gènes candidats. Le niveau d'expression de trois gènes induits par la voie du jasmonate, à savoir les gènes codant pour une vegetative storage protein (VSP), un proteinase inhibitor (PI), et une allène oxyde synthase (AOS). Des plantules ont été traitées avec 10 μ M MeJA. L'ARN total des racines a été extrait à 1 et 2 jours après le traitement (dpt pour days post treatment). L'expression de gènes candidats a été analysée par q-RT PCR. Les chiffres représentent les coefficients de variation de l'expression des gènes. Ils sont marqués en rouge si le gène est induit et en vert en cas de répression du gène.

le traitement avec l'ABA permette une résistance totale contrairement aux autres hormones.

d) Effet des traitements hormonaux sur l'expression de gènes marqueurs

Nos expériences ont montré que le traitement par le MeJA n'affecte pas la réponse à *V. alfalfae* et ce, dans les 2 lignées sensible et résistante. Pour s'assurer de l'efficacité du traitement, nous avons mesuré par q-RT PCR le niveau d'expression de trois gènes connus pour être induits par la voie du jasmonate, à savoir les gènes codant pour une vegetative storage protein (VSP), un proteinase inhibitor (PI), et une allène oxyde synthase (AOS) (Devoto and Turner, 2003). Les résultats montrent que ces trois gènes sont induits suite au traitement avec le MeJA (**Tableau III. 3**). On peut en conclure que l'absence de l'effet du traitement sur le développement des symptômes n'est pas due à une inefficacité du traitement.

3. Recherche et caractérisation de mutant de la voie de l'acide salicylique

Les travaux précédents ont montré que l'acide salicylique est l'une des hormones qui peuvent protéger *M. truncatula* contre *Va* V31-2. Cependant, les traitements exogènes ne nous permettent pas d'affirmer avec certitude que la voie SA est induite suite à l'interaction avec V31-2. Il serait donc intéressant de valider ces résultats par une approche de génétique inverse. La stratégie adoptée a été d'identifier un mutant affecté dans un gène impliqué dans la signalisation de la voie de SA chez *M. truncatula*. Depuis plusieurs années *NPR1* (*Nonexpresser of PR genes 1*) a été identifié comme le régulateur central de la voie de SA chez *A. thaliana* (Yan and Dong, 2014). La séquence TC102752 (Medtr5g090770.1) a été identifiée comme codant pour un homologue de NPR1 chez *M. truncatula* (Peleg-Grossman et al., 2009). L'analyse par Blastn montre qu'il y a trois autres homologues de *npr1* chez *M. truncatula* (Medtr2g028950.1, Medtr2g039880.1, Medtr7g090020.1).

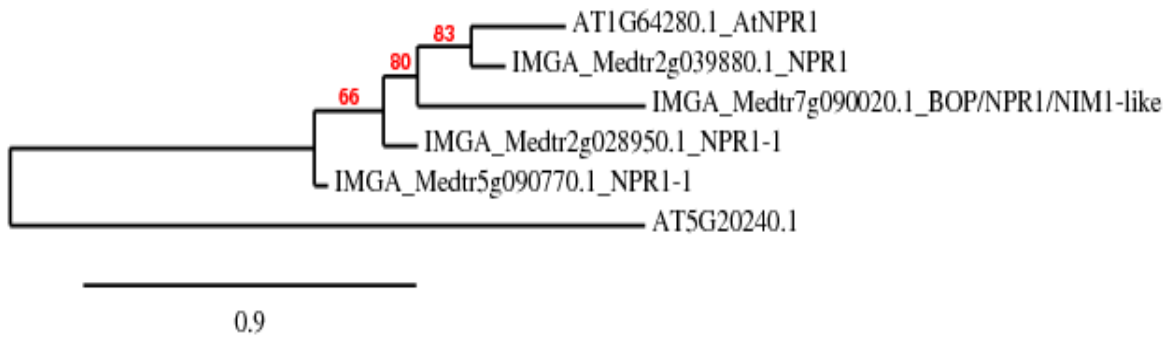


Figure II. 5 : Comparaison des séquences protéiques de NPR1 d'*A. thaliana* avec les homologues de *M. truncatula*. Les séquences ont été extraites à partir d'un BlastN réalisé avec la séquence protéique de NPR1 (AT1G64280.1) d'*A. thaliana* sur le génome v3.5 de *M. truncatula*. Les séquences protéiques ont été alignées avec la méthode ClustalW et l'arbre phylogénétique a été généré en utilisant PhyML v3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/binaries.php>). Les nombres indiquent les valeurs de similitude ("bootstrap" inférieures à 50% ne sont pas montrées). Les branches sont tracées à l'échelle. La séquence protéique AT5G20240.1 a été utilisée pour enraciner l'arbre.

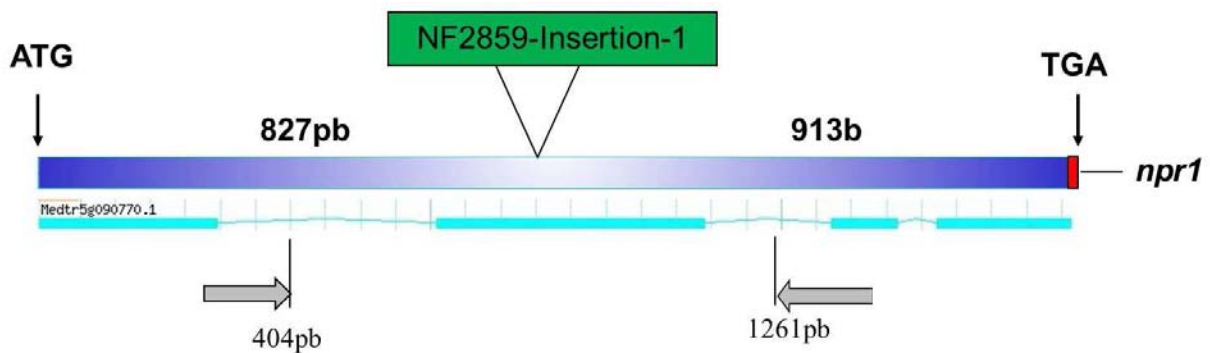


Figure II. 6 : Représentation schématique de l'insertion *Tnt1* dans la séquence génomique de *Npr1* dans la lignée NF2859. Les flèches indiquent respectivement les sites d'initiation de la traduction (ATG) et de fin de traduction (TGA). Le site d'insertion du transposon de *Tnt1* est représenté par le rectangle vert avec le numéro du mutant et le numéro de l'insertion. Les flèches en gris représentent la position des amorces. pb = pair de base.

La **Figure II. 5** indique que Medtr2g039880.1.1 est un meilleur candidat parmi ces homologues.

a) Identification d'un mutant *Npr1* chez *M. truncatula*

En utilisant la séquence de TC102752, nous avons identifié la lignée NF2859 parmi les mutants d'insertion *Tnt1* de la collection de The Samuel Roberts Noble Foundation (<http://www.noble.org/>) comme étant affectée au niveau du gène *Npr1*. Les mutants d'insertion *Tnt1* de The Samuel Roberts Noble Foundation Inc (Oklahoma, USA) sont obtenus à partir du génotype R108 de *M. truncatula*. Les insertions du rétrotransposon *Tnt1* sont connues pour être stables et varient entre 4 et 40 par lignée. Dans le mutant NF2859, il y a 31 insertions dont 13 qui sont localisées dans une séquence codante. C'est l'insertion NF2859-Insertion-1 qui est située dans le gène codant pour *NPR1*, que nous avons identifié comme étant Medtr5g090770.1. En janvier 2012, 10 graines de la génération R1 ont été obtenues à partir d'un seul tour d'autofécondation du mutant et ont été mises à vernaliser, 8 ont germées. Les 8 plantules ont été mises en serre pour la multiplication et annotées avec des lettres de A à H. Lors des récoltes, nous avons observé qu'il y avait 2 plantes de très petite taille. Une a donné une seule gousse et sur l'autre, aucune gousse n'a été produite. Les 6 autres ont poussé normalement.

b) Génotypage de la descendance de la lignée mutante NF2859

Après multiplication des graines, nous avons obtenu 6 lignages ayant produit suffisamment de graines pour le génotype. Nous avons voulu identifier les lignages mutés sur le *locus* *Npr1*. Pour cela, 3 à 6 plantules (selon l'efficacité de germination) par lignage ont été cultivées en substrat Jiffy et l'ADN des plantes a été extrait pour vérifier la présence de l'insertion du *Tnt1* dans le gène *Npr1*. Pour cela, des amorces ont été choisies de part et d'autre de l'insertion pour l'amplification de *Npr1*. Pour détecter l'insertion, nous avons utilisé une amorce de la séquence *Npr1* et une autre de la séquence de *Tnt1* (**Figure II. 6**). Les résultats de génotypage montrent qu'il y a très peu de mutants *npr1*. En effet, sur les 27 plantes génotypées il y a au total 6 génotypes mutants dont un seul

Tableau II. 4 : Génotypage des lignages du mutant NF2859 pour le locus *NPR1*.

| Lignage | Plante | <i>npr1</i> | Lignage | Plante | <i>npr1</i> |
|---------|--------|-------------|---------|--------|-------------|
| A | A_1 | nd | D | D_1 | W |
| A | A_2 | W | D | D_2 | W |
| A | A_3 | W | D | D_3 | W |
| A | A_4 | W | D | D_4 | W |
| A | A_5 | H | D | D_5 | W |
| | | | D | D_6 | W |
| B | B_1 | H | G | G_1 | W |
| B | B_2 | nd | G | G_2 | W |
| B | B_3 | W | G | G_3 | H |
| B | B_4 | M | G | G_4 | H |
| B | B_5 | W | | | |
| B | B_6 | W | | | |
| C | C_1 | W | F | F_1 | nd |
| C | C_2 | W | F | F_2 | H |
| C | C_3 | W | F | F_3 | W |
| C | C_4 | W | | | |
| C | C_5 | W | | | |
| C | C_6 | W | | | |
| Lignée | Plante | <i>npr1</i> | | | |
| R108 | R108_1 | W | | | |

Les plantes avec une insertion dans le locus *Npr1* sont représentées en rouge. Le génotype 'W' correspond au génotype de R108, le génotype 'H' correspond à un génotype hétérozygote alors que le génotype 'M' correspond au génotype mutant homozygote. nd : donnée indisponible.

homozygote (**Tableau II. 4**). D'après ces résultats, les lignages D et C ne sont pas mutés sur ce *locus* contrairement aux lignages A, B, G et F.

4. Discussion

Les mécanismes de résistance des plantes sont régulés par plusieurs voies de signalisation impliquant les phytohormones. Ainsi, l'acide salicylique, l'acide jasmonique, les auxines, l'éthylène et l'acide abscissique sont des acteurs essentiels dans l'induction de réponses de défense contre les phytopathogènes (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Mais en même temps, ces molécules régulent aussi plusieurs aspects dans la croissance, le développement, la reproduction ou encore la réponse aux facteurs abiotiques (Denance et al., 2013). Une régulation fine de la réponse aux pathogènes est donc nécessaire pour éviter des dysfonctionnements sur les autres processus physiologiques tels que la production de biomasse ou la production de graine.

Pour identifier les voies susceptibles d'être impliquées dans la résistance contre *Va* V31-2, nous avons réalisé des traitements exogènes. Les résultats ont montré que le traitement avec le MeJA ne confère pas de protection contre *Va* V31-2, contrairement aux observations de Johansson et al. (2006) qui ont montré qu'un prétraitement avec 50µM de MeJA augmente la résistance d'*A. thaliana* contre *V. longisporum*. Les traitements avec l'ABA, le SA, et l'IAA diminuent fortement l'apparition des symptômes chez *M. truncatula*, et le traitement avec l'ACC provoque un ralentissement dans le développement de la maladie. La quantification de l'ADN du champignon *in planta* nous permet de dire que les traitements avec le SA et l'IAA augmentent la tolérance mais ne confèrent pas une résistance totale. L'ABA serait un très bon candidat pour la résistance puisque la quantité d'ADN du pathogène *in planta* ne dépasse pas le seuil de détection.

Un traitement pré- ou post-inoculation de la luzerne avec 10µM d'IAA augmente la résistance contre *V. alfalfae* (Pegg and Brady, 2002). Sinha and Wood (1967) ont aussi observé que les traitements exogènes sur des plantes de tomate avec l'IAA augmentent la résistance à *V. albo-atrum* en inhibant la croissance du pathogène *in planta*. La même chose a été observée chez la

pomme de terre et le coton en réponse à *V. dahliae* (Corsini et al., 1989 ; Xu and Shi, 2000). Cependant, le traitement exogène avec l'IAA ne permet pas de protéger l'aubergine contre *V. dahliae* (Yang et al., 2013). L'auxine jouerait un rôle de balance dans les réponses de résistance le plus souvent en interagissant avec la voie SA de façon antagoniste. Le traitement exogène de SA supprime l'expression des gènes dépendants de l'auxine (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Cet antagonisme se retrouve aussi au niveau du développement des racines (Rahman et al., 2007).

Un traitement exogène ne permet pas d'affirmer qu'une voie est impliquée ou non dans la résistance. Chez *A. thaliana*, le traitement exogène avec le SA augmente la résistance contre *V. dahliae* (Zhou et al., 2002), alors que les mutations *npr1* et *pad4* (phytoalexine déficient 4) n'ont pas d'effet sur la résistance (Jirage et al., 1999 ; Veronese et al., 2003a ; Pantelides et al., 2010 ; Fradin et al., 2011). Cette différence est sans doute due au fait que le traitement va activer la production de chitinases (PR-3) et β -1,3-glucanases (PR-2) qui dégradent la paroi des champignons, de la PAL et des flavonoïdes. Ces réponses augmentent la résistance contre les champignons (Zhang et al., 2010). Comme nous avons pu le voir, un traitement avec SA protège contre *Va* V31-2, mais pour approfondir ce travail nous devons continuer nos études sur le mutant de *npr1* identifiés.

En ce qui concerne le rôle de l'éthylène dans la résistance contre *Verticillium*, nous avons observé un ralentissement de l'évolution de la maladie après un traitement à l'ACC. D'autres études montrent que les traitements exogènes avec l'ACC augmentent la résistance d'*A. thaliana*, de la tomate et celle du coton contre *V. dahliae* (Shu-Ling et al., 2012 ; Robison et al., 2001a ; Xu and Shi, 2000). On observe la même chose chez *A. thaliana* en réponse à *V. longisporum* (Johansson et al., 2006). L'ACC semble avoir un double rôle dans la résistance à *Verticillium*. Le traitement exogène activerait l'expression de mécanismes de défense comme des "acidic pathogenesis-related proteins", la PAL, des chitinases et des β -1,3-glucanases (PR-2) ce qui peut expliquer cette hausse de la résistance (Robison et al., 2001b). Cependant, Robison et al., (2001a) ont également montré qu'un prétraitement avec un inhibiteur de la voie de l'ET ou l'inactivation de la voie par mutation d'Etr1 qui code pour un récepteur de l'ET permet une augmentation de la résistance contre *V. dahliae* chez

la tomate (Robison et al., 2001b). La mutation *etr1* augmente aussi la résistance d'*A. thaliana* en réponse à *V. dahliae* (Fradin et al., 2011) et la mutation de l'homologue d'Ein2 augmente la résistance de *M. truncatula* contre *Va V31-2* (Ben et al., 2013).

La voie de l'ET induit la sénescence foliaire ce qui fait que les mutants *etr1* d'*A. thaliana* résistent beaucoup plus longtemps à la sénescence (Grbić and Bleecker, 1995). Il n'est donc pas étonnant de voir cette dualité du rôle de l'ET puisque le traitement active des mécanismes de résistance alors que la mutation ralentit la sénescence et donc le flétrissement foliaire. Les plantes déficientes en *Etr1* développent moins de chloroses et ont une biomasse plus importante comparées aux plantes de type sauvage. Les génomes de *V. dahliae* et *V. alfalfae* contiennent des gènes codant pour des "necrosis-and-ethylene-inducing factor" (NEP) (Klosterman et al., 2011). Les NEP sont des protéines qui provoquent l'induction de la voie de l'ET ainsi que des nécroses et du flétrissement chez les dicotylédones (Bae et al., 2006 ; Wang et al., 2004). L'ABA est aussi impliqué dans les mécanismes de sénescence (Lee et al., 2011) mais l'accumulation d'ABA provoque l'inactivation de la voie d'ET chez *A. thaliana* (Anderson et al., 2004) et l'inactivation (mutant) de la biosynthèse d'ABA provoque une accumulation d'ET chez le maïs (Spollen et al., 2000) et la tomate (Sharp et al., 2000). Le traitement exogène a donc un effet inhibiteur sur la voie d'ET. Comme dit précédemment l'inactivation de la voie d'ET augmente la résistance contre *V. dahliae* chez *A. thaliana* et *Va V31-2* chez *M. truncatula* (Fradin et al., 2011 ; Ben et al., 2013). En accord avec ces observations, Xu et Shi (2000) ont observé une hausse de la résistance à *V. dahliae* chez le coton suite à un traitement exogène avec l'ABA. On observe une hausse de la sensibilité chez les mutants d'*A. thaliana* affectés dans la voie de biosynthèse d'ABA en réponse *V. longisporum* (Häffner et al., 2010). Toutefois, il y a une différence entre la réponse à *V. dahliae* et *V. longisporum* chez *Arabidopsis*. En effet, Veronese et al. (2003b) ont observé une hausse de la résistance chez les mêmes mutants de biosynthèse d'ABA en réponse *V. dahliae*. Les mécanismes de résistance contre les pathogènes régulés par ABA sont complexes et encore peu compris. Le rôle de l'ABA peut stimuler la résistance ou augmenter la sensibilité selon le pathosystème étudié (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Toutefois, le traitement

exogène avec l'ABA induit la production de callose qui est impliquée dans les mécanismes de résistance contre *Verticillium* et *Fusarium* (Anderson et al., 2004 ; Anderson et al., 2004 ; Fradin et al., 2011).

D'après ces résultats l'ABA et le SA sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans la résistance contre *V. alfalfae* chez *M. truncatula*. La voie du SA permet l'induction de chitinases et la voie de l'ABA peut inhiber la voie de l'ET minimisant ainsi les effets des toxines NEP. Toutefois, il est encore impossible de savoir si ces molécules sont accumulées ou non en réponse à *V. alfalfae*. L'étude de leur rôle nécessite des études complémentaires biochimiques et génétiques.

III. Étude du transcriptome des lignées résistante et sensible inoculées avec *Va* V31-2 dans la phase précoce de l'infection

Au cours de l'interaction entre un pathogène et son hôte, il se crée une interface de dialogues moléculaires qui vont modifier l'expression du génome des deux partenaires. En effet, tandis que le pathogène met en place ses mécanismes de virulence, la plante répond en mettant en place différents mécanismes de défense (Jones and Dangl, 2006). Du côté de la plante, l'activation de voies de signalisation suite à la reconnaissance du pathogène va modifier l'expression d'un ensemble de gènes nécessaires pour la mise en place de la réponse appropriée (De Vos et al., 2005). Il a été estimé que l'expression de plus de 25 % des gènes d'*A. thaliana* serait modifiée au cours d'une interaction avec un pathogène. Ceci laisse penser que les signaux d'activation de la signalisation proviendraient de plusieurs récepteurs différents (Maleck et al., 2000 ; Tao et al., 2003). **L'interaction va donc avoir un effet important sur le transcriptome** (l'ensemble des transcrits de la plante), qui bascule d'un transcriptome dit "de base" à un transcriptome orienté vers la résistance ou la sensibilité. En comparant le transcriptome d'une lignée résistante à celui d'une lignée sensible on pourrait identifier des voies de signalisation, des facteurs de transcription et des gènes dont la modification de l'expression serait nécessaire dans la résistance ou la sensibilité. Contrairement aux puces à ADN qui ont un nombre limité de sondes, le séquençage est une approche sans *a priori* et permet d'évaluer l'ensemble des transcrits, ce qui peut mener à l'identification de nouveaux gènes. Nous avons donc décidé d'étudier la réponse de *M. truncatula* suite à l'inoculation avec *Va* V31-2 dans une interaction compatible et incompatible par une approche d'analyse transcriptomique. La méthode de séquençage choisie est la "massive analysis of cDNA ends" (MACE) (Zawada et al., 2014).

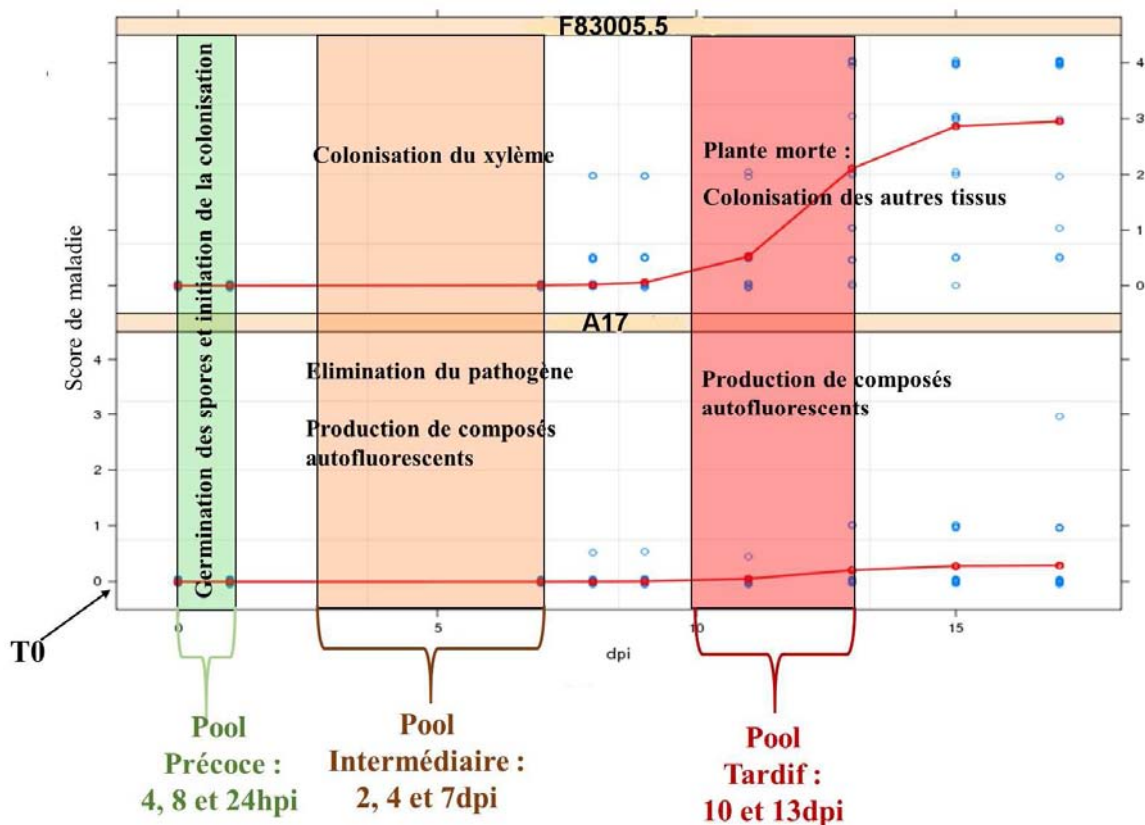


Figure III. 1 : Représentation schématisée du choix des pools d'ARN constitués pour le séquençage. Cinétique d'évolution des symptômes de flétrissement évalués sur une échelle de 0 à 4 au cours des 17 jours suivants l'inoculation (dpi) chez la lignée sensible F83005.5 (en haut) et la lignée résistante A17 (en bas). Les points bleus représentent les scores de maladie des plantes individuelles, la courbe rouge représente le score moyen. En plus du T0, trois pools ont été constitués, le pool précoce (4hpi, 8hpi et 1dpi), le pool intermédiaire (2dpi, 4dpi et 7dpi) et le pool tardif (10dpi et 13dpi).

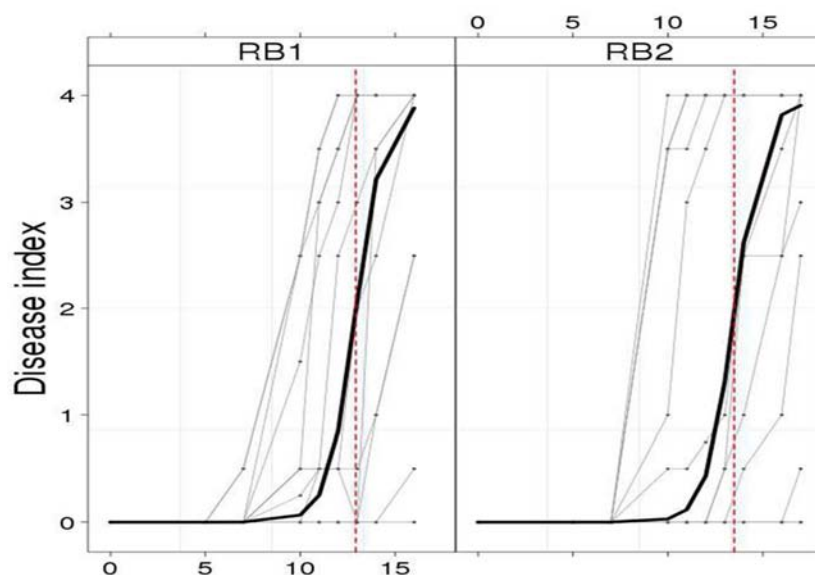


Figure III. 2 : Evolution des symptômes chez la lignée F83005.5 dans les deux répétitions biologiques (RB1, RB2) utilisées pour le séquençage. Les courbes de symptômes des plantes individuelles en gris ont été modélisées pour obtenir la courbe logistique (en noir). Le temps nécessaire pour atteindre 50% du score maximum de maladie (représenté par la ligne pointillée rouge) est de 13 jours dans la RB1 et 14 jours dans la RB2.

1. Choix du dispositif expérimental pour la caractérisation de la réponse de *M. truncatula* à *Va* V31-2

En premier lieu, l'étude de colonisation des lignées résistante A17 et sensible F83005.5 par *Va* V31-2 décrite dans le **chapitre I** des résultats nous a permis **d'identifier trois phases principales (Figure III. 1)**. Au cours de la phase dite précoce, qui s'étale du début de l'inoculation jusqu'à 2 dpi (days post-inoculation), les spores du pathogène germent et initient la colonisation des vaisseaux du xylème chez les deux lignées. Au cours de la deuxième phase, la phase intermédiaire, qui s'étale de 2 dpi à 7dpi, les différences entre la lignée résistante et la lignée sensible deviennent visibles. En effet, contrairement à la lignée sensible, la lignée résistante inhibe totalement la croissance du pathogène dans les vaisseaux du xylème et accumule des composés autofluorescents. Enfin, dans la phase tardive, le champignon sort du cylindre central et colonise les autres tissus de la lignée sensible qui montre alors des symptômes graves de flétrissement et de dessèchement. Nos observations indiquent donc que les mécanismes de défense sont mis en place dans la racine chez la lignée résistante A17. Nous avons donc décidé d'analyser le transcriptome racinaire.

Deux répétitions biologiques (RB) d'une cinétique d'infection ont été réalisées. L'analyse des courbes de symptômes (**Figure III. 2**) montre que les deux expériences sont très similaires. Les scores maximums des symptômes chez la lignée sensible, à la fin de l'expérience, sont identiques. On note tout de même un décalage d'un jour dans la vitesse d'évolution des symptômes, chez la lignée sensible : le temps nécessaire pour atteindre 50% du score maximum de maladie est de 13 jours dans la RB1 et 14 jours dans la RB2.

Les racines de plantes inoculées et non inoculées (Mock) ont été récoltées à différents temps: avant inoculation (T0) puis à 4hpi, 8hpi, 1dpi, 2dpi, 4dpi, 7dpi, 10dpi et 13dpi à raison de 6 racines par lignée et par condition. Par la suite, les ARN ont été quantifiés, et mélangés dans des rapports équimolaires pour former des pools qui représentent les trois phases de la colonisation (**Figure III. 1**): le pool précoce (qui regroupe les échantillons prélevés à 4hpi, 8hpi et 1dpi), le pool intermédiaire

Tableau III. 1 : Dispositif expérimental pour le séquençage MACE et comptage des séquences obtenues pour chaque banque.

| Lignée | RB | Temps de prélèvements | Condition | Librairie | Nombre total de séquences |
|----------|----------------|-----------------------|-------------------|--------------|---------------------------|
| A17 | RB1 | avant inoculation | non inoculée | T0_RB1 | 29.678.138 |
| | | 4, 8 et 24 hpi | non inoculée | P.E Mock_RB1 | 14.041.789 |
| | | 4, 8 et 24 hpi | inoculée | P.E Inoc_RB1 | 18.319.842 |
| | | 2, 4 et 7 dpi | non inoculée | P.I Mock_RB1 | 11.925.722 |
| | | 2, 4 et 7 dpi | inoculée | P.I Inoc_RB1 | 15.949.998 |
| | | 10 et 13 dpi | non inoculée | P.L Mock_RB1 | 15.748.201 |
| | | 11 et 13 dpi | inoculée | P.L Inoc_RB1 | 16.950.228 |
| | | RB2 | avant inoculation | non inoculée | T0_RB2 |
| | 4, 8 et 24 hpi | | non inoculée | P.E Mock_RB2 | 20.420.970 |
| | 4, 8 et 24 hpi | | inoculée | P.E Inoc_RB2 | 19.028.423 |
| | 2, 4 et 7 dpi | | non inoculée | P.I Mock_RB2 | 21.550.978 |
| | 2, 4 et 7 dpi | | inoculée | P.I Inoc_RB2 | 19.167.884 |
| | 10 et 13 dpi | | non inoculée | P.L Mock_RB2 | 20.508.989 |
| | 11 et 13 dpi | inoculée | P.L Inoc_RB2 | 21.659.548 | |
| F83005.5 | RB1 | avant inoculation | non inoculée | T0_RB1 | 17.631.886 |
| | | 4, 8 et 24 hpi | non inoculée | P.E Mock_RB1 | 20.5105.66 |
| | | 4, 8 et 24 hpi | inoculée | P.E Inoc_RB1 | 14.949.498 |
| | | 2, 4 et 7 dpi | non inoculée | P.I Mock_RB1 | 15.496.564 |
| | | 2, 4 et 7 dpi | inoculée | P.I Inoc_RB1 | 18.594.893 |
| | | 10 et 13 dpi | non inoculée | P.L Mock_RB1 | 18.339.171 |
| | | 11 et 13 dpi | inoculée | P.L Inoc_RB1 | 19.907.864 |
| | | RB2 | avant inoculation | non inoculée | T0_RB2 |
| | 4, 8 et 24 hpi | | non inoculée | P.E Mock_RB2 | 14.622.005 |
| | 4, 8 et 24 hpi | | inoculée | P.E Inoc_RB2 | 27.193.063 |
| | 2, 4 et 7 dpi | | non inoculée | P.I Mock_RB2 | 12.674.941 |
| | 2, 4 et 7 dpi | | inoculée | P.I Inoc_RB2 | 22.136.810 |
| | 10 et 13 dpi | | non inoculée | P.L Mock_RB2 | 13.312.513 |
| | 11 et 13 dpi | inoculée | P.L Inoc_RB2 | 21.312.482 | |

En orange les échantillons inoculés. T0, prélèvement effectué avant l'inoculation ; P.E, pool précoce ; P.I, pool intermédiaire ; P.L, pool tardif ; hpi, heures après inoculation ; dpi, jours après inoculation ; Mock, non inoculée ; Inoc, Inoculée ; RB, répétition biologique. En bleu, les échantillons analysés dans ce manuscrit.

(2dpi, 4dpi et 7dpi) et le pool tardif (10dpi et 13dpi). Les pools sont nommés respectivement Early, Intermediate et Late. Au total, nous avons 28 échantillons, soit 7 pools d'ARN par lignée, en deux répétitions biologiques (**Tableau III. 1**). Les échantillons d'ARN ont été envoyés à GenXpro GmbH (Francfort-sur-le-Main, Allemagne).

2. Principe de la méthode de Massive Analysis of cDNA Ends (MACE)

La méthode MACE a été mise au point par GenXpro GmbH pour répondre à plusieurs limitations rencontrées lors de l'analyse d'un transcriptome. Ces limitations sont directement liées au fait que le "métabolisme" des ARN messagers ne suit pas la loi "un gène, un transcrit, une protéine". En effet, une même séquence codante peut donner plusieurs transcrits différents et donc plusieurs protéines différentes. Cette diversité peut être causée par différents mécanismes tels que les promoteurs antisens (appelés NAT pour Natural antisense transcripts) ou encore la polyadénylation alternative (Modrek and Lee, 2002 ; Britto-Kido et al., 2013 ; Gupta et al., 2014). La méthode utilise les outils de séquençage habituels (Hiseq2000, Illumina) et le protocole intègre des étapes de préparation des ARNm qui font que seule la partie 3' du transcrit est séquencée (**Figure III. 3**). La partie 3' est la moins conservée d'un gène permettant ainsi de discriminer entre les gènes paralogues exprimés. Les ADNc produits sont coupés de façon aléatoire et les fragments sont fixés sur les billes de streptavidine portant des poly-T pour la purification. Chaque **transcrit est donc représenté par une seule séquence**.

Par rapport au RNAseq, on n'aura ici qu'un tag (bout de séquence) par ARNm. Etant donné que la majorité des gènes ont un niveau de transcription faible, on permet ainsi la détection de gènes à faible nombre de copies exprimées (Kahl et al., 2012). Cette méthode présente un bon rapport qualité/prix et une meilleure quantification comparée aux méthodes de "*RNA Sequencing*" habituelles. Cette méthode de séquençage a déjà été utilisée par d'autres équipes comme Zawada et al. (2014) pour l'étude des maladies chroniques des reins, Yakovlev et al. (2014) pour des travaux

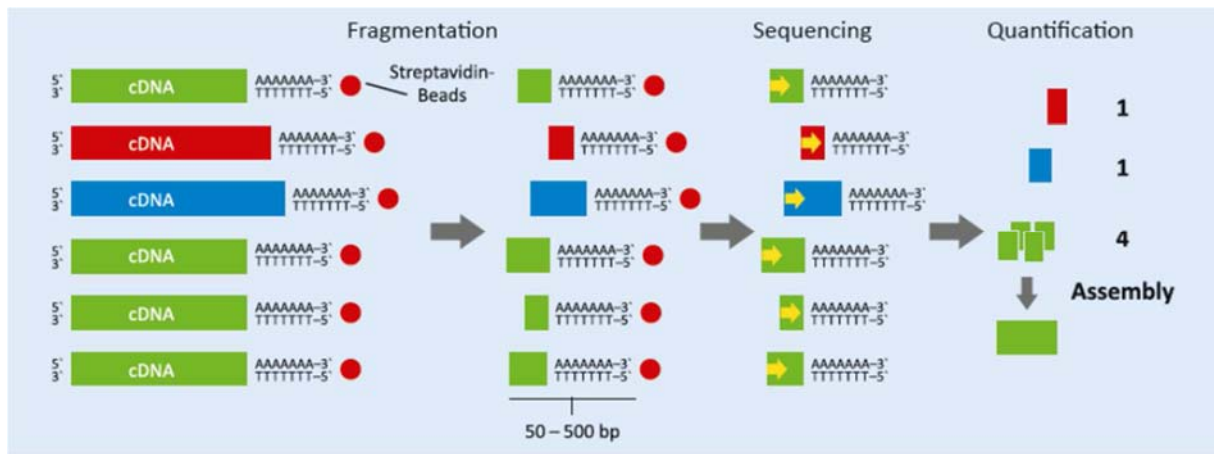


Figure III. 3 : Schéma de la MACE (Zawada et al., 2014). Après synthèse, les ADNc sont fixés sur une matrice de streptavidine grâce à la biotine. Les ADNc sont coupés en petits fragments de 50 à 500bp, et les fragments non fixés aux billes sont éliminés. Les ADNc fixés sont séquencés par séquençage à ultra-haut débit, en partant du site de coupure. Ainsi des “tags” de 50 à 500bp sont obtenus. Les “tags” fréquents peuvent être assemblés en contigs et annotés.

Tableau III. 2 : Annotation des contigs.

| Banque de données | Nombre de Gènes/CDS annotés dans les banques MACE | Gènes/CDS Total dans la banque de données |
|--|---|---|
| MedtrA17_3.5.assemblies.fasta | 26.700 | 62.633 |
| Mt3.5v5_GenesCDSSeq_20111014.fa | 33.851 | 64.123 |
| Mt3.5v5_GenesTranscriptSeq_20111014.fa | 24.208 | 64.123 |
| MTGI release 11 | 28.850 | 68.814 |
| NCBI_Entrez_NUCLEOTIDE_medicago.fasta | 29.201 | nd |
| Verticillium_albo-atrum_vams.102_1_contigs.fasta | 3.285 | nd |
| | 146.095 | |

L’annotation des 181.021 contigs a été réalisée en les alignant avec les séquences des 6 banques de données en utilisant Novoalign (<http://novocraft.com>). Cela a permis l’annotation de 146.097 contigs dont 3285 (2.25%) de *V. alfalfae*.

CDS : Coding Sequence.

nd, nombre total de séquences inconnu

sur la morphogenèse des embryons d'épicéa (*Picea abies*) et Fragkostefanakis et al. (2014) pour l'étude du rôle des protéines chaperones dans le contrôle de l'homéostasie protéique de la tomate en réponse aux stress biotiques et abiotiques.

3. Analyses globales des données de séquençage

La MACE a permis d'obtenir un total de 181.021 contigs différents (séquences obtenues par alignement de tags séquencés) dans les 28 banques sur la version V3.5 du génome de *Medicago truncatula*. Pour l'annotation, les contigs ont été comparés avec six bases de données de séquences (**Tableaux III. 2**). Ce processus a été réalisé en utilisant Novoalign (<http://novocraft.com>). Au total, 146.097 contigs ont été annotés soit 80,7% du nombre total des contigs et les séquences de *M. truncatula* représentent 142.810 (97,75%) des séquences identifiées et ceux de *V. alfalfae* VaMs.102 (2,25%).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons focalisé notre analyse sur **l'étude des réponses précoces de l'interaction entre Va V31-2 et *M. truncatula*** dans l'interaction compatible et incompatible. Les analyses portent donc sur les banques T0 et les pools précoces de la lignée sensible et résistante en conditions inoculée et non inoculée, et en 2 répétitions, ce qui fait en tout 6 banques par lignée. Pour les analyses statistiques, nous avons décidé de considérer uniquement les séquences qui s'alignent sur un seul gène, et dans le sens du gène prédit. 58.186 séquences différentes dans les 12 banques valident ces deux conditions. Après normalisation des données entre les différentes banques, nous avons choisi de faire les analyses avec les séquences comptant au minimum 5 CPM (Compte Par Million) dans au moins deux banques. En moyenne, les comptages minimums observés sont compris entre 30 et 50 CPM selon la librairie. Au final, 17.985 séquences ont été retenues chez A17 et 18.093 chez F83005.5 (**Figure III. 4**).

Nombre total de séquences annotées dans les 28 banques : 146.095

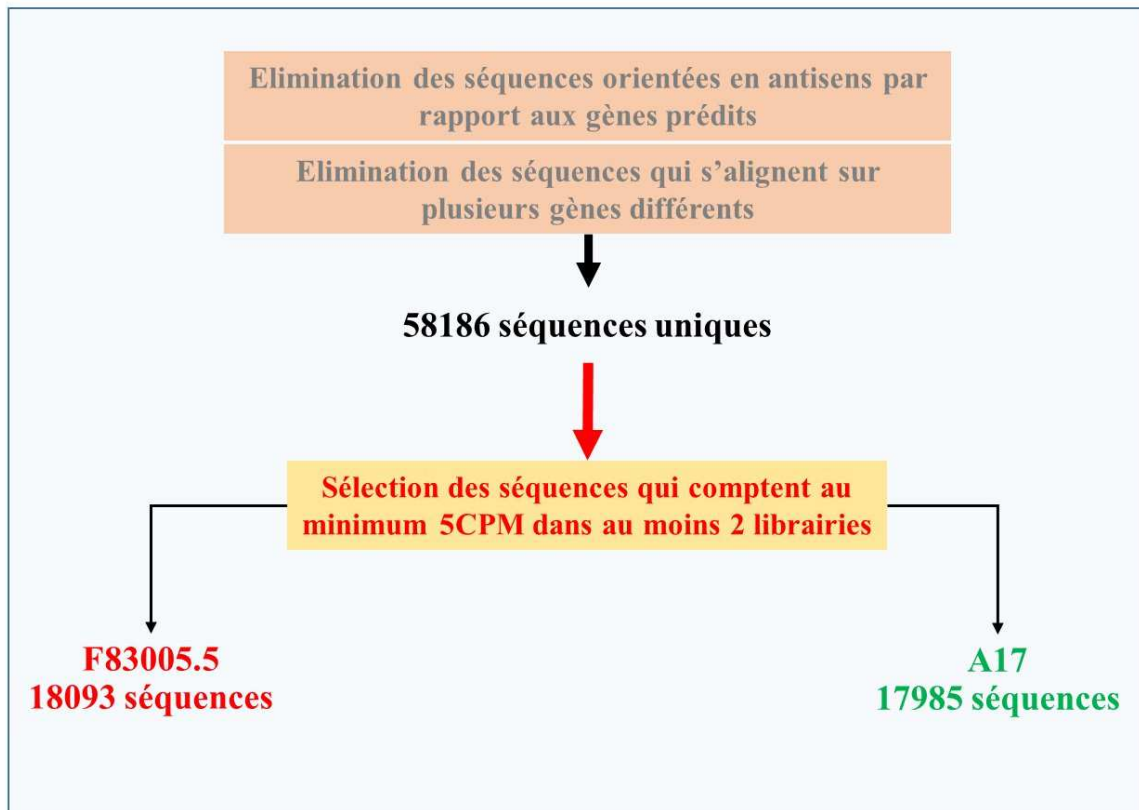


Figure III. 4 : Processus de sélection des séquences analysées. Le rectangle bleu correspond aux données des banques T0 et Pool Early Mock et inoculés.

CPM : Compte Par Million

4. Extraction des gènes différentiellement exprimés en réponse à *Va* V31-2 dans une interaction compatible et incompatible, par analyses statistiques

L'analyse d'un transcriptome a pour but d'évaluer le nombre de copies d'ARNm pour chaque gène d'un génome donné dans une condition donnée. On considère que le nombre de copies d'un ARNm G représente le niveau d'expression du gène G. Ainsi, en comparant le nombre de copies de l'ARNm G entre la condition contrôle et la condition inoculée comme dans notre cas, on peut connaître l'effet de l'inoculation sur l'expression du gène G dans ces deux lignées. Pour les analyses, nous avons considéré l'influence du temps (comparaison Early-Mock *vs.* T0), de l'inoculation (comparaison Early-inoculé *vs.* Early-Mock) et de l'environnement (comparaison RB1 *vs.* RB2) sur les transcriptomes des deux lignées. Ces différentes comparaisons ne sont pas mutuellement exclusives : par exemple, des gènes participant au développement de la plante peuvent également participer à la réponse à l'infection. Comparer les transcriptomes des deux lignées contrastées pour leur réponse à *Va* V31-2 nous permettra de repérer des modifications de l'activité cellulaire en réponse à *V. alfalfae* associées à la résistance ou la sensibilité. Ces modifications sont représentées par des gènes qui vont être différentiellement exprimés (DEGs pour differentially expressed genes) entre deux conditions.

L'identification de DEGs par un modèle linéaire généralisé (voir Matériels et Méthodes, page ?) indique que les transcriptomes des deux lignées sont modifiés en réponse au temps (Early-Mock *vs.* T0), à l'inoculation par *Va* V31-2 (Early-inoculé *vs.* Early-Mock) et entre les deux répétitions RB. Les diagrammes de Venn de la **Figure III. 5** illustrent pour chacune des lignées, la répartition du nombre de DEGs pour ces trois effets.

La comparaison (Early-Mock *vs.* T0) montre que 765 (4,2%) et 2118 (11,7%) gènes répondent différentiellement en réponse au développement chez A17 et F83005.5 respectivement.

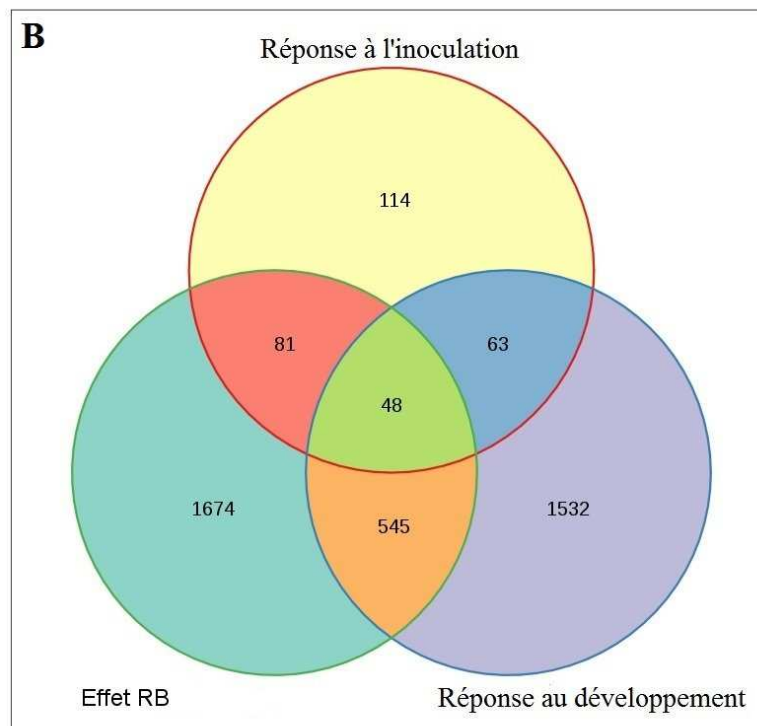
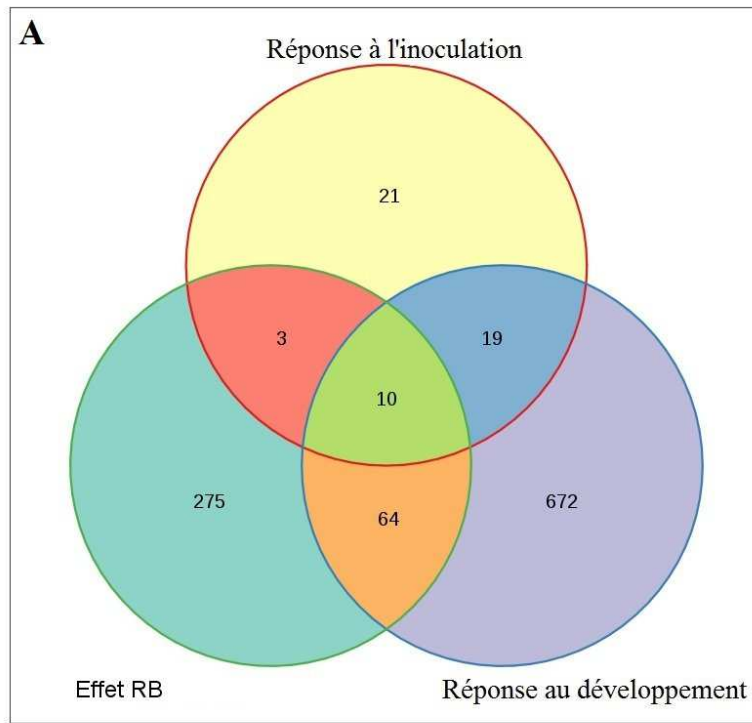


Figure III. 5 : Diagrammes de Venn montrant les gènes différentiellement exprimés en réponse au développement, à l'inoculation et entre les deux répétitions biologiques (RB) chez les deux lignées. Dans nos analyses, un gène est exprimé différentiellement si la *p-value* est inférieure à 0,001. A) Lignée A17 ; B) Lignée F83005.5.

Chez A17, 53 gènes s'expriment différemment en réponse à l'inoculation. Parmi ces gènes, 21 répondent spécifiquement à l'inoculation et 19 répondent aussi au développement. Dans la liste de ces gènes en annexe, on peut voir que 40 gènes sont induits et 13 sont réprimés (**Tableau S. 1**).

Chez F83005.5, 306 gènes répondent différemment en réponse à l'inoculation dont 114 répondent spécifiquement à l'inoculation et 63 répondent aussi au développement. Parmi les 306 gènes, 139 sont induits et 167 sont réprimés (**Tableau S. 2**).

Des séquences de *V. alfalfae* sont présentes dans les deux lignées inoculées (**Tableau III. 14**). On trouve 4 séquences de *V. alfalfae* chez F83005.5. Ces 4 séquences sont parmi les 7 qui sont présentes chez A17.

Pour certains gènes de *M. truncatula*, les identifiants fournis par GenXpro GmbH ne nous ont pas permis d'identifier les banques de données de séquences d'origine utilisées pour les annoter. Il y en a 2 chez A17 et 16 chez F83005.5 soit respectivement, 3,7 et 5,2% des gènes. Ces séquences qui représentent une petite proportion par rapport au nombre total ne sont pas incluses dans les analyses.

La comparaison entre les deux répétitions biologiques révèle que 352 gènes répondent différemment chez A17 et 2188 chez F83005.5 (**Figure II. 5**). On peut aussi voir que parmi ces gènes qui sont sujets aux variations environnementales, certains pourraient participer à la réponse de défense ou de développement.

En analysant l'influence de l'environnement sur les gènes qui répondent à l'inoculation, on trouve que 24% sont affectés chez A17 et 42% chez F83005.5. En observant cet effet sur les gènes qui répondent au développement, on trouve que 9% seulement sont affectés chez A17 tandis que 27% sont affectés chez la lignée F83005.5. L'environnement a donc plus d'effet sur la réponse à l'inoculation que sur la réponse liée au développement. Cela est en accord avec le fait que les

Tableau III. 3 : Comparaison des données d'expression de 24 gènes de *M. truncatula* obtenues avec le séquençage MACE et avec la qRT-PCR.

| A17 Jemalong | | | |
|----------------------|---|--------------------|----------------|
| Gène ID Mt3.5 | Annotation | Fold change | |
| | | MACE | qRT-PCR |
| Medtr2g035440.1 | Haloacid dehalogenaselike hydrolase domain containing protein | 4,41 | 3,5 |
| Medtr3g089970.1 | Alcohol dehydrogenase | 3,91 | 11,01 |
| TC183087 | Dreg2 like protein | 3,84 | 1,17 |
| Medtr7g016700.1 | Chalcone synthase | 2,74 | 2,16 |
| TC175803 | Isoflavone synthase 1 | 2,74 | 2,55 |
| Medtr2g099470.1 | Endochitinase PR4 | 2,54 | 2,22 |
| Medtr8g022300.1 | hypothetical protein | -2,6 | -2,8 |
| Medtr5g089580.1 | hypothetical protein | -3,06 | -2,21 |
| Medtr2g101370.1 | Aquaporin | -3,81 | -2,47 |
| TC191486 | Fbox protein AtFBL5 | -4,12 | -4,68 |
| contig_70372_1 | Defensin-like protein | -5,41 | -7,14 |

| F830035.5 | | | |
|----------------------|--|--------------------|----------------|
| Gène ID Mt3.5 | Annotation | Fold change | |
| | | MACE | qRT-PCR |
| contig_240964_1.1 | Wound induced protein | 4,67 | 5,96 |
| Medtr8g018570.1 | Lipoxygenase | 3,75 | 2,18 |
| contig_83034 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase | 2,77 | 2,46 |
| Medtr1g083950.1 | Universal stress protein A-like protein | 2,71 | 2,56 |
| Medtr4g126920.1 | Xyloglucan endotransglucosylasehydrolase | 2,29 | 1,43 |
| TC179073 | jasmonate zim-domain protein | 2,17 | 1,46 |
| TC197452 | Galactose-binding like | -1,62 | -1,87 |
| contig_55783 | E3 ubiquitinprotein ligase sina | -2 | -1,99 |
| Medtr4g021260.1 | Avr9Cf9 | -2,35 | -2,59 |
| TC176982 | glutathione s- amino-terminal domain protein | -2,69 | -4,99 |
| Medtr5g040430.1 | Glutathione Stransferase | -2,86 | -2,22 |
| Medtr3g047140.1 | Lectin | -5,58 | -2,34 |
| contig_73988_1.1 | RING finger family protein | -4,46 | -2,95 |

Différences d'expression de gènes entre les conditions inoculées et les conditions contrôles déterminées par deux méthodes différentes, MACE et qRT-PCR. Des gènes qui sont différentiellement exprimés ont été sélectionnés chez les 2 lignées. Pour la qRT-PCR, de nouveaux pools ont été reconstitués à partir des ARN conservés à -80°C. Le "Fold change" représente la moyenne du facteur d'induction ou de repression calculé avec la méthode $e^{-2\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). La comparaison des folds obtenus entre les deux méthodes a été réalisée en calculant le coefficient de corrélation de Pearson ($r = 0,868$) (Postnikova et al., 2013).

plantes sont cultivées dans un environnement contrôlé et qu'il y a un décalage d'un jour sur la vitesse de développement des symptômes entre les deux répétitions biologiques.

Au final, il y a 48 gènes qui sont influencés par les trois facteurs à la fois chez F83005.5 et 10 chez A17. Pour toutes ces comparaisons, il y a plus de gènes dont l'expression est modifiée chez la lignée F83005.5 que chez A17. Il y a donc un effet dû au génotype pour la réponse à l'environnement, à l'infection et au développement qui fait que l'expression des gènes est plus stable chez A17 que chez F83005.5 dans nos conditions expérimentales.

5. Validation de la méthode MACE par qRT-PCR

Afin de valider les données d'expression obtenues par l'analyse transcriptomique, **24 DEGs** (11 chez A17 et 13 chez F83005.5) répondant spécifiquement à l'inoculation ont été sélectionnés pour déterminer les niveaux d'expression par qRT-PCR. Les 24 gènes choisis font partie de quatre groupes qui sont basés sur le niveau d'expression : très induits, modérément induits, modérément réprimés et très réprimés. Pour cela, des pools d'ADNc ont été reconstitués à partir des ARN conservés à -80°C. Nous avons comparé pour un même gène le fold change (facteur d'induction ou de répression) obtenu par l'analyse des données du transcriptome avec celui obtenu par qRT-PCR en calculant les coefficients de corrélation de Pearson (coef. Cor = 0,868 ; Postnikova et al., 2013). Les deux résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les niveaux d'expression obtenus par les analyses transcriptomiques et par qRT-PCR (**Tableau III. 3**). Ces résultats permettent de valider le patron d'expression des gènes de notre analyse transcriptomique.

6. Annotation fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés en réponse à l'infection chez A17 et F83005.5.

Dans le but d'identifier des classes de gènes particulièrement affectées par l'infection, nous avons sélectionné tous les gènes de *M. truncatula* répondant différentiellement à l'inoculation pour les classer dans des catégories fonctionnelles en utilisant le logiciel **MAPMAN** (Thimm et al., 2004 ; <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>). Dans la liste d'A17, il y a 53 gènes qui répondent différentiellement à l'inoculation dont 7 de *V. alfalfae* et 2 séquences dont nous n'avons pas pu identifier les banques de données de séquences d'origine. Chez F83005.5, il y a 302 gènes qui répondent différentiellement à l'inoculation dont 4 de *V. alfalfae* et 16 séquences dont nous n'avons pas pu identifier leur origine. Cela représente au final 44 gènes pour la lignée A17 et 282 gènes pour la lignée F83005.5 à annoter.

Le logiciel MapMan (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>) est un outil qui a été mis au point initialement pour l'analyse des puces à ADN d'*A. thaliana* afin de classer les gènes dans 34 catégories fonctionnelles hiérarchiques (exemple, processus métabolique, métabolisme des acides aminés, réponse aux stress biotiques) d'après leurs annotations sur la base de données TAIR10 (The Arabidopsis Information Resource). Depuis, le système a été adapté pour d'autres plantes telles que le maïs (Doehlemann et al., 2008), la tomate (Urbanczyk-Wochniak et al., 2006), la pomme de terre (Rotter et al., 2007) et *M. truncatula* (Tellström et al., 2007).

Etant donné que l'annotation des séquences a été faite sur plusieurs banques de données différentes, il a fallu réaliser des annotations manuelles sur les gènes qui sont absents du fichier mapping de *M. truncatula* utilisés pour le MapMan (Mt_Mt3.5_v3_0411). Cette étape a été réalisée grâce à la banque de donnée gabiPD (<https://www.gabipd.org/>) qui permet d'obtenir les codes BIN (codes d'ontologie) à partir de l'annotation du gène.

Le résultat obtenu par MapMan se traduit par une représentation schématisée des voies métaboliques et autres processus biologiques, dans laquelle chaque gène étudié est représenté par

un petit carré dont la couleur dépend de l'intensité de variation de son expression entre les conditions d'étude comparées. Cette répartition des gènes permet de mettre en évidence plus facilement leurs fonctions biologiques. **Pour les deux lignées**, on voit que les gènes qui répondent à l'infection sont essentiellement répartis dans les voies " Biotic stress overview" et "Secondary metabolite". La **Figure III. 6** montre que parmi les fonctions cellulaires affectées dans la réponse aux stress biotiques dans les deux lignées, on trouve des gènes impliqués dans l'état redox, la signalisation, le métabolisme de la paroi et le métabolisme secondaire.

Chez la lignée sensible, on observe que plusieurs catégories fonctionnelles comme "cell wall", "Proteolysis", ou encore "Redox state" renferment des gènes qui sont induits et d'autres réprimés. On trouve plusieurs gènes impliqués dans la signalisation hormonale telle que la voie de signalisation de SA, d'ET, de JA et de l'auxine (**Figure III. 6 B**). On voit aussi que les gènes impliqués dans la voie de SA sont réprimés. Ces gènes sont *SABP2* (salicylic acid-binding protein 2, TC197452) codant pour un récepteur de SA (Kumar and Klessig, 2003) et un autre codant pour une glutathione S-transferase (TC176982) et qui est régulé par la voie de SA (Uquillas et al., 2004). Le gène identifié comme étant impliqué dans la signalisation au stress biotique (au centre de la figure) code pour une protéine de résistance de la famille des MLO (*mildew resistance locus o*). Ces protéines sont impliquées dans la résistance contre le Mildiou en empêchant l'entrée du champignon dans les cellules (Consonni et al., 2006). D'autres gènes de défense, des PR-protéines, sont aussi induits.

Chez la lignée résistante, on trouve essentiellement des gènes qui sont induits dont la majorité est impliquée dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques dont des chalcone synthases, des isoflavone synthase et des protéines de résistance de la famille des PR10. La **Figures III. 7** montre les gènes impliqués spécifiquement dans le métabolisme secondaire chez les deux lignées. On peut noter de façon générale une plus forte intensité au niveau de l'expression des gènes chez la lignée A17 comparée à la lignée F83005.5. Parmi les voies représentées, on compte la voie des flavonoïdes, la voie des phénylpropanoïdes, des lignanes ou encore des isoflavonoïdes. On peut aussi noter que plus de voies sont représentées chez la lignée sensible. Toutefois, il faut garder en mémoire que chez

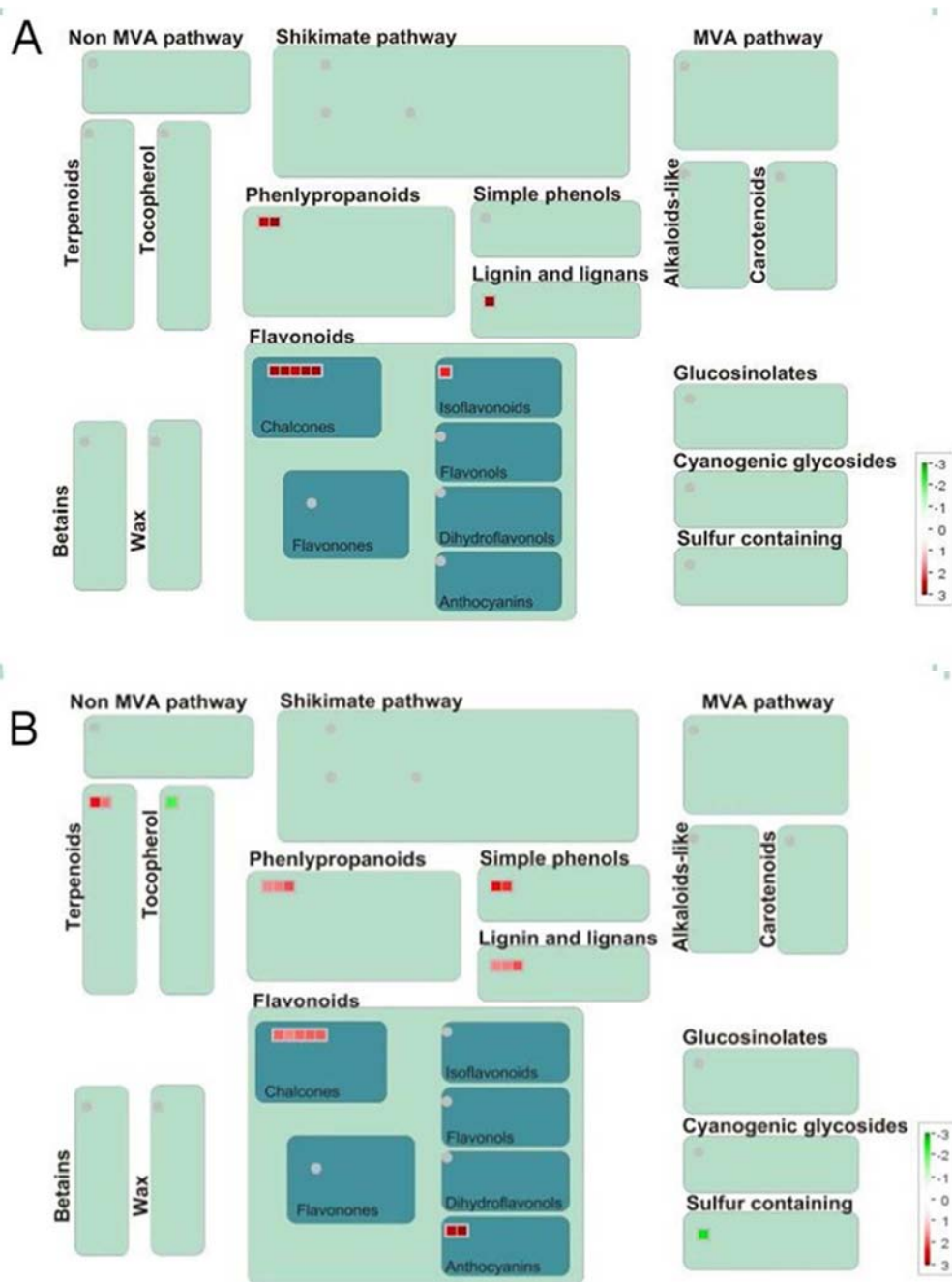
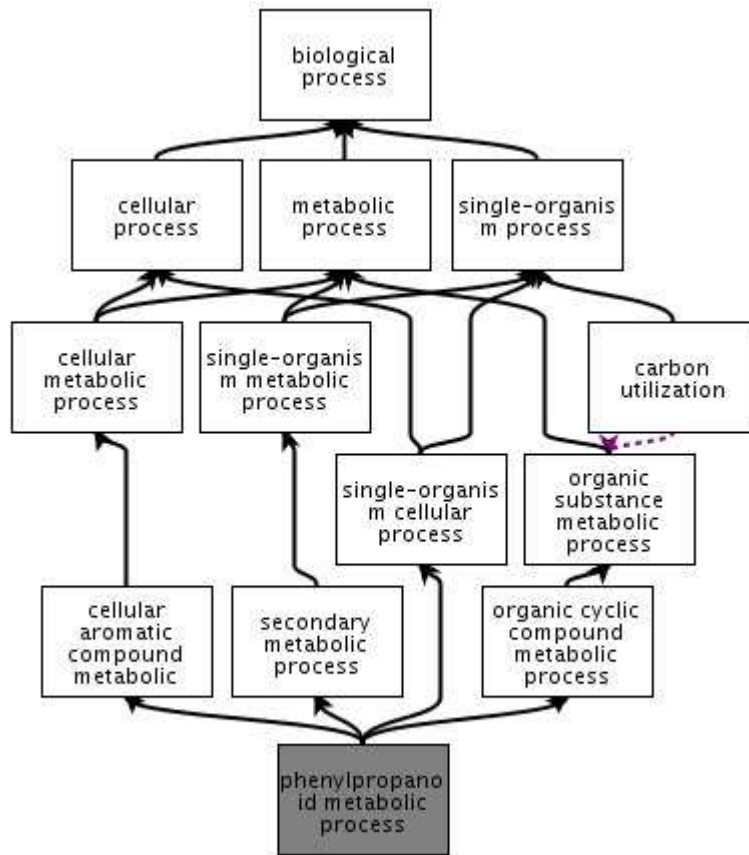


Figure III. 7. Visualisation des gènes impliqués dans la voie "secondary metabolism overview" s'exprimant différemment en réponse à l'inoculation. Présentation réalisée avec le logiciel MapMan. Chaque gène est représenté par un carré, dont la couleur dépend du niveau d'expression. Les gènes induits sont représentés en rouge et ceux réprimés en vert ; l'échelle à droite indique le fold (facteur d'induction ou de répression). A) la lignée A17 (résistante). B) la lignée F83005.5 (sensible).

la lignée F83005.5, on a six fois plus de DEGs que chez A17. Il faut prendre ces résultats avec précaution car 15 % des gènes qui s'expriment différemment chez la lignée sensible et 17 % de ceux de la lignée résistante ne sont pas classés dans une catégorie fonctionnelle. Le MapMan ne nous permet donc pas d'avoir une représentation exhaustive des données. Nous avons alors décidé de compléter nos analyses avec des annotations de Gene Ontology (GO) pour identifier les fonctions biologiques les plus représentées dans les gènes qui s'expriment différemment en réponse à l'inoculation.

7. Identification de voies métaboliques impliquées dans la résistance ou la sensibilité grâce à l'annotation GO.

L'annotation GO renferme une variété de concepts nommés "GO terms" qui sont classés par niveau hiérarchique, (du plus général désigné comme terme « parent » aux termes plus précis, les termes « fils ») et connectés les uns aux autres par leurs relations fonctionnelles (**Figure III. 8**). Même si les relations ('est un' ou 'fait partie de') entre deux termes d'ontologie sont conservées entre l'annotation GO et l'annotation du MapMAN, la structure ontologique de ces deux méthodes d'analyse est différente. Dans l'annotation GO, il y a **trois grandes catégories de termes indépendantes à savoir la fonction moléculaire, le processus biologique et le compartiment cellulaire**. Ces trois groupes d'ontologie sont de type acyclique, ce qui est différent de la classification hiérarchique sous forme d'arbre du MapMan. En effet, contrairement à l'annotation par le MapMan dans laquelle un terme BIN (terme d'ontologie utilisé dans la classification de MapMan) ne peut avoir qu'un seul parent, un GO terme "fils" peut avoir plus d'un parent. Par exemple (**Figure III. 8**), le terme GO "phenylpropanoid metabolic process" appartient aux termes parents "cellular process", "metabolic process" ou encore "organic substance metabolic process". Par conséquent, les annotations GO donnent une meilleure vision des interactions entre les processus biologiques.



QuickGO - <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

Figure III. 8 : Organisation en graphique acyclique dirigé de la classification Gene Ontology (GO) GO:0009698 (phenylpropanoïd metabolic process). Diagramme orienté du haut (terme parent, terme général) vers le bas (terme fils, terme précis). Les flèches en noir indiquent une appartenance aux termes parents. La flèche violette indique que le terme a une part dans le terme indiqué (ici organic substance metabolic process).

Pour faciliter nos interprétations, nous avons (a) cherché à savoir s'il existe une voie de réponse commune entre les deux lignées en comparant les identifiants des gènes qui s'expriment différemment en réponse à l'inoculation chez A17 (**Tableau S. 1**) avec ceux de la lignée F83005.5 (**Tableau S. 2**). Nous avons (b) comparé les fonctions biologiques activées entre les deux lignées en analysant uniquement les gènes induits dans chaque lignée. Comme nous avons vu d'après les résultats du MapMan que, dans une même catégorie fonctionnelle, nous avons à la fois des gènes qui sont induits et d'autres qui sont réprimés chez la lignée F83005.5, nous avons (c) comparé les fonctions biologiques surreprésentées dans les gènes induits avec les fonctions biologiques surreprésentées dans les gènes sous-exprimés. L'analyse des termes GO enrichis a été réalisée grâce à agriGO (Du et al., 2010).

- a) Principales classes GO au sein des gènes répondant à l'inoculation chez les lignées sensible et résistante

Les annotations GO ont été réalisées grâce au **logiciel Blast2GO** (Conesa and Götz, 2008). Elles se font en plusieurs étapes qui commencent par un Blastx, suivi d'une recherche de motifs IPS (InterProScan) par InterProScan (Jones et al., 2014).

Pour la lignée A17, 35 (79,5%) gènes sur 44 DEGs ont été annotés. Les fonctions biologiques (de niveau 4) majoritaires sont "cellular biosynthetic process" (9%), "oxydoreduction process" (9%) et "cellular aromatic compound metabolic process" (9%) (**Figure S. 1**). Les fonctions moléculaires les plus représentées sont "cation binding" (7%), "transferase activity, transferring acyl group" (4%) et "oxidoreductase activity, action on CH-OH donors" (4%).

Pour la lignée F83005.5, sur les 291 gènes qui s'expriment différemment en réponse à l'inoculation chez F83005.5, 254 ont été annotés (87,2%). Parmi les fonctions biologiques majoritaires, sont "oxydoreduction process" (36,4%), "regulation of transcription, DNA binding" (18,4%) et "defense response" (10,9%) (**Figure S. 2**). Les fonctions moléculaires les plus représentées

Tableau III. 4 : Processus biologiques (P) et moléculaires (F) associés aux gènes répondant à l'inoculation de façon similaire dans les deux lignées

| Gène | Annotation | Fold A17 | Fold F83005.5 | GO - Group | Terme GO |
|-------------------|--|----------|---------------|------------|--------------------------------------|
| contig_64564_1.1 | myb sant-like dna-binding domain protein | 7,3 | 4,52 | P | regulation of cellular process |
| Medtr7g086320.1 | hypothetical protein MTR_7g086320 | 5,84 | 5,56 | | |
| Medtr5g022390.1 | rhodanese-related sulfurtransferase | 4,68 | 2,65 | F | transferase activity |
| Medtr1g097910.1 | chalcone synthase | 4,25 | 1,7 | P | flavonoid biosynthetic process |
| TC187179 | alcohol dehydrogenase | 4,21 | 2,34 | P | oxidation-reduction process |
| contig_240964_1.1 | wound-responsive family protein | 3,85 | 4,67 | | |
| Medtr1g098140.1 | chalcone synthase | 3,71 | 1,9 | P | flavonoid biosynthetic process |
| Medtr1g083950.1 | universal stress protein a-like protein | 3,55 | 2,71 | | |
| TC194155 | chalcone synthase | 3,19 | 1,95 | P | flavonoid biosynthetic process |
| Medtr7g055630.1 | ankyrin repeat protein | 2,71 | 1,66 | | |
| Medtr5g022380.1 | nodulin family protein | 2,46 | 2,98 | P | response to karrikin |
| TC196800 | hypothetical protein | 2,4 | 2,27 | P | anaerobic respiration |
| Medtr8g078170.1 | coiled-coil domain-containing protein | -2,32 | -1,64 | | |
| Medtr8g022300.1 | dormancy auxin associated protein | -2,6 | -2,45 | | |
| Medtr2g096120.1 | uncharacterized loc101218723 | -2,65 | -3,55 | | |
| contig_167649_1.1 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha | -2,74 | -4,92 | P | oxidation-reduction process |
| TC176640 | dormancy auxin associated protein | -3,75 | -3,35 | P | response to brassinosteroid stimulus |
| TC191486 | f-box protein skp2a | -4,13 | -4,14 | | |
| contig_70372_1.1 | defensin-like protein | -5,42 | -3,45 | P | response to stress |

Les fold sont indiqués selon un code couleur. Les gènes induits sont notés en rouge et ceux qui sont réprimés en vert.

sont "cation binding" (44%), "anion binding" (19%), "nucleoside acid binding" (18%). Existence d'une réponse commune entre la lignée résistante et la lignée inoculée par Va V31-2.

La comparaison entre les identifiants présents dans les gènes de *M. truncatula* qui répondent à l'inoculation chez les lignées A17 et F83005.5 montre qu'il y a au total 19 gènes en communs (**Tableau III. 4**). On note que ces gènes présentent aussi les mêmes profils d'expression en termes d'induction ou répression entre les deux lignées. Parmi les gènes induits, on trouve 3 gènes codant pour des chalcone synthases. Celles-ci sont impliquées dans le métabolisme secondaire.

Parmi les fonctions biologiques représentées dans ces gènes, on trouve "flavonoid biosynthetic process" et "oxidation-reduction process" ou encore "response to brassinosteroid stimulus". Pour ce qui est de la fonction moléculaire, il y a surtout "naringenin-chalcone synthase activity". D'après ces résultats, on peut dire qu'il existe une voie de signalisation commune entre les deux lignées qui ne concerne pas uniquement l'induction de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire ou le stress oxydatif comme c'était indiqué par les résultats du MapMan.

b) Comparaison des termes GO enrichis dans les gènes induits dans chaque lignée

Une analyse d'enrichissement des termes GO en utilisant AgriGO (Du et al., 2010) a été réalisée sur les gènes induits en réponse à l'inoculation chez A17 (31 gènes) et chez F83005.5 (135 gènes) dans le but de comparer les fonctions biologiques surreprésentées entre les deux lignées.

Pour la lignée A17, les résultats montrent que ces gènes sont essentiellement répartis dans 2 fonctions biologiques à savoir "metabolic process" et "response to stimulus" (**Figure III. 9**). Dans le "metabolic process" on note surtout "secondary metabolism" (p-value = 0.00019) et "cellular amino acid derivative biosynthetic process" (p-value = 0.00016), et dans "response to stimulus", la "response to biotic stimuli" (p-value = 0.00016) dont "defense response" (p-value = 0,01),

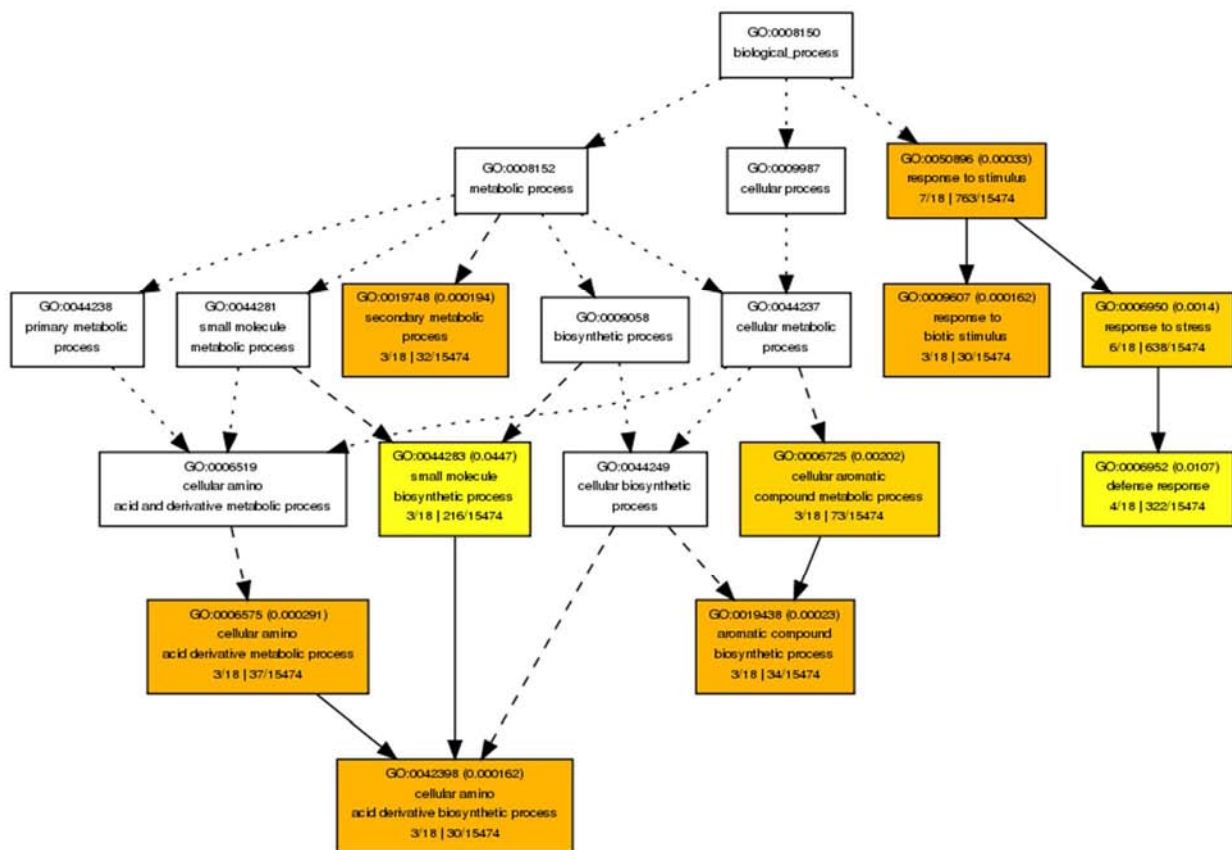


Figure III. 9 : Analyse d'enrichissement des termes GO associés à des fonctions biologiques dans les gènes induits chez A17 (résistante) en réponse à l'inoculation. Chaque rectangle représente un terme avec le nom, le numéro de GO et la p-value entre parenthèses. (3/18|30/15474) : les deux premiers chiffres représentent le nombre de gènes dans la liste analysée qui sont associés au terme par rapport au nombre total de termes différents identifiés dans la liste analysée | les deux derniers chiffres représentent le nombre de gènes associés à ce terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula* (utilisée comme référence) par rapport au nombre total de gènes qui sont associés à un terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula*. Les probabilités ont été calculées avec agriGO en utilisant la méthode de Fisher, ajustée avec la méthode de Bonferroni. La couleur du rectangle indique le niveau de significativité : jaune p-value ≤ 0.05 ; orange p-value ≤ E-05 et rouge p-value ≤ E-09.

Tableau III. 6 : Annotations des gènes de réponse aux stress biotiques spécifiquement induits dans la lignée A17 (résistante) et F83005.5 (sensible).

| Lignée | Gène | Annotation fonctionnelle |
|-----------------|------------------------|--|
| A17 | IMGA Medtr4g120860.1 | Bet v1 |
| | TC185805 | Bet v1 |
| | TC194357 | Bet v1 |
| | IMGA Medtr2g099470.1 | endochitinase pr4-like |
| F83005.5 | IMGA Medtr7g009710.1 | 2-aminoethanethiol dioxygenase-like |
| | IMGA Medtr3g009050.1 | leucine-rich repeat family protein |
| | IMGA Medtr1g061640.1 | myb sant-like dna-binding domain protein |
| | IMGA contig_105546_1.1 | calcium-binding protein cml38 |
| | IMGA Medtr4g079140.1 | mlo-like protein 12-like |

Chez F83005.5, les résultats montrent que les gènes induits sont répartis dans les deux mêmes termes parents que pour A17 à savoir "metabolic process" et "response to stimulus" (**Figure III. 10**). Dans le "metabolic process", il y a entre autres "secondary metabolic process" (p-value = $6,9e-14$), "cellular amino acid derivative biosynthetic process" (p-value = $2,2e-13$), "oxygen and reactive oxygen species metabolic process" (p-value = $1,9e-08$) et "glycoside metabolic process" (p-value = $2,3e-5$). En ce qui concerne "response to stimulus" (p-value = $3,2e-5$), on y trouve "response to biotic stimulus" (p-value = $3,2e-5$) et "response to organic substance" (p-value = $2,3e-5$).

D'après ces analyses, en réponse à l'inoculation, les deux lignées induisent des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, le métabolisme secondaire et la réponse aux stress biotiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le MapMan. En revanche, seule la lignée résistante induit des gènes impliqués dans la défense alors que la lignée sensible induit spécifiquement des gènes impliqués dans la production d'espèces réactives d'oxygène.

Dans les gènes annotés "biotic stress" (**Tableau III. 6**), **chez A17**, on trouve 3 gènes codant pour des Bet v1 (des homologues des PR10 ; Breiteneder et al., 1989) et un gène pour une PR4 tandis que **chez F83005.5** les gènes codent pour des protéines impliquées dans les cascades de transduction (calcium-binding protein cml38 et leucine-rich repeat family protein), la transcription (myb sant-like dna-binding domain protein), le métabolisme des peroxydases (2-aminoethanethiol dioxygenase-like) et la résistance contre le mildiou (mlo-like protein 12-like).

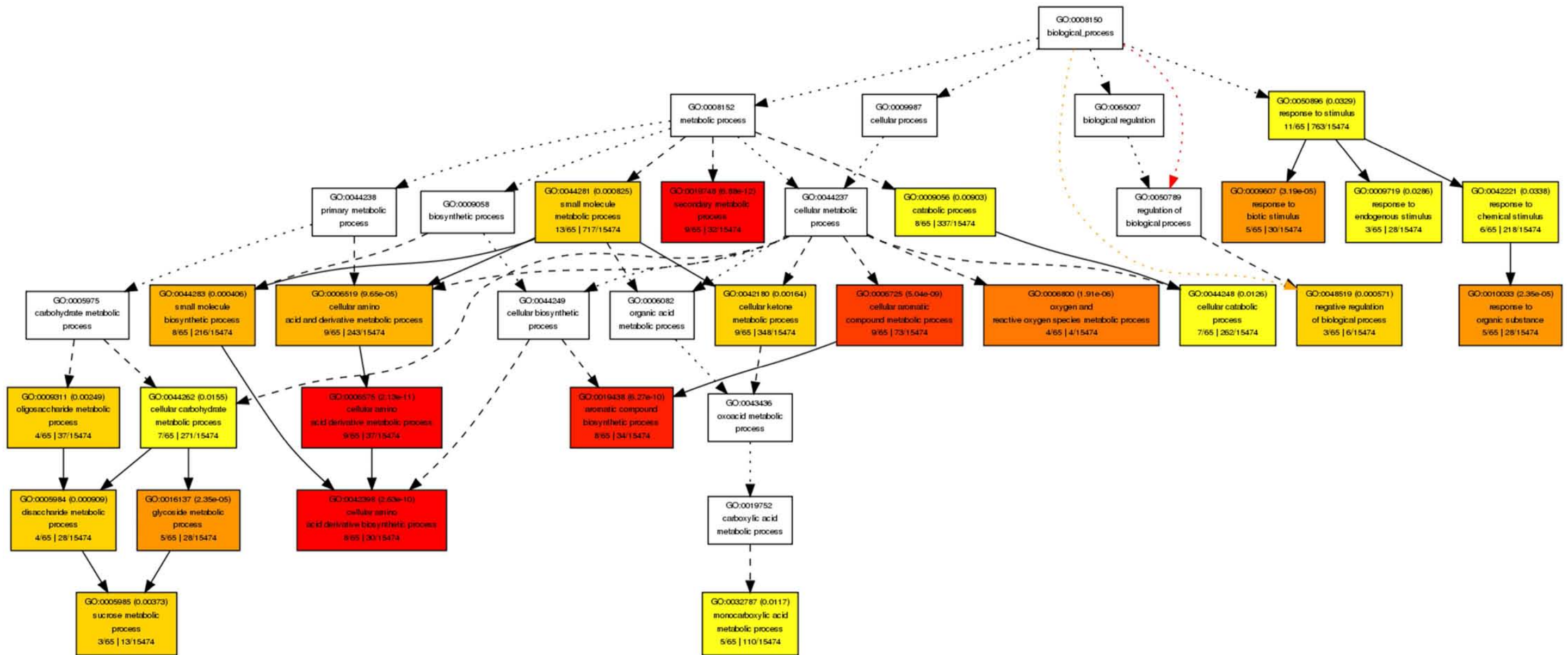


Figure III. 10 : Analyse d'enrichissement des termes GO associés à des fonctions biologiques dans les gènes induits chez F83005.5 (sensible) en réponse à l'inoculation. Chaque rectangle représente un terme avec le nom, le numéro de GO et la p-value entre parenthèses. (3/18|30/1547) : les deux premiers chiffres représentent le nombre de gènes dans la liste analysée qui sont associés au terme par rapport au nombre total de termes différents identifiés dans la liste analysée | les deux derniers chiffres représentent le nombre de gènes associés à ce terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula* (utilisée comme référence) par rapport au nombre total de gènes qui sont associés à un terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula*. Les probabilités ont été calculées avec agriGO en utilisant la méthode de Fisher, ajustée avec la méthode de Bonferroni. La couleur du rectangle indique le niveau de significativité : jaune p-value ≤ 0.05 ; orange p-value ≤ E-05 et rouge p-value ≤ E-09.

c) Les mécanismes de défense sont inhibés chez la lignée sensible.

Les résultats de MapMan concernant les gènes répondant à l'inoculation chez la lignée sensible semblaient indiquer que pour une même fonction biologique, on trouve des gènes induits et des gènes réprimés, ces derniers laissant supposer une induction partielle et inefficace des réponses ou une inhibition de la plante suite à l'infection. Pour savoir si ce phénomène touche les gènes impliqués dans des fonctions importantes pour la défense, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement des termes GO sur 150 gènes réprimés chez la lignée F83005.5 en réponse à l'inoculation.

Les résultats montrent que ces gènes sont répartis dans 3 termes biologiques parents (**Figure III. 11**) à savoir "metabolic process" (p-value = $2,5e-06$), "biological regulation" (p-value = $3,6e-5$) et "response to stimulus" (p-value = $6,2e-16$). Le "**metabolic process**" concerne surtout "cellular amino acid metabolic process" (p-value = $6,8e-05$), "monosaccharide metabolic process" (p-value = $1,5e-04$) et "carboxylic acid metabolic process" (p-value = $1,2e-06$). La catégorie "**biological regulation**" concerne essentiellement "cellular cation homeostasis" (p-value = $1,6e-07$) et dans la catégorie "response to stimulus", il y a "response to hormone stimulus" (p-value = $1,0e-07$), "response to abiotic stimulus" (p-value = $1,9e-04$) et "response to biotic stimulus" (p-value = $2,5e-04$).

D'après ces résultats, on peut dire que les gènes inhibés chez la lignée sensible en réponse à l'inoculation sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés, des sucres et des acides carboxyliques, dans l'homéostasie des cations, la réponse aux hormones et aux stress biotiques et abiotiques. Parmi les gènes de **réponse aux stress biotiques** réprimés, certains jouent un rôle dans

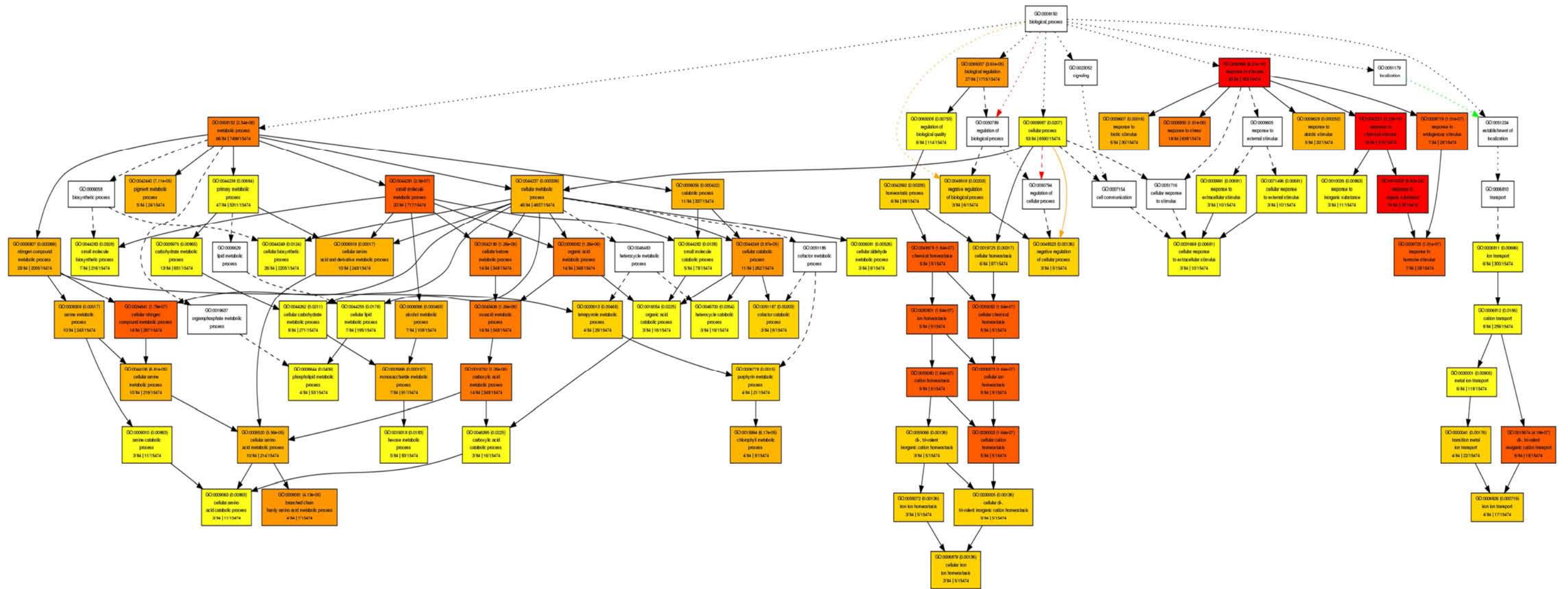


Figure III. 11 : Analyse d'enrichissement des termes GO associés à des fonctions biologiques dans les gènes réprimés chez F83005.5 (sensible) en réponse à l'inoculation. Chaque rectangle représente un terme avec le nom, le numéro de GO et la p-value entre parenthèses. (3/18|30/1547) : les deux premiers chiffres représentent le nombre de gènes dans la liste analysée qui sont associés au terme par rapport au nombre total de termes différents identifiés dans la liste analysée | les deux derniers chiffres représentent le nombre de gènes associés à ce terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula* (utilisée comme référence) par rapport au nombre total de gènes qui sont associés à un terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula*. Les probabilités ont été calculées avec agriGO en utilisant la méthode de Fisher, ajustée avec la méthode de Bonferroni. La couleur du rectangle indique le niveau de significativité : jaune p-value ≤ 0.05 ; orange p-value ≤ E-05 et rouge p-value ≤ E-09.

le stress oxydatif, d'autres dans la défense (**Tableau III. 7**). Les gènes de réponse hormonale réprimés sont impliqués dans la voie de l'ABA, de l'auxine et des brassinostéroïdes.

L'ensemble de ces données indique que certains mécanismes de défense sont réprimés chez la lignée sensible dont la signalisation hormonale.

8. Identification et analyse de réseaux de régulation de gènes co-exprimés en réponse à *Va* V31-2 chez la lignée A17.

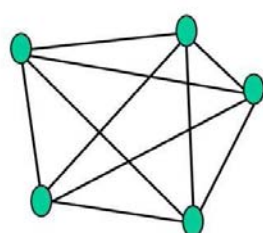
Le fonctionnement de tout processus biologique, y compris le métabolisme, le cycle cellulaire et la réponse aux stress biotiques et abiotiques, est assuré par un ensemble de gènes exprimés à un moment spécifique, à des niveaux spécifiques et dans des cellules et des tissus spécifiques. Le niveau d'expression de ces gènes est contrôlé par un réseau de régulation qui est constitué par un ensemble d'espèces moléculaires (comme des protéines, des microARN, etc...) et leurs interactions. L'analyse de gènes qui s'expriment différemment ne permet pas toujours de détecter les gènes à faible nombre de transcrits comme ceux par exemple qui codent pour les facteurs de transcription (Kahl et al., 2012), contrairement à une analyse de **réseau de co-expression**. Cette dernière se base sur la similarité entre les profils d'expression des gènes. Ainsi, les gènes qui présentent des profils d'expression similaires dans différentes conditions sont susceptibles d'être impliqués dans un même réseau de régulation. Il existe plusieurs réseaux de régulation qui sont décrits en détail comme le cycle de régulation du bactériophage λ (Ptashne, 1992), ou qui sont encore en développement comme les réseaux KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa and Goto, 2000).

Dans le but d'identifier les mécanismes de régulation de résistance à *Va* V31-2 chez *M. truncatula*, nous avons choisi de faire une analyse de réseaux de régulation à partir des gènes co-exprimés dans nos données transcriptomiques. Ce choix se justifie aussi du fait que dans un pool contenant plusieurs échantillons d'une cinétique (4h, 8h et 24h pour le pool Early), les gènes induits à un moment de la cinétique seulement ne seront peut-être pas observés comme s'exprimant différemment dans le pool en raison d'un effet de dilution des molécules.

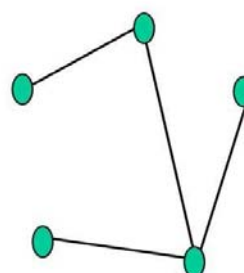
Tableau III. 7 : Annotations des gènes de réponse aux stress biotiques et aux hormones réprimés dans la lignée F83005.5 (sensible).

| Response to biotic stimulus | | | | |
|-----------------------------|---|-------|------------|--|
| Gène | Annotation | Fold | GO-ID | GO terme |
| TC177579 | peroxidase 21 | -2,54 | GO:0006979 | response to oxidative stress |
| IMGA Medtr1g088660.1 | e3 ubiquitin-protein ligase bah1-like | -1,59 | GO:0009626 | plant-type hypersensitive response |
| IMGA Medtr2g007950.1 | nodulin 21 -like transporter family isoform 1 | -1,74 | GO:0031347 | regulation of defense response |
| TC177102 | outer envelope pore protein | -1,67 | GO:0042742 | defense response to bacterium |
| EY475764 | methionyl-trna synthetase | -1,88 | GO:0010363 | regulation of plant-type hypersensitive response |

| Response to hormone stimulus | | | | |
|------------------------------|--|-------|------------|--------------------------------------|
| Gène | Annotation | Fold | GO-ID | GO terme |
| TC179289 | ferritin- chloroplastic-like isoform x2 | -1,78 | GO:0009737 | response to abscisic acid stimulus |
| TC180413 | fructose- - cytosolic | -2,59 | GO:0009737 | response to abscisic acid stimulus |
| IMGA Medtr5g083170.1 | ferritin- chloroplastic-like isoform x2 | -2,38 | GO:0009737 | response to abscisic acid stimulus |
| TC193809 | aldehyde dehydrogenase family 7 member a1 | -1,72 | GO:0009733 | response to auxin stimulus |
| TC176982 | glutathione s- amino-terminal domain protein | -2,70 | GO:0009734 | auxin mediated signaling pathway |
| TC176640 | dormancy auxin associated protein | -3,35 | GO:0009741 | response to brassinosteroid stimulus |
| IMGA Medtr5g006360.1 | lactoylglutathione lyase glyoxalase i family protein | -1,67 | GO:0009741 | response to brassinosteroid stimulus |



"Weighted"



"Unweighted"

Figure III. 12 : Représentation schématique du "Weighted gene coexpression gene network" et du "Unweighted gene coexpression gene network". Les gènes sont représentés par les nœuds verts. Les traits lient les gènes qui sont coexprimés.

a) Méthode utilisée pour la modélisation du réseau de régulation de gènes co-exprimés

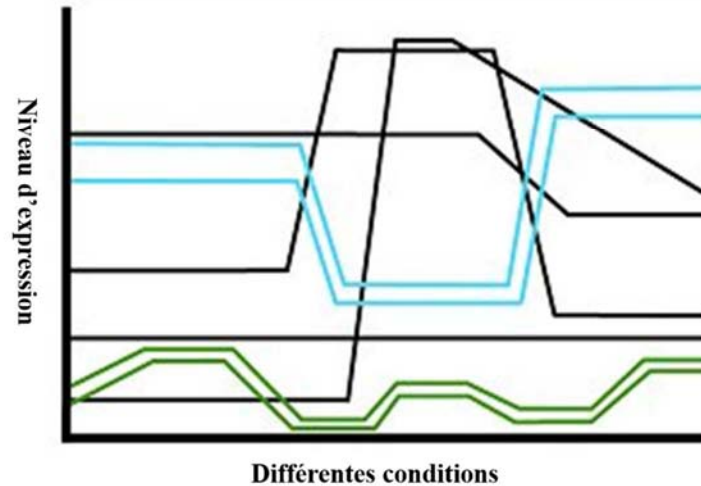
Dans le but d'identifier un réseau de régulation de la résistance contre Va V31-2, nous avons réalisé une analyse de co-expression de gènes appelée "Gene Co-expression Network Analysis" (GCNA) (Kanehisa and Goto, 2000). Cette méthode est basée sur la corrélation entre les profils d'expression des gènes deux à deux. Les résultats permettent d'obtenir un graphique qui montre une distribution topologique des gènes qui sont représentés par des nœuds reliés par des traits indiquant qu'ils sont co-exprimés. Il existe deux types de GCNA, le "Unweighted GCNA" et le "Weighted GCNA" (Zhang and Horvath, 2005)(**Figure III. 12**). Dans le cas du "Unweighted GCNA", on cherche à savoir si les profils d'expression des gènes sont similaires deux à deux (deux réponses possibles, "oui" ou "non"). Sur le graphique, les gènes qui ont le même profil d'expression sont liés alors par un trait et tous les traits sont de la même longueur. En revanche, dans le cas du "Weighted GCNA", on cherche à savoir si les profils d'expression des gènes sont similaires mais surtout à quel point ils sont similaires. Plus les profils d'expression de deux gènes sont similaires plus le trait qui les relie sera court. Ainsi dans le "Weighted GCNA", les gènes dont les profils d'expression sont similaires seront projetés dans la même zone du graphique, et formeront un amas de gènes appelé module (Ravasz et al., 2002).

Pour des raisons liées à la puissance des outils utilisés pour les analyses, il est nécessaire de réduire le jeu de données. Pour cela, le coefficient de variabilité de chaque gène a été calculé. Plus l'expression du gène varie à travers les différentes banques, plus son coefficient de variabilité sera proche de 100%. Les gènes dont le coefficient de variabilité est égal ou supérieur à 40% ont été sélectionnés (Verdier et al., 2013), ce qui fait un total de 2083 gènes. Pour la construction du réseau WGCNA, la première étape consiste à calculer le coefficient de corrélation de Pearson entre les profils d'expression de l'ensemble des gènes deux à deux (**Figure III. 13**). Puis, la matrice de coefficients de corrélation est transformée en matrice de proximité qui permet de définir la distance

1. Données transcriptomiques

Données contiennent des corrélations

2. Analyse de corrélation



Différentes conditions

3. Matrice de corrélation

Coefficient de corrélation de tous les gènes

| | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 | G10 | G11 | G12 | G13 | G14 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| G1 | 1 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 0.1 | 0.9 | 0.1 | 0.1 | 0.8 | 0.2 | 0.2 |
| G2 | 0.9 | 1 | 0.9 | 0.3 | 0.3 | 0.7 | 0.0 | 0.5 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.3 |
| G3 | 0.9 | 0.9 | 1 | 0.9 | 0.0 | 0.2 | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.2 | 0.6 | 0.1 | 0.0 |
| G4 | 0.9 | 0.3 | 0.9 | 1 | 0.5 | 0.3 | 0.6 | 0.3 | 0.0 | 0.5 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.6 |
| G5 | 0.9 | 0.3 | 0.0 | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.6 | 0.1 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.5 | 0.2 | 0.5 |
| G6 | 0.8 | 0.7 | 0.2 | 0.3 | 0.1 | 1 | 0.9 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.5 | 0.3 | 0.1 | 0.1 |
| G7 | 0.9 | 0.0 | 0.5 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 1 | 0.3 | 0.1 | 0.5 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.2 |
| G8 | 0.1 | 0.5 | 0.7 | 0.3 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 1 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 0.8 | 0.9 |
| G9 | 0.9 | 0.3 | 0.6 | 0.0 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.9 | 1 | 0.8 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.3 |
| G10 | 0.1 | 0.1 | 0.5 | 0.5 | 0.3 | 0.1 | 0.5 | 0.9 | 0.8 | 1 | 0.8 | 1.0 | 0.2 | 0.3 |
| G11 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.1 | 0.9 | 0.1 | 0.8 | 1 | 0.5 | 0.8 | 0.9 |
| G12 | 0.8 | 0.2 | 0.6 | 0.2 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 0.8 | 0.3 | 1.0 | 0.5 | 1 | 0.8 | 0.1 |
| G13 | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.5 | 0.8 | 0.5 | 0.2 | 0.8 | 0.8 | 1 | 0.9 |
| G14 | 0.2 | 0.3 | 0.0 | 0.6 | 0.5 | 0.1 | 0.2 | 0.9 | 0.3 | 0.3 | 0.9 | 0.1 | 0.9 | 1 |

Conversion en matrice de proximité et en réseau

4. Réseau de coexpression

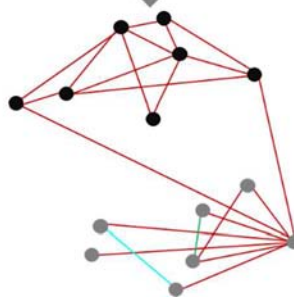


Figure III. 13: Cheminement de la méthodologie pour l'analyse de réseau de co-expression de gènes à partir de données transcriptomiques. Après normalisation des données, on analyse les profils d'expression des gènes au travers des différentes conditions. Les profils d'expressions sont convertis en vecteurs à partir desquels on réalise une comparaison en calculant les coefficients de corrélation des gènes 2 à 2. Ces coefficients de corrélation sont convertis en coefficients de proximité qui sont utilisés pour dessiner le réseau d'expression.

entre les gènes sur le graphique. Contrairement au coefficient de corrélation qui peut être positif ou négatif, le coefficient de proximité est compris entre 0 et 1. C'est avec la matrice de proximité qu'on trace le réseau de régulation de gènes.

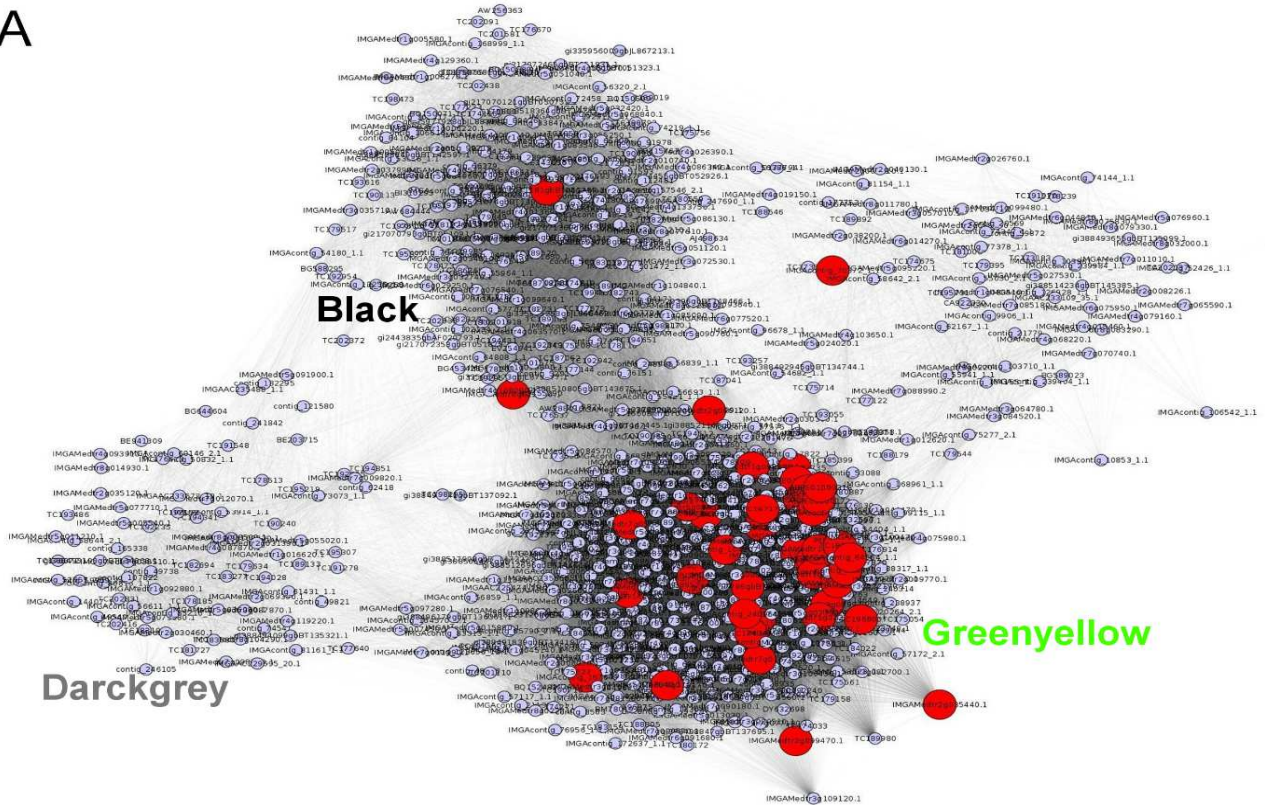
b) Analyse du réseau de gènes co-exprimés chez A17 en réponse à *Va* V31-2.

Pour la lignée résistante A17, nous sommes partis de 2083 gènes. Le réseau obtenu combine 800 gènes répartis dans 5 modules différents (**Tableau S. 3**). Ces modules ont été annotés par un code couleur: Greenyellow (376 gènes), Black (243 gènes), Darkgrey (81 gènes), Mediumpurple (65 gènes) et Sienna (35 gènes) (**Figure III. 14**). De ces 5 modules, le module Greenyellow est celui dont les gènes ont les profils d'expression les plus fortement corrélés à la comparaison "Mock vs. Inoculé". De plus, dans ce module sont localisés 37 (~70%) des gènes qui répondent différemment à l'inoculation chez A17. Pour ces raisons, nous avons conclu qu'il s'agissait du module de régulation central dans la résistance contre *Va* V31-2 dans la phase précoce de l'infection.

Sur les 376 gènes du module Greenyellow, il y a 21 (5,5%) séquences dont nous n'avons pas pu identifier la banque de données d'origine. En enlevant les 7 séquences de *V. alfalfae*, il reste 348 gènes de *M. truncatula* à analyser. 309 (88,7%) ont été annotés par Blast2GO. Les fonctions biologiques de niveau 4 majoritaires (**Figure S. 3**) sont "oxydation-reduction process" (65%), "macromolecule metabolic process" (51%) et "organic substance biosynthetic process" (51%). Les fonctions moléculaires de niveau 4 les plus représentées sont "cation binding" (61%), "anion binding" (27%) et "nucleoside phosphate binding" (21%).

L'analyse d'enrichissement en termes GO montre que ces gènes sont répartis dans 4 fonctions biologiques majeures à savoir "response to stimulus", "metabolic process", "developmental process" et "multi-organism process" (**Figure III. 15**).

A



B

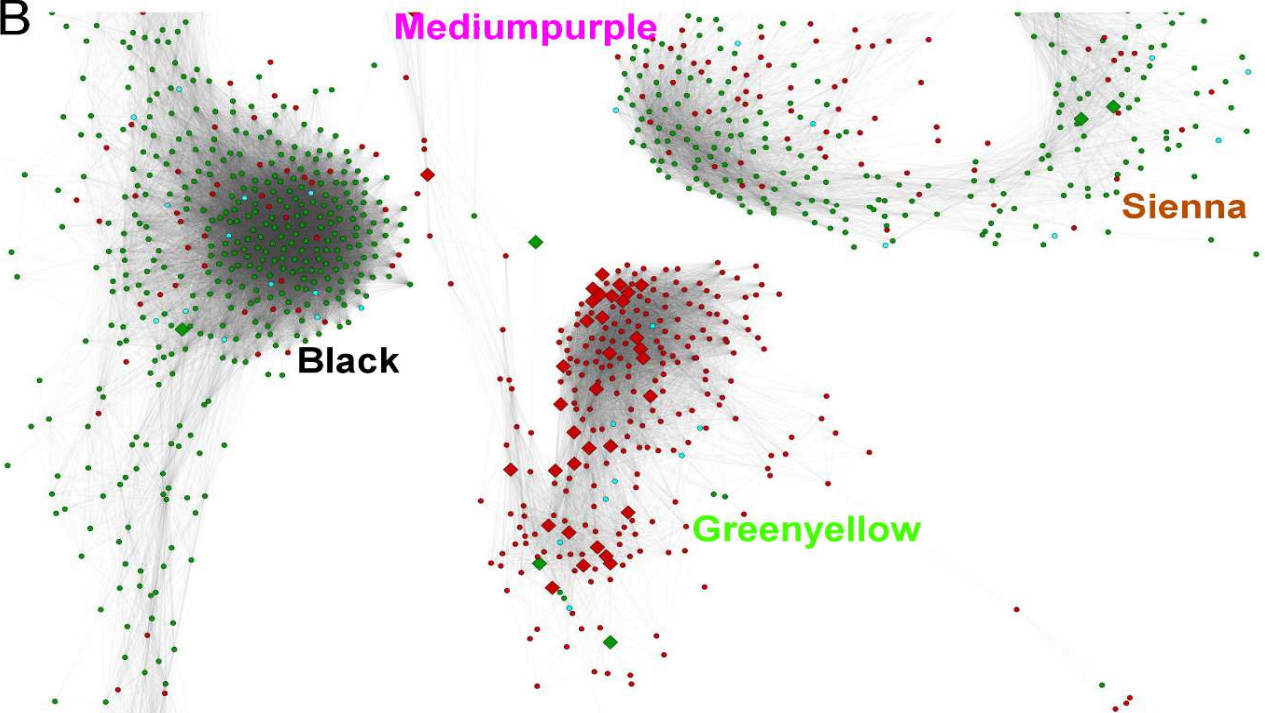


Figure III. 14 : WGCNA (Weighted Gene Coexpression gene Network Analysis) de la lignée A17 (résistante) en réponse à *Va* V31-2. Image obtenue avec le logiciel Cytoscape. A) Ensemble des modules de gènes co-exprimés les plus significativement corrélés à la réponse à l'inoculation. En gris, les gènes non-différentiels, en plus gros et en rouge, les gènes identifiés comme s'exprimant différemment en réponse à l'inoculation chez A17. B) Vue rapprochée de la région contenant le module des gènes différentiels en réponse à *Va* V31-2. Les gènes induits sont représentés en rouge et les gènes réprimés en vert. Les carrés représentent les DEGs. Les facteurs de transcription sont représentés en bleu cyan.

Le "**developmental process**" concerne "multicellular organismal development" (p-value = 7,7e-05), "anatomical structure development" (p-value = 0,0002) et "cellular developmental process" (p-value = 0,002).

Le "**metabolic process**" concerne "secondary metabolic process" (p-value = 1,2e-21), cellular amino acid derivative biosynthetic process (p-value = 4,7e-18), "aromatic compound biosynthetic process" (p-value = 4,2e-16), "oxidation reduction" (p-value = 4,5e-10) ou encore "oxygen and reactive oxygen species metabolic proces" (p-value = 0,0001).

La "**response to stimulus**", concerne "response to biotic stimulus" (p-value = 2,0e-23), "response to light stimulus" (p-value = 4,2e-16), "response to hormone stimulus" (p-value = 2,7e-8), "defense response" (p-value = 3,3e-6), "response to metal ion" (p-value = 7,9e-6).

D'après cette analyse, le module de réponse à *Va* V31-2 permet l'induction de gènes impliqués dans le développement des structures cellulaires, le métabolisme secondaire, le métabolisme des acides aminés, les mécanismes d'oxydoréduction, la production des ROS, la défense, la réponse aux hormones et la réponse aux ions métalliques. Nous nous sommes intéressés particulièrement aux gènes susceptibles de jouer un rôle dans la résistance à savoir les gènes de défense (**Tableau III. 8**), du métabolisme des ROS (**Tableau III. 9**) de la signalisation hormonale (**Tableau III. 10**) et ceux du métabolisme secondaire (**Tableau III. 11**).

L'analyse de ces gènes montre qu'en réponse à *Va* V31-2, la lignée A17 réagit par une réponse à un stress oxydatif et la biosynthèse de métabolites secondaires, comme la lignée sensible (**Tableau III. 9 et 11**). Cependant, à la différence de la lignée sensible, la lignée résistante induit des gènes de défense contre les pathogènes qui codent pour des chitinases, des RPM1, des PR10 ou encore une PR5-like receptor kinase (PRK5).

En ce qui concerne les voies de signalisation (**Tableau III. 10**), la voie de l'ET puis la voie de l'ABA et de l'auxine sont particulièrement représentées. Celle des cytokinines et des gibbérellines sont moins représentées. Il faut noter que la voie de l'ET et de l'auxine sont aussi induites chez la lignée sensible.

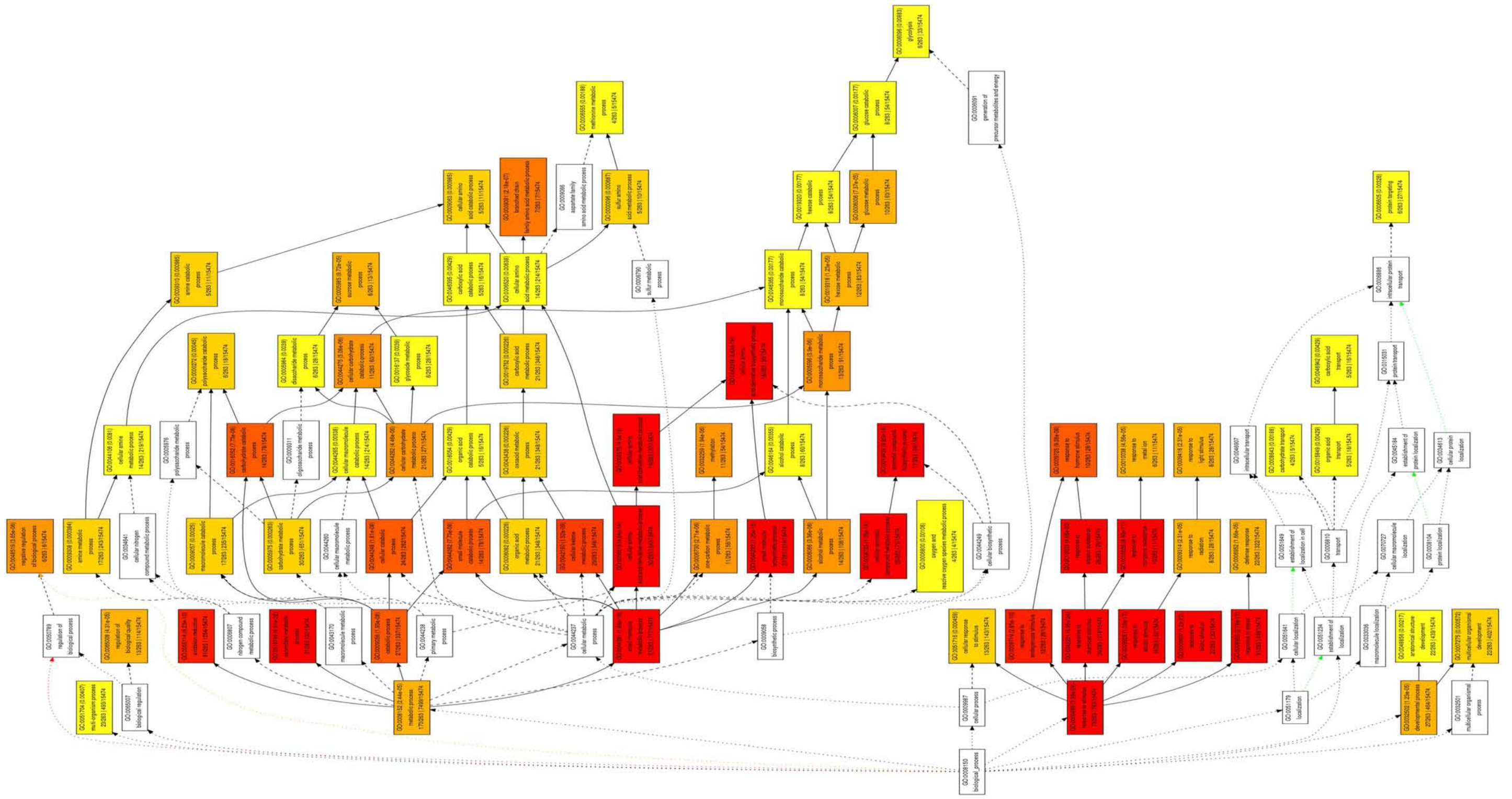


Figure III. 18 : Analyse d'enrichissement des termes GO associés à des fonctions biologiques des gènes du module de résistance (Greenyellow) contre Va V31-2. Chaque rectangle représente un terme avec le nom, le numéro de GO et la p-value entre parenthèses. (3/18|30/1547) : les deux premiers chiffres représentent le nombre de gènes dans la liste analysée qui sont associés au terme par rapport au nombre total de termes différents identifiés dans la liste analysée | les deux derniers chiffres représentent le nombre de gènes associés à ce terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula* (utilisée comme référence) par rapport au nombre total de gènes associés à un terme dans le génome de 3.5 de *M. truncatula*. Les probabilités ont été calculées avec agriGO en utilisant la méthode de Fisher, ajustée avec la méthode de Bonferroni. La couleur du rectangle indique le niveau de significativité : jaune p-value ≤ 0.05 ; orange p-value ≤ E-05 et rouge p-value ≤ E-09.

Tableau III. 8 : Gènes du module Greenyellow impliqués dans la défense.

| Défense | | |
|-----------------------------|-------------|---|
| Gene | Fold | Annotation |
| gi 388496725 gb BT136634.1 | -1,58 | 3-methylcrotonyl- carboxylase |
| IMGA Medtr4g085890.1 | -1,55 | 3-methylcrotonyl- carboxylase |
| IMGA Medtr2g035190.1 | 2,18 | aba-responsive protein |
| IMGA Medtr2g098070.1 | 2,92 | adp atp carrier 2 isoform 1 |
| IMGA Medtr1g013700.1 | 1,8 | calcineurin b-like protein-interacting protein kinase |
| IMGA contig_12851_1.1 | 3,05 | chitinase hevein pr-4 wheatwin2 |
| TC173292 | 1,7 | class i chitinase |
| IMGA Medtr5g027810.1 | 1,43 | disease resistance protein rpm1-like |
| TC200298 | 1,77 | disease resistance protein rpm1-like |
| IMGA Medtr2g099470.1 | 2,54 | endochitinase pr4-like |
| IMGA Medtr3g092890.1 | 1,3 | flavanone 3-dioxygenase-like |
| TC179158 | 1,46 | gdsl esterase lipase |
| IMGA Medtr3g009050.1 | 1,63 | leucine-rich repeat family protein |
| IMGA Medtr1g061640.1 | 2,08 | myb sant-like dna-binding domain protein |
| IMGA Medtr4g075980.1 | 1,09 | nac domain protein nac6 |
| IMGA Medtr8g039090.1 | 1,64 | nadph:quinone oxidoreductase |
| TC179701 | 1,44 | patatin-like protein |
| IMGA contig_16485_1.1 | 1,86 | pathogenesis-related protein bet v i family protein |
| TC174444 | 1,75 | pathogenesis-related protein bet v i family protein |
| TC202978 | 2,44 | pathogenesis-related protein class 10 |
| gi 1616608 emb Y08641.1 | 2,1 | pathogenesis-related protein pr10 |
| IMGA Medtr2g035150.1 | 2,52 | pathogenesis-related protein pr10 |
| IMGA contig_83669_2.1 | 1,68 | PR5-like receptor kinase, PR5K |
| IMGA Medtr2g064930.1 | 1,8 | receptor-like kinase |

En gras les gènes qui s'expriment différenciellement en réponse à *Va* V31-2.

Tableau III. 9 : Gènes du module Greenyellow impliqués dans le métabolisme des espèces réactives d'oxygène.

| Métabolisme des ROS | | |
|----------------------|-------|--|
| Gene | Fold | Annotation |
| TC202068 | 2,54 | cationic peroxidase 1-like |
| IMGA Medtr1g061640.1 | 2,08 | myb sant-like dna-binding domain protein |
| TC200298 | 1,77 | peroxidase 21-like |
| IMGA Medtr3g009050.1 | 1,63 | leucine-rich repeat family protein |
| IMGA Medtr5g083860.1 | 1,47 | peroxidase 4-like |
| IMGA Medtr3g092890.1 | 1,3 | flavanone 3-dioxygenase-like |
| IMGA AC235668_11.1 | -1,62 | peroxidase 9 |

Tableau III. 10 : Gènes du module impliqués dans la réponse aux hormones.

| Réponse aux hormones | | |
|-----------------------------|-------------|--|
| Gene | Fold | Annotation |
| Acide abscissique | | |
| IMGA Medtr2g008030.1 | -1,55 | fructose- - cytosolic |
| TC180413 | -1,58 | fructose- - cytosolic-like |
| IMGA Medtr5g006070.1 | 2,41 | sugar transport protein 13-like |
| Auxine | | |
| 8511684 gb BT144110.1 | 1,85 | minor allergen alt a 7-like |
| IMGA Medtr1g008700.1 | 1,59 | group 2 truncated hemoglobin -like |
| Cytokinine | | |
| IMGA Medtr2g100880.1 | | histidine phosphotransfer protein |
| Ethylène | | |
| TC173578 | 1,43 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase |
| TC173670 | 1,35 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase |
| IMGA Medtr6g092620.1 | 1,91 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 |
| TC174209 | 2,36 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1-like |
| IMGA Medtr7g105070.1 | 1,52 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4-like |
| IMGA contig_17822_1.1 | 2,83 | ap2 domain class transcription factor |
| IMGA Medtr1g093600.1 | 2,17 | ap2 erf and b3 domain-containing transcription repressor tem1-like |
| TC173292 | 1,7 | class i chitinase |
| IMGA Medtr4g114640.1 | 1,74 | ein3-binding f-box protein 1-like |
| gi 388507841 gb BT142193.1 | 2,07 | ethylene responsive transcription factor 2b |
| TC189643 | 2,11 | ethylene-responsive transcription factor erf098-like |
| Gibbérellines | | |
| IMGA contig_64922_1.1 | -1,47 | gibberellin-regulated protein 14-like |
| Voie non identifiée | | |
| IMGA Medtr5g006070.1 | 2,41 | sugar transport protein 13-like |
| TC179158 | 1,46 | gdsl esterase lipase |

Tableau III. 11 : Gènes du module Greenyellow impliqués dans le métabolisme secondaire.

| Métabolisme secondaire | | |
|-------------------------------|-------------|--|
| Gene | Fold | Annotation |
| IMGA Medtr1g097910.1 | 4,25 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr1g098140.1 | 3,71 | chalcone synthase |
| TC194155 | 3,19 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr7g016700.1 | 2,74 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr5g007730.1 | 2,46 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr7g016720.1 | 2,25 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr7g016780.1 | 2,19 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr7g016800.1 | 2,14 | chalcone synthase |
| IMGA contig_50874_2.1 | 1,63 | protein srg1-like |
| IMGA Medtr5g007640.1 | 1,61 | 4-coumarate: ligase isoenzyme 3 |
| TC180887 | 1,61 | caffeoyl- 3-o-methyltransferase |
| IMGA contig_176089_1.1 | 1,56 | sterol 14-demethylase-like |
| IMGA Medtr8g102380.1 | 1,53 | probable pectinesterase 53-like |
| IMGA Medtr4g006940.1 | 1,47 | cinnamoyl- reductase-like protein |
| IMGA Medtr5g098720.1 | 1,42 | phenylalanine ammonia-lyase |
| IMGA Medtr3g092890.1 | 1,3 | flavanone 3-dioxygenase-like |
| TC192240 | 1,23 | cdgsh iron-sulfur domain-containing protein neet |
| TC198603 | 1,22 | flavonol synthase |
| IMGA Medtr7g090180.1 | 1,11 | s-adenosylmethionine-dependent methyltransferase |
| IMGA Medtr5g073210.1 | -1,2 | laccase 3 |
| IMGA Medtr2g030400.1 | -1,7 | 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase |

En gras les gènes qui s'expriment différemment en réponse à *Va* V31-2.

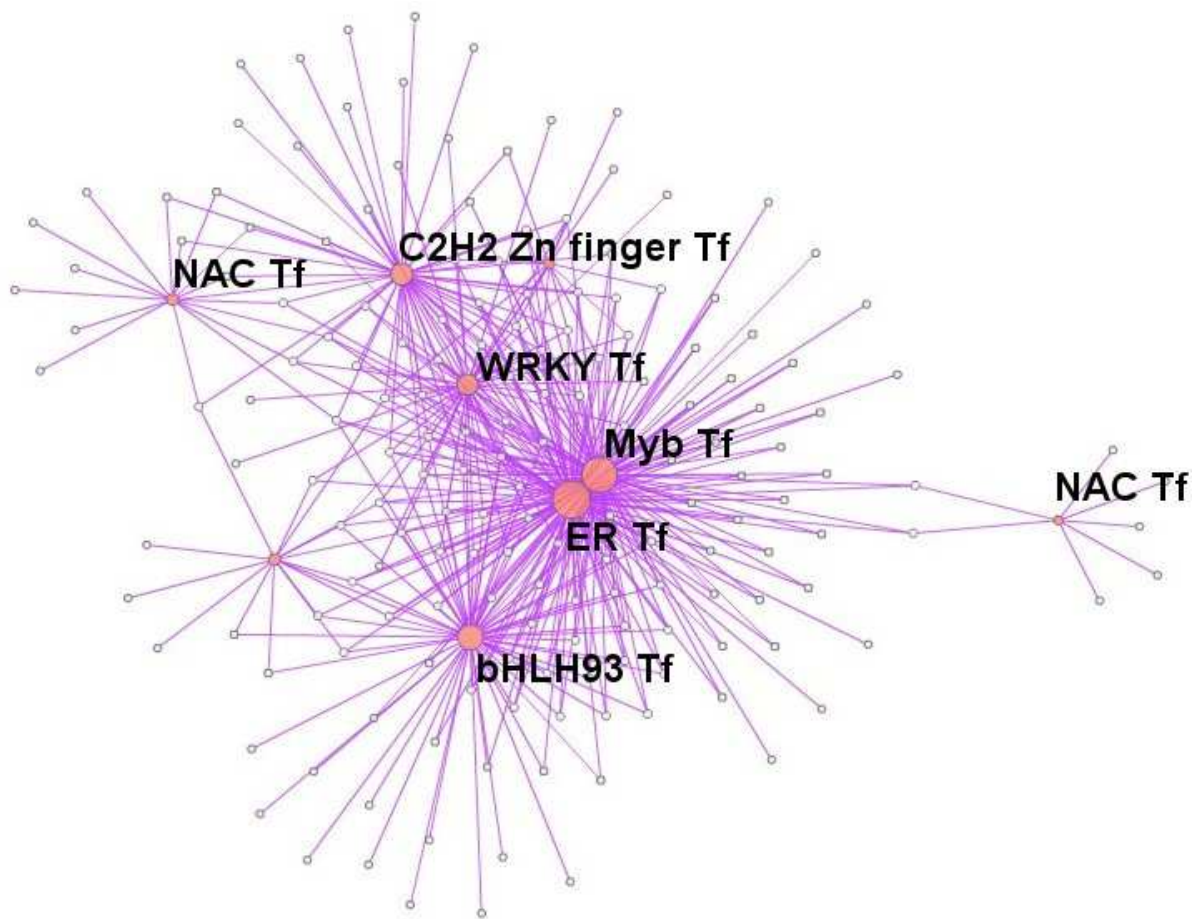


Figure III. 16 : Réseau de coexpression de gènes ("Unweighted GCNA") prédit par LegumeGRN. Après identification des sondes Affymetrix des gènes du module Greenyellow, 331 (/376) gènes ont été analysés avec LegumeGRN avec un seuil de coefficient de corrélation de Pearson $\pm 0,7$. On obtient un réseau avec 185 gènes. Tf (facteur de transcription). Données d'expression MtGea utilisées (06 septembre 2014) : Racines de la lignée A17 inoculées avec *A. euteiches*, *R. solanacearum*, *P. omnivora* et *M. phaseolina*.

- a) Comparaison du réseau de co-expression de gènes en réponse à *Va* V31-2 avec celui prédit par LegumeGRN

Depuis peu, il est possible de réaliser une prédiction de réseau de co-expression de gènes chez *M. truncatula* grâce au serveur LegumeGRN (<http://legumegrn.noble.org/index.jsp>; Wang et al., 2013). Ce serveur utilise la base de données du *Mt* Gene Expression Atlas (MtGea) pour prédire des réseaux de co-expression par la méthode "Unweighted GCNA" (<http://mtgea.noble.org/v3/>). Pour pouvoir réaliser l'analyse, il est nécessaire d'identifier les sondes Affymetrix des 344 gènes identifiés dans le module de réponse à *Va* V31-2 (Greenyellow). L'analyse a permis d'identifier au moins une sonde pour 331 gènes (96%). Pour la prédiction du réseau, nous avons utilisé les données d'expression de racines inoculées avec les pathogènes *Aphanomyces euteiches*, *Ralstonia solanacearum*, *Phymatotrichopsis omnivora* et *Macrophomina phaseolina* et un seuil de corrélation de $\pm 0,7$ (Coefficient de corrélation de Pearson). Ainsi nous avons identifié un réseau de co-expression formé par 183 (55%) gènes (**Figure III. 16**). Ces résultats obtenus *via* legumeGRN semblent, pour une grande partie, en accord avec notre approche. En effet, les gènes du module de résistance contre *Va* V31-2 sont aussi co-régulés dans d'autres interactions entre *M. truncatula* et d'autres pathogènes racinaires d'après les données du MtGea.

- b) Des régulateurs identifiés dans le module de co-expression en réponse à *Va* V31-2 chez la lignée A17

L'avantage du réseau est de permettre l'identification des régulateurs qui pourraient être impliqués dans le processus biologique étudié. Ainsi, nous avons cherché à identifier les facteurs de transcription, les récepteurs de signaux et les MAP-kinases.

Dans le réseau présenté dans la **Figure III. 16**, on identifie **8 facteurs de transcription** sur la base de l'annotation dans le génome V3.5 de *M. truncatula*. L'analyse par Blast2GO et l'identification des sondes Affymetrix ont permis d'identifier respectivement un et deux facteurs de transcription supplémentaires. Au total, nous avons identifié 11 gènes qui codent pour des facteurs de transcription. L'analyse de leurs expressions sur Gene Atlas indique qu'ils s'expriment tous différemment en réponse à d'autres pathogènes racinaires (**Tableau III. 12**) ce qui suggère très fortement qu'ils seraient impliqués dans les mécanismes de défense. Ces facteurs de transcription font partie de la famille des AP2/ERF and B3, Ethylene responsive, MYB, NAC1, bHLH 93, bHLH 135, WRKY, Trihelix family protein et C2H2-type zinc finger protein.

Pour identifier les gènes susceptibles d'être impliqués dans **la perception et dans la signalisation**, nous avons commencé par analyser la liste des gènes du module (**Tableau S. 4**). Dans cette liste, on détecte 2 gènes codant pour la protéine RPM1 (disease resistance protein rpm1).

Etant donné que la plupart des protéines qui sont impliquées dans la reconnaissance des pathogènes sont des récepteur like-kinase et ceux qui sont impliquées dans la signalisation de la réponse sont des protéines kinases, une recherche d'homologues a été réalisée avec 6 gènes qui codent pour des récepteurs like kinases ou de protéine kinases. La première étape a été d'identifier les homologues par Blastx (NCBI) dans les banques de données d'*A. thaliana*, du coton et de tomate. Les meilleurs candidats identifiés ont été alignés sur phylogeny.fr (Phylogeny.fr: "One Click" Mode) pour obtenir les arbres phylogénétiques, présentés sur la **Figure III. 17**. Cette analyse a permis

Tableau III. 12 : Liste des facteurs de transcription identifiés dans le module (Greenyellow) et analyse de leurs expressions en réponse aux pathogènes chez A17 selon les données du *Mt* Gene Atlas.

| ID | NB | Annotation | Probeset ID | V31-2 | YE | AE | RS | CRR | MP |
|-----------------------------|----------|---|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| IMGA Medtr1g093600.1 | 1 | AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor TEM1 | Msa.1168.1.S1_at | Red | Red | Red | Green | Red | Grey |
| IMGA contig_17822_1.1 | 1 | Ethylene responsive transcription factor 2a | Mtr.36943.1.S1_at | Red | Red | Red | Red | Red | Red |
| IMGA Medtr1g087920.1 | 2 | Ethylene responsive transcription factor 2b | Mtr.43313.1.S1_at | Red | Red | Red | Red | Red | Red |
| TC189643 | 1 | Ethylene-responsive transcription factor | Mtr.44496.1.S1_at | Red | Red | Red | Red | Red | Red |
| EY475279 | 1 | MYB transcription factor | Mtr.22332.1.S1_at | Red | Grey | Grey | Grey | Red | Red |
| IMGA Medtr4g075980.1 | 1 | Stress-induced transcription factor NAC1 | Mtr.42785.1.S1_at | Red | Red | Grey | Red | Grey | Grey |
| IMGA Medtr3g111290.1 | 2 | Transcription factor bHLH 93 | Mtr.11697.1.S1_at | Red | Grey | Green | Red | Green | Red |
| IMGA contig_76909_1.1 | 1 | WRKY transcription factor 28-like | Mtr.38202.1.S1_at | Red | Red | Red | Grey | Grey | Grey |
| <i>IMGA Medtr1g061640.1</i> | <i>1</i> | <i>Trihelix family protein</i> | Mtr.41568.1.S1_at | Red | Red | Grey | Grey | Red | Grey |
| <i>TC175561</i> | <i>1</i> | <i>C2H2-type zinc finger protein</i> | Mtr.41238.1.S1_at | Red | Red | Green | Red | Red | Red |
| <i>TC186418</i> | <i>1</i> | <i>Transcription factor bHLH 135</i> | Mtr.44005.1.S1_at | Green | Green | Grey | Grey | Red | Green |

L'analyse de l'expression est faite sur la base des données du *Mt* Gene Atlas. En italique sont représentés les facteurs de transcription non représentés dans le module (Figure III. 15). IMGA|Medtr1g061640.1 a été identifié grâce aux sondes Affymetrix. TC175561 et TC186418 ont été identifiés grâce l'annotation par Blast2GO. ID : Identifiant du gène. NB : Nombre d'homologues dans le réseau. Probeset ID : Identifiant de la sonde Affymetrix. YE : Traitement avec des éliciteurs de levure. AE : *Aphanomyces euteiches* ; RS : *Ralstonia solanacearum*. CRR : *Phymatotrichopsis omnivora*. MP : *Macrophomina phaseolina*.

d'identifier un homologue de BAK1 (FM886833.1), de MKK2 (Medtr1g113960.1), d'EF-TU Receptor (EFR, Medtr5g026090.1), de NDR1 (contig_99115_1.1) et de Wat1 (walls are thin1 ; Medtr3g072500) au sein des gènes regroupés dans le module de réponse à *Va* V31-2 (Greenyellow).

Enfin, une **annotation KEGG (Figure III. 18)** nous a permis d'identifier un gène qui code pour la CNGC10 (cyclic nucleotide gated channel 10), une protéine impliquée dans la signalisation calcique. Nous avons aussi identifié un gène codant pour une HSP90 (heat shock protein 90) et CERK1 respectivement. HSP90 est une protéine chaperonne qui fixe et régule l'activité de protéines de défense dont RPM1 dans la résistance contre *Pseudomonas syringae* (Hubert et al., 2003 ; Sangster and Queitsch, 2005) et CERK1, un récepteur de la chitine (Miya et al., 2007).

Dans le but d'identifier des **microARN (miR)** susceptibles d'être impliqués dans le réseau de régulation de la résistance d'A17, nous avons croisé la liste de gènes présents dans le module de résistance avec celle des cibles prédites de miR identifiés dans le projet MIRMED. Dans le cadre de ce projet, des banques de petits ARN de racines des lignées A17 et F83005.5 inoculées ou non avec *Va* V31-2 ont été séquencées. De cette façon, nous avons pu identifier 33 gènes qui seraient potentiellement régulés par 29 miR différents (**Tableau III. 13**). Parmi ces 29 miR, seulement cinq ont été annotés et reportés dans la base de données miRBase V20, à savoir le miR408, miR482, miR171b, miR2610a et le miR2119. De plus, seulement sept de ces miR (dont trois sont annotés (miR171b, miR2610a et miR2119)) ont été isolés dans les miRomes (séquençage des miR) de la réponse à *Va* V31-2, les autres miR ayant été identifiés dans les autres banques de petits ARN séquencées dans le cadre du projet MIRMED. Parmi ces 29 miR, seulement deux répondent différemment à l'inoculation (miR2119 et 204DVAAXX.1:23:763:986). Ces deux miR sont ainsi que leurs cibles. Il est important de rappeler que les banques de miR n'ont pas été constituées dans les mêmes conditions que l'analyse transcriptomique. La présence des miR dans le miRome est une

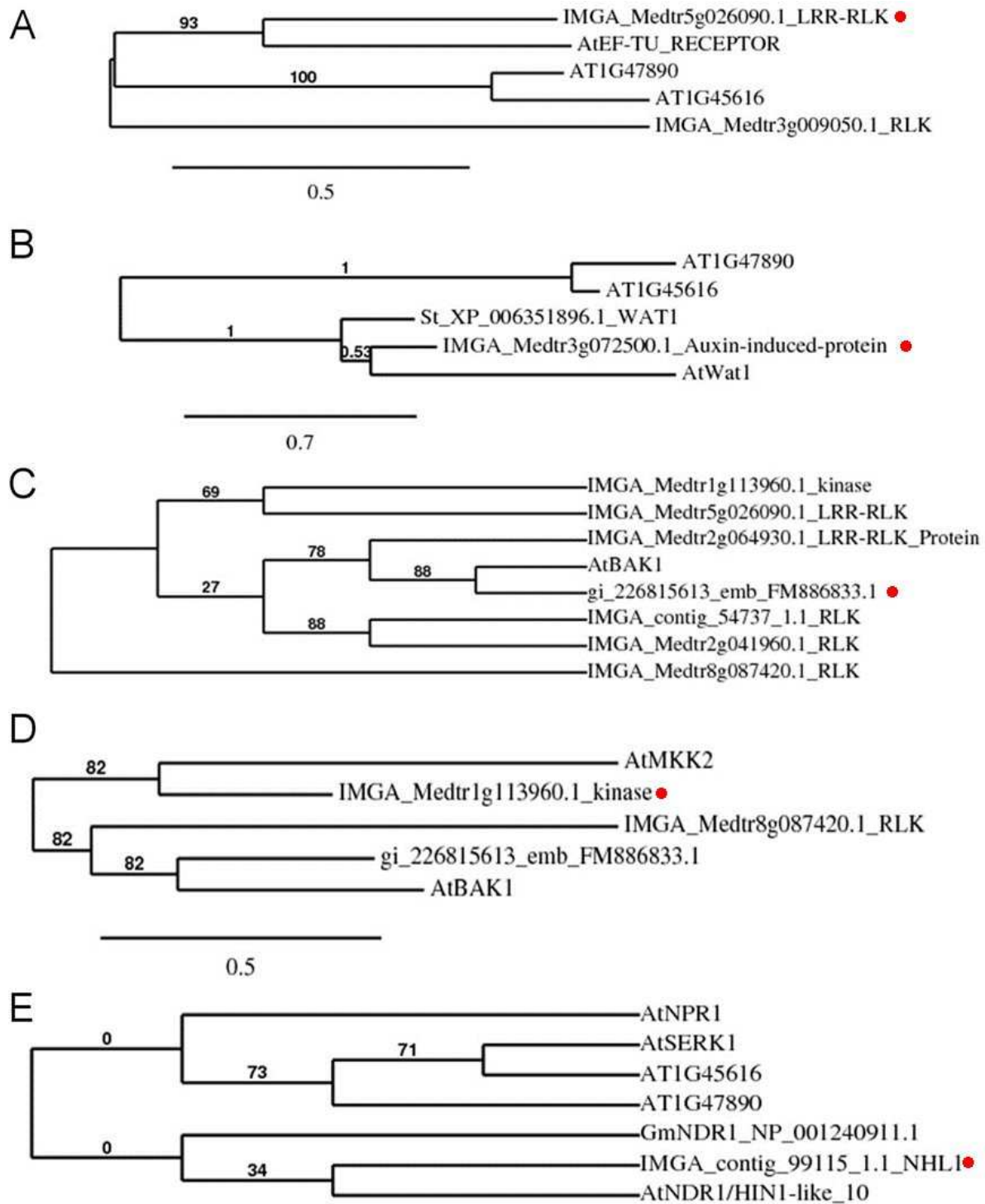


Figure III. 17 : Identification des homologues de gènes candidats identifiés dans le module Greenyellow. A) Homologues d'*EF-Tu receptor*. B) Homologues de *Wat1*. C) Homologues de *BAK1*. D) Homologues de *MKK2*. E) Homologues de *NDR1*. St : *S. tuberosum*, At : *A. thaliana*, Mt : *M. truncatula*. AtBAK1 (AT4G33430.1), AtRSK (AT2G26290.1), AtPRK5 (AT1G50610.1), AtNPR1 (AT1G64280.1), AtMKK2 (AT4G29810.1), AtBAK1 (AT4G33430.1), AtNDR1 (AT2G35980), AtRPM1 (AT3G07040.1), AtWat1 (AT1G75500.1).

bonne indication quant à son importance dans l'interaction entre *Va* V31-2 mais ne constitue pas un critère éliminatoire pour être des candidats dans la réponse à *Va* V31-2.

Parmi les miR qui sont connus pour réguler l'expression de gène de défense ou des gènes de réponse aux stress, apparaissent entre autres le miR482 qui régule l'expression des NBS-LRR chez *M. truncatula* (Zhu et al. 2013), le miR2119 qui ciblerait des alcool dehydrogenase 1, ou HELIUM_0000:6:17:4932:20530 qui ciblerait une Patatin-like protein 1. Il est donc possible que les miR que nous avons identifiés soient impliqués dans la résistance contre *Va* V31-2.

PLANT-PATHOGEN INTERACTION

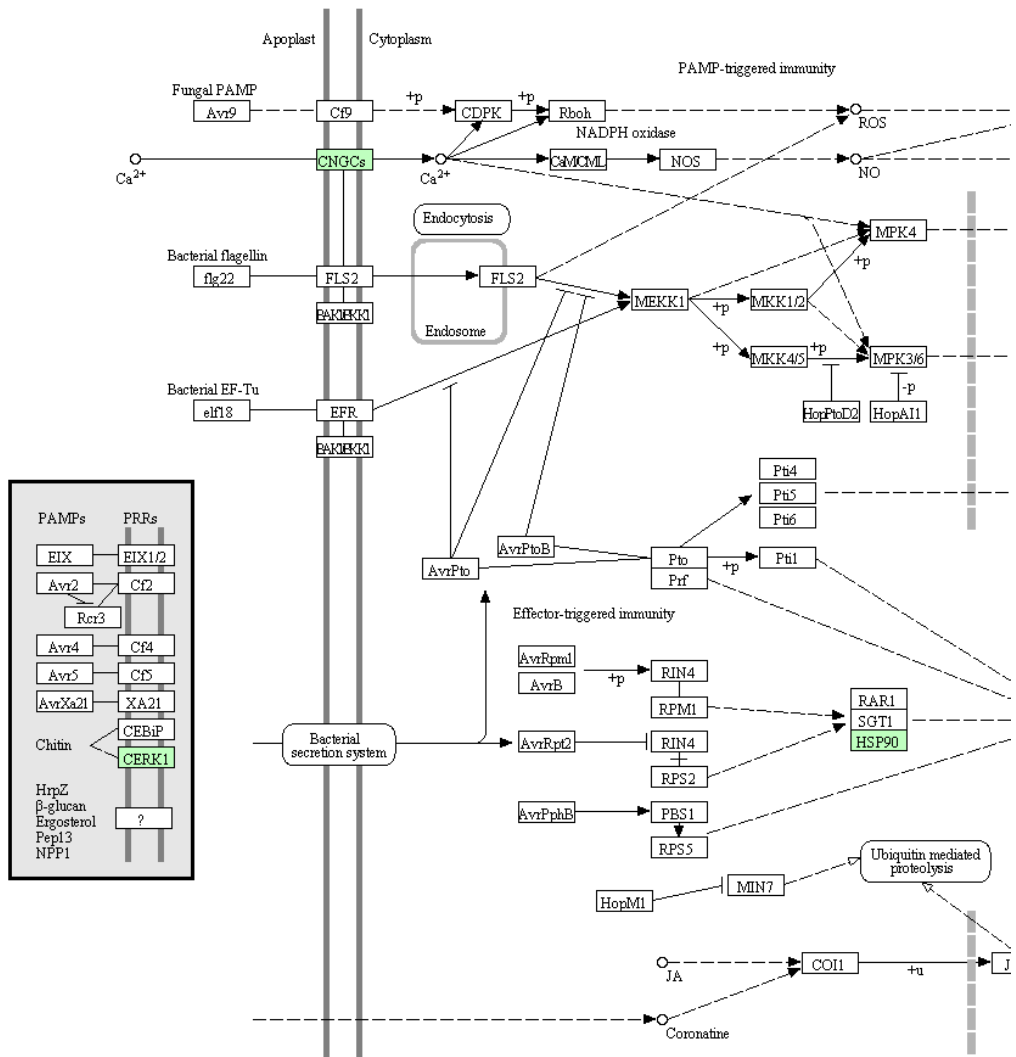


Figure III. 18 : Identification par annotation KEGG de gènes impliqués dans la signalisation des mécanismes de défense à partir des gènes du module Greenyellow. Les gènes identifiés sont colorés en vert. CNGC10 (cyclic nucleotide gated channel 10), HSP90 (heat shock protein 90) et CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1).

Tableau III. 13 : Gènes du réseau de régulation de résistance contre *Va* V31-2 susceptibles d'être des cibles de microARN (miR).

| Cible prédite | Annotation fonctionnelle | miR prédit (nb total de cibles prédites) | Expression du miR en réponse à <i>Va</i> V31-2 (a) |
|-----------------|---|---|--|
| TC176541 | Alcohol dehydrogenase 1 | Mtr-miR2119 (11) | Up |
| Medtr3g089970.1 | Alcohol dehydrogenase 1 | | |
| TC187179 | Alcohol dehydrogenase 1 | | |
| Medtr7g055630.1 | Unknown Protein | 204DVAAXX:1:23:763:986 (126) | Up |
| TC191162 | Unknown Protein | gma-miR171b (11) | ND |
| sBT137296.1 | Uncharacterized UDP-glucosyltransferase | Mtr-miR2610a (6) | ND |
| BT146560.1 | Alternative oxidase | 204DVAAXX:1:263:634:705 (14) | ND |
| Medtr4g085880.1 | thioredoxin M-type 3 chloroplast TRX-M3 | 207G6AAXX:2:170:330:668 (9) | ND |
| Medtr3g016290.1 | Unknown Protein | AZOTE_0001_61FVGAAXX:1:10:1676:21066 (4) | ND |
| Medtr5g073210.1 | Laccase-3 | Ath-miR408 (13) | Abs |
| Medtr8g089110.1 | Basic blue protein | | |
| Medtr5g007640.1 | 4-coumarate CoA ligase | Sly-miR482 (15) | Abs |
| Medtr5g083860.1 | Peroxidase | 204DVAAXX:1:165:457:501 (20) | Abs |
| TC173578 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase | 204DVAAXX:1:313:50:471 (4) | Abs |
| Medtr3g092890.1 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase | 204DVAAXX:1:4:247:604 (20) | Abs |
| Medtr7g086320.1 | Unknown Protein | 204DVAAXX:2:122:306:102 (62) | Abs |
| Medtr4g016920.1 | BGLU11 BETA GLUCOSIDASE 11 | 204DVAAXX:2:280:553:714 (11) | Abs |
| Medtr7g090570.1 | Unknown Protein | 204DVAAXX:3:108:863:96 (114) | Abs |
| BT148841.1 | Fasciclin-like arabinogalactan protein 11 | 207G6AAXX:1:151:979:325 (15) | Abs |
| TC187584 | Unknown Protein | 207G6AAXX:1:167:410:775 (14) | Abs |
| Medtr1g116580.1 | Unknown Protein | 207G6AAXX:2:255:433:661 (10) | Abs |
| BE998611 | Zinc transporter ZIP11 | 20F1DAAXX:6:250:869:126 (539) | Abs |
| EX532597 | Unknown Protein | 20F1DAAXX:8:40:810:761 (36) | Abs |
| Medtr1g025340.1 | Unknown Protein | | |
| Medtr3g016270.1 | Unknown Protein | 29_HELIUM_0000:3:4:9449:12301 (106) | Abs |
| Medtr3g096390.1 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha | AZOTE_0001_61FVGAAXX:2:7:11532:6168 (10) | Abs |
| Medtr5g006070.1 | Hexose transporter | AZOTE_0001_61FVGAAXX:3:106:16337:19751 (19) | Abs |
| Medtr3g082100.1 | lipid binding / structural constituent of cell wall | E8W526M03HFZ5Y (19) | Abs |
| TC179701 | Patatin-like protein 1 | HELIUM_0000:6:17:4932:20530 (7) | Abs |
| Medtr7g077180.1 | Trypsin inhibitor | HELIUM_0000:6:21:18379:4188 (22) | Abs |
| TC192562 | Pleiotropic drug resistance protein | HELIUM_0001:7:13:195:521 (37) | Abs |
| Medtr8g102380.1 | pectinesterase family protein | HELIUM_0001:8:42:473:1578 (41) | Abs |
| Medtr2g041960.1 | protein kinase family protein Thaumatin | AZOTE_0001_61FVGAAXX:1:39:8758:8911 (11) | Abs |

Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre total de cibles prédites par RNA-plex pour chaque microARN considéré.

(a) Les données d'expression des miR en réponse à *Va* V31-2 s'appuient sur les résultats du projet MIRMED (Formey et al., in press). En rouge, sont indiqués les miR identifiés dans les banques de petits ARN pour la réponse à *Va* V31-2 ; Up, miR significativement induit en réponse à *Va* V31-2 ; ND, miR non différentiellement exprimés entre la condition inoculée et contrôle. Abs, miR absent des banques de petits ARN pour la réponse à *Va* V31-2.

Tableau III. 14: Annotation des séquences de *Va* V31-2 identifiées parmi les gènes exprimés différemment en réponse à l'inoculation chez A17 et F83005.5.

| Contig | Gène | Fold A17 | Fold F83005.5 | Sequence name |
|--------------|--------------------|----------|---------------|---|
| ABPE01002352 | ref XM_003004406.1 | 125,69 | 383,72 | alcohol dehydrogenase |
| ABPE01000696 | ref XM_003007308.1 | 205,84 | 289,85 | aldehyde dehydrogenase |
| ABPE01002781 | ref XP_003007938.1 | 304,66 | 17,86 | conserved hypothetical protein |
| ABPE01000172 | ref XM_003008632.1 | 389,40 | 14,75 | mRNA DOMAIN DNA polymerase III subunits gamma and tau |
| ABPE01000318 | ref XM_003008893.1 | 613,66 | | 60S acidic ribosomal protein P1 |
| ABPE01003149 | ref XM_003001992.1 | 153,95 | | plasma membrane-localized active transport protein for pantothenate |
| ABPE01003735 | nd | 656,93 | | nd |

nd, non identifié

9. Identification et annotation des contigs de *Va* V31-2 exprimés *in planta*.

Parmi les gènes s'exprimant différemment dans les pools Early, nous avons isolé 4 contigs de *V. alfalfae* VaMs.102 chez la lignée sensible. Ces 4 contigs font partie des 7 identifiés chez la lignée résistante (**Tableau III. 14**). On ne détecte pas de gènes spécifiquement exprimés dans la lignée F83005.5 qui pourrait éventuellement expliquer la sensibilité de cette lignée. Cela est en accord avec les observations en microscopie qui montrent que dans la phase précoce de l'infection, le pathogène est présent dans les deux lignées. Les gènes annotés ont une fonction dans le métabolisme primaire. La forte expression d'un gène codant pour un alcool déshydrogénase peut indiquer un métabolisme en situation d'hypoxie. A ce stade de l'infection, la biomasse du pathogène est encore très faible par rapport à celle de *M. truncatula*. Ce résultat montre la grande sensibilité de la méthode MACE.

10. Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié la réponse précoce de *M. truncatula* à *Va* V31-2 dans une interaction compatible et incompatible par une approche transcriptomique dans le but d'identifier les facteurs de résistance et de sensibilité. Notre dispositif expérimental a été basé sur la description du processus de colonisation du pathogène dans la lignée résistante A17 et la lignée sensible F83005.5. Cette étude comparative nous a permis d'identifier trois phases critiques dans la colonisation. Etant donné que l'élimination du pathogène a lieu dans les racines, nous avons décidé d'étudier les réponses racinaires.

Nous avons concentré notre analyse sur la phase précoce de l'infection en supposant que les gènes régulant la réponse de résistance chez A17 devraient montrer des modifications d'expression avant qu'on observe la disparition du pathogène. Pour l'analyse des données de séquençage, deux méthodes complémentaires ont été utilisées : l'identification des gènes qui s'expriment différemment en réponse à l'inoculation et l'analyse de réseaux de co-expression de gènes.

a) Les lignées résistante et sensible développent une réponse commune face à *Va* V31-2.

L'analyse comparative des gènes qui s'expriment différemment en réponse à l'inoculation indique qu'à ce stade de l'infection, les deux lignées sont capables d'activer une réponse commune. Cette réponse implique l'expression entre autres de gènes de la voie de biosynthèse des métabolites secondaires et la mise en place d'un stress oxydatif.

L'induction d'un **stress oxydatif** a été aussi observée chez le coton et la tomate en réponse à *V. dahliae* (Gayoso et al., 2010 ; Xie et al., 2013). Toutefois, il a été montré que ce n'est pas une condition déterminante pour la résistance contre la verticilliose. En effet, son induction dépend de l'espèce de plante mais aussi du mécanisme de défense étudié. Il a été reporté que l'expression de *SIVe1* protège *Nicotiana tabacum* et *N. glutinosa*, *N. benthamiana* et *A. thaliana* contre *V. dahliae*. Cependant, cette résistance s'accompagne de l'induction d'un stress oxydatif seulement chez la tomate, *Nicotiana tabacum* et *N. glutinosa* (Zhang et al., 2013b).

Le rôle du **métabolisme secondaire** dans les interactions plante-pathogène est bien connu (Bennett and Wallsgrove, 1994). C'est la réponse la plus communément observée suite à l'infection par *Verticillium* (Pegg and Brady, 2002 ; Fradin and Thomma, 2006 ; Klosterman et al., 2009). Elle constituerait la première barrière de défense. Chez l'olivier, il a été observé que ces molécules inhibent la croissance et la sporulation de *V. dahliae* (Báidez et al., 2007).

D'après nos résultats, l'induction de gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires et dans la production de ROS ne suffisent pas pour conférer une résistance chez F83005.5 contre *Va* V31-2.

- b) Des mécanismes de résistance sont inhibés chez la lignée sensible en réponse à *Va* V31-2 et d'autres sont induits chez la lignée A17.

Il est aussi possible que *Va* V31-2 produise des molécules capables d'inhiber l'expression des gènes chez la **lignée F83005.5**. L'analyse des **gènes significativement sous-exprimés** chez cette lignée sensible montre que les mécanismes de résistance sont inhibés (**Tableau III. 9**). Dans notre étude cytologique (**Figure I. 8**), nous avons observé que seule la lignée résistante est capable d'accumuler des composés phénoliques. La luzerne cultivée accumule aussi des métabolites secondaires dont la médicarpine et la sativine en réponse à *V. alfalfae* (Latunde-Dada and Lucas, 1986). Cependant, il a été montré que *V. alfalfae* tout comme les autres pathogènes de la luzerne est capable de dégrader la médicarpine (Soby et al., 1996), ce qui pourrait expliquer le fait que la lignée sensible soit incapable d'accumuler des métabolites secondaires.

La production de phytohormones est un des moyens utilisés par les pathogènes pour supprimer les mécanismes de défense de leurs hôtes (Baca and Elmerich, 1970 ; Zheng et al., 2012). Il est connu que *V. alfalfae* produit de l'ET (Pegg and Brady, 2002). Il a aussi été montré que certains effecteurs de pathogènes peuvent modifier l'expression des gènes de leur hôte de façon directe. En exemple, on peut citer AvrBs3 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* qui joue le rôle de facteur de transcription activant l'expression de gènes de son hôte (Bonas et al., 1989 ; Boch et al., 2009). *V. dahliae* et *V. alfalfae* produisent des NEPs (Klosterman et al., 2011). Ce sont des effecteurs qui provoquent l'induction de la voie de l'ET ainsi que des nécroses chez les hôtes de *Verticillium* (Wang et al., 2004 ; Gijzen and Nürnberger, 2006).

En ce qui concerne la **lignée résistante**, on observe l'induction de plusieurs gènes qui codent pour **des protéines de défense telles que les Bet v1, des chitinases, des PR10 ou encore RPM1** (**Table S. 1**). Zhang et al., (2013a) ont observé que la famille des Bet v1 était la plus représentée dans le transcriptome du coton en réponse à *V. dahliae*, ce qui indiquerait que les Bet v1 sont des

composants essentiels dans la résistance contre *Verticillium*. RPM1 est une protéine de type NBS-LRR qui permet la reconnaissance des effecteurs de type III de *P. syringae* *avrRpm1* ou *avrB*, et la résistance se manifeste par une HR (Boyes et al., 1998). Il reste à savoir si *V. alfalfae* possède des effecteurs homologues à *avrRpm1* ou *avrB*.

c) Rôle des voies hormonales dans la réponse à *Va V31-2*

Les voies hormonales jouent un rôle essentiel dans la signalisation des mécanismes de défense. Parmi les gènes induits chez la lignée F83005.5, on trouve des gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation des voies hormonales telles que la voie de JA, ET et l'auxine (Tableau III. 13). Il semble donc que contrairement à ce que les traitements exogènes suggèraient, ces trois voies ne seraient pas impliquées ou ne joueraient pas un rôle majeur dans la résistance contre *V. alfalfae* chez *M. truncatula*. En ce qui concerne la voie de JA, nous avons observé que son activation par des traitements exogènes favorise la croissance de *Va V31-2 in planta* (Chapitre II). Il est donc possible que l'activation de cette voie augmente la sensibilité à *V. alfalfae*.

La voie de JA est nécessaire pour la résistance *VeI*-dépendante alors que c'est la voie de SA qui est nécessaire dans la résistance *GbVeI*-dépendante (Fradin et al., 2011 ; Zhang et al., 2013a). Il est à noter que dans le cas de *GbVeI*-dépendante, l'expression de *GbVeI* peut être induite par des traitements de SA mais aussi d'ET et de MeJA (Zhang et al., 2012). La signalisation hormonale de la résistance de *M. truncatula* contre *Va V31-2* serait donc différente de ces deux mécanismes de défense.

Etant donné que le traitement exogène d'ABA protège la lignée sensible contre *Va V31-2*, que la voie d'ABA est réprimée chez la lignée sensible mais serait induite chez la lignée résistante, cela renforce l'idée que cette voie joue un rôle important dans la résistance de *M. truncatula* contre *Va V31-2*.

d) Identification de gènes impliqués dans la signalisation de la résistance contre *Va* V31-2

Lorsqu'une plante est exposée à un stress, elle met en place un ensemble de modifications dans l'expression de son génome pour pouvoir se protéger. Dans le cas de la réponse à un pathogène, la PTI constitue la première barrière de défense qui permet de bloquer la progression de l'agent pathogène (Jones and Dangl, 2006 ; Zhang and Zhou, 2010). La seconde barrière, l'ETI, est activée par la reconnaissance des effecteurs produits par le pathogène (Nürnberger et al., 2004). L'analyse des réseaux de gènes co-exprimés nous a permis d'identifier un module central de réponse à *Va* V31-2 chez la lignée résistante. Ce module peut nous permettre d'identifier des régulateurs potentiellement impliqués dans la résistance. Dans ce module, on trouve plusieurs récepteurs kinases, de MAP Kinases et des facteurs de transcription.

Plusieurs **gènes impliqués dans la PTI** ont été identifiés dans notre étude. Un gène code pour CERK1, un récepteur de la chitine qui est un inducteur général de défense (Kaku et al., 2006 ; Miya et al., 2007). D'autres gènes codent pour des chitinases (**Tableau III. 8**) et peuvent donc provoquer la libération d'éliciteurs (fragments de chitines) ce qui va contribuer au renforcement des mécanismes de résistance (Adams, 2004 ; Hongmei and Guiliang, 2005). Nous pouvons donc suggérer que les chitinases peuvent jouer un rôle essentiel dans la résistance contre *V. alfalfae* chez *M. truncatula*.

PRK5 est un Récepteur Kinase dont le domaine extracellulaire possède un site de fixation du ligand fixé par la famille des PR5 (Wang et al., 1996). Il est donc possible que PRK5 fixe les mêmes ligands que les PR5. Ces derniers fixent spécifiquement les monomères de β -1,3-glucanes et hydrolysent les polymères de β -1,3-glucanes qui sont des constituants de la paroi fongique (Osmond et al., 2001). Le rôle exact de PRK5 dans les mécanismes de défense reste encore à définir.

Un homologue de **BAK1** aussi connu sous le nom de *SERK3/BAK1* a été détecté. Certains récepteurs de type PRR tels que FLS2, Ve1 et EFR nécessite BAK1 pour la transmission du signal dans le cytoplasme (Fradin et al., 2009). Parmi les récepteurs identifiés, figure aussi un orthologue d'**EFR**.

EFR est surtout décrit pour être impliqué dans la résistance contre des bactéries (Zhang and Zhou, 2010). Il nous reste à savoir si une interaction entre BAK1 et EFR est aussi nécessaire pour la résistance contre *V. alfalfae*.

La perception des PAMPs provoque une dépolarisation de la membrane provoquant une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique (Jeworutzki et al., 2010). CNGC10 dont le gène est présent dans le module de résistance est impliquée dans la signalisation calcique. Il est connu que l'homéostasie calcique joue un rôle dans les mécanismes de défense des plantes (Lecourieux et al., 2006). La réponse calcique a été identifiée comme étant induite dans le transcriptome du coton en réponse à *V. dahliae* (Zhang et al., 2013).

La recherche d'homologues des **MAP kinases** dont les gènes étaient présents dans le module de résistance nous a permis d'identifier des homologues de *BAK1*, *MKK2* (aussi appelée *MEK2*) et *NDR1*. Les gènes *NDR1*, *BAK1* et *MKK2* sont nécessaires pour la résistance Ve1-dépendante (Fradin et al., 2009 ; Fradin et al., 2011). *NDR1* et *MKK2* sont également nécessaires dans la résistance GbVe1-dépendante (Zhang et al., 2012). C'est possible que ces gènes soient aussi nécessaires dans la résistance observée chez A17.

HSP90 est une protéine chaperone qui fixe et régule l'activité de protéines de défense dont RPM1 dans la résistance contre *Pseudomonas syringae* (Hubert et al., 2003 ; Sangster and Queitsch, 2005). La présence de ces deux partenaires dans ce module renforce l'idée de l'implication de RPM1 dans la résistance contre *Va* V31-2.

La recherche de miR qui seraient potentiellement impliqués dans la régulation de la réponse à *Va* V31-2 nous a permis d'identifier le **miR2119** comme étant un candidat dans la réponse à *Va* V31-2. En effet, non seulement il est induit en réponse à l'inoculation et cible un nombre de gènes réduit mais il est aussi connu pour être impliqué dans la régulation des interactions entre les plantes et les microorganismes dont les mécanismes symbiotiques (Arenas-Huertero et al. 2009 ; Lelandais-Brière et al. 2009).

Cependant, parmi ces candidats, on trouve aussi le **miR482** dont les cibles sont conservées entre la tomate et *M. truncatula* (Zhai et al. 2011 ; Li et al. 2012 ; Shivaprasad et al. 2012). Il cible des NBS-LRR qui sont des protéines nécessaires pour le système immunitaire chez les plantes (Jones et Dangl 2006). Il a été observé que le miR482 est réprimé chez le coton en réponse à *V. dahliae*. De plus, cette répression de l'expression du miR coïncide avec l'induction de plusieurs NBS-LRR cibles (Zhu et al. 2013). Etant donné que ces cibles sont conservées chez *M. truncatula*, il serait intéressant d'étudier si le miR482 joue le même rôle dans la résistance contre *Va* V31-2.

En ce qui concerne les miR non annotés, il se peut que ceux-ci ne s'expriment pas dans les conditions étudiées dans la littérature ou qu'ils nécessitent un niveau de séquençage plus profond pour être découverts. Parmi eux, certains ont pour cible prédites des gènes de défense comme HELIUM_0000:6:17:4932:20530 et AZOTE_0001_61FVGAAXX:1:39:8758:8911. Le fait qu'ils soient encore non caractérisés ne constitue pas une barrière pour leur validation fonctionnelle.

e) A17 exprime une résistance *VeI*-indépendante et *AveI*-indépendante.

VeI permet une résistance contre les souches portant l'effecteur *AveI* alors que *GbVeI* permet une résistance contre des souches qui ne portent pas *AveI* (Zhang et al., 2012). Ceci souligne l'existence d'un autre effecteur qui est reconnu par le récepteur *GbVe1*. La caractérisation de la souche *Va* V31-2 révèle que celle-ci ne possède pas le gène qui code pour *AveI*. De plus, aucun homologue du récepteur *VeI* n'a été identifié dans le transcriptome de *M. truncatula*, ce qui indiquerait l'existence d'un autre récepteur impliqué dans la reconnaissance de *Va* V31-2. Contrairement aux deux autres mécanismes, la résistance que nous avons identifiée permet d'éliminer totalement le pathogène des vaisseaux du xylème. De plus RPM1 n'a pas encore été détecté comme jouant un rôle dans la résistance contre *Verticillium*. Nous sommes donc en présence d'un tout nouveau mécanisme de défense qui reste encore à élucider.

D. Discussion générale

Le genre *Verticillium* est composé de dix espèces phytopathogènes qui provoquent d'importants dommages économiques essentiellement dans les régions tempérées et subtropicales (Inderbitzin et al., 2013). Ces champignons causent des maladies de flétrissement vasculaire exclusivement chez les dicotylédones incluant des hôtes comme le coton, la tomate, la luzerne cultivée, la pomme de terre, le houblon, le tournesol, le concombre et le chou (Heale, 2000). Les agents causaux les plus communément rencontrés sont *V. dahliae*, *V. nonalfalfae*, *V. longisporum* et *V. alfalfae*. Dans le travail de thèse présenté ici nous avons pu mettre en évidence des mécanismes qui permettent à la lignée A17 de *M. truncatula* de résister à l'infection par *V. alfalfae* V31-2, mais aussi des dysfonctionnements menant à la sensibilité.

1. La lignée A17 de *M. truncatula* élimine *V. alfalfae* V31-2 au niveau racinaire

La mise à jour récente de la taxonomie du genre *Verticillium* a permis d'ériger les souches adaptées à la luzerne en une nouvelle espèce à savoir *V. alfalfae* (Inderbitzin et al., 2013). Tout comme *V. dahliae* et *V. longisporum*, *V. alfalfae* se comporte comme un pathogène du sol produisant des structures de survie qui peuvent persister plusieurs années dans le sol en absence d'hôtes (Pegg and Brady, 2002).

Nos études montrent que contrairement à *V. dahliae* et *V. longisporum*, *V. alfalfae* est incapable d'infecter son hôte sans une blessure facilitant l'entrée. De même, Calpas and Rahe, (1995) n'ont pas pu ré-isoler le pathogène à partir de plantes de *M. sativa* inoculées sans blessure. Un contact direct avec les vaisseaux du xylème est donc nécessaire, ce qui explique que l'infection se fait essentiellement par l'intermédiaire de matériaux de fauchage contaminés (Grau et al., 1991). Après infection, le processus de colonisation de *V. alfalfae* est semblable à celui des autres espèces de *Verticillium* (Eynck et al., 2007 ; Vallad and Subbarao, 2008 ; Maruthachalam et al., 2013 ; Zhao et al., 2014). D'après ces observations, *V. alfalfae* serait un pathogène opportuniste. A notre

connaissance, c'est la première fois qu'une souche marquée avec la GFP a été utilisée pour étudier les mécanismes d'infection et de colonisation de *V. alfalfae*.

C'est aussi la première fois qu'une étude a été réalisée dans le but de comparer le processus d'infection et de colonisation de *V. alfalfae* dans des interactions compatible et incompatible. Nos analyses ont montré clairement que la lignée A17 inhibe totalement la croissance de *V. alfalfae* au niveau des racines. A17 est toute aussi asymptomatique si l'inoculation est faite par fauchage, sur la partie foliaire (Ben et al., 2013). La résistance de la lignée s'exprime donc aussi bien dans les racines que dans les parties foliaires, et il sera intéressant d'étudier si les mêmes gènes et mécanismes interviennent dans les deux parties de la plante. La résistance d'A17 est différente de celle observée chez la tomate, le coton et la laitue. En effet, c'est la première fois, qu'une élimination totale du pathogène a été observée. Chez la tomate, Nachmias et al., (1987) avaient observé que la résistance contrôlée par *Ve1* n'avait pas d'effet sur la colonisation des racines par le pathogène. Cette résistance restreint la colonisation à la partie racinaire, et empêche la colonisation de la tige et de la partie foliaire (Tjamos and Smith, 1975 ; Gold et al., 1996). Chez le coton, la différence entre un cultivar résistant et un cultivar sensible repose sur la quantité de vaisseaux colonisés et la production de spores *in planta* (Garber, 1960). En effet, *V. dahliae* est capable d'infecter et de coloniser les cultivars résistants et sensibles, toutefois les cultivars résistants sont capables de minimiser l'étendue de la colonisation en inhibant la production de spores chez le pathogène (Zhang et al., 2013a). Enfin chez la laitue, la résistance repose sur la capacité de la plante à éliminer les racines latérales infectées ou à empêcher la progression du pathogène vers les parties foliaires (Vallad and Subbarao, 2008). La capacité de l'hôte à empêcher la colonisation de la partie foliaire semble être un élément clé dans la résistance chez d'autres pathogènes vasculaires comme *F. graminearum* (Schroeder, 1955).

Le fait de ne pas observer des symptômes n'est pas suffisant pour déclarer que la plante est résistante puisque les hôtes du genre *Verticillium* peuvent être tolérants (Robb, 2007). Etudier la colonisation reste donc le seul moyen pour pouvoir faire la différence entre un hôte tolérant et un hôte résistant. Dans le cas de *V. alfalfae*, Larsen et al. (2007) ont montré que des plantes de *M. sativa* asymptomatiques étaient colonisées par le pathogène. Notre équipe a aussi observé le phénomène de tolérance chez *M. truncatula* vis-à-vis de *V. alfalfae* grâce à des études de ré-isollement du pathogène à partir de plantes inoculées au sein d'une collection de 215 accessions (Mazurier et al., données non publiées). Plusieurs lignées étaient asymptomatiques mais contenaient V31-2 dans leurs parties aériennes. Des travaux de l'équipe ont montré que plusieurs QTL sont impliqués dans la résistance contre *V. alfalfae* chez *M. truncatula* (Ben et al., 2013). Il est possible que certains contrôlent une tolérance et non une résistance. Chez *Arabidopsis thaliana* il a été démontré que des *loci* différents étaient impliqués dans le contrôle des symptômes et de la colonisation (Häffner et al., 2010). Des études sur ces différents mécanismes chez *M. truncatula* seront entreprises dans le futur. Un découplage génétique au niveau des mécanismes impliqués dans l'inhibition du développement du pathogène et l'inhibition des symptômes pourrait être lié au fait que les espèces du genre *Verticillium* produisent des toxines (Fradin and Thomma, 2006). Ces toxines sécrétées dans le milieu de culture du champignon peuvent être de nature diverse (Yuan et al., 2006). Plusieurs de ces composés produits par *Verticillium* *in vitro* ou *in planta* provoquent du flétrissement foliaire et des nécroses chez différents hôtes (Pegg and Brady, 2002). Certains auteurs les mentionnent comme étant des toxines et d'autres comme étant des éliciteurs de mort cellulaire (Robb, 2007). Ces toxines peuvent être des peptides qui ont des effets cytotoxiques comme VdNEP et PevD1 (Wang et al., 2004; Bu et al., 2014), des enzymes avec une activité pectinolytique (Cronshaw and Pegg, 1976), ou encore être des composés du métabolisme secondaire comme l'alboatrin (Ichihara et al., 1988). La résistance à de telles toxines a été explorée comme outil pour la sélection de variétés résistantes de luzerne, mais les résultats n'étaient pas toujours concluants (Ireland and Leath, 1987).

Notre compréhension de la nature et du rôle exact des toxines fongiques n'est qu'à ces débuts. L'absorption des filtrats de culture de *V. alfalfae* par les tiges des plantes de *M. truncatula* a induit des symptômes de chloroses et de flétrissements foliaires chez A17 comme chez F83005.5 (Martina Rickauer, observations personnelles). Ces observations semblent indiquer que la lignée A17 résiste contre l'infection mais pas contre l'induction des symptômes par des toxines du champignon. La même chose est observée chez le colza (Eynck et al., 2009) et la tomate (Nachmias et al., 1987). En effet, la résistance *VeI*-dépendante ne protège pas les plantes de tomate contre les effets des toxines (Robb, 2007). VdNEP est sécrétée par *V. dahliae* et induit des symptômes de flétrissement chez le coton (Wang et al., 2004). Ce peptide est conservé chez tous les pathogènes vasculaires séquencés dont *V. alfalfae* (Klosterman et al., 2011). A faible concentration, celui-ci induit un ensemble de mécanismes qui permet l'augmentation de la résistance contre *V. dahliae* chez le coton (Wang et al., 2004). Cette toxine induit chez le coton un stress oxydatif, la production de phytoalexines et l'expression de gènes codant pour des PR protéines (Davis et al., 1998). PevD1 qui est également sécrété par *V. dahliae* induit aussi plusieurs mécanismes de défense tels que la production de métabolites secondaires, la lignification et l'induction de la PAL chez le coton (Bu et al., 2014). Il ne serait donc pas étonnant que les plantes possèdent des mécanismes de réponses spécifiques pour ces toxines comme dans le cas des effecteurs de type III. L'étude de ces mécanismes est nécessaire pour comprendre l'ensemble des mécanismes impliqués dans la réponse à *Verticillium*.

2. Analyse de la signalisation de la résistance contre *V. alfalfae* chez *M. truncatula*.

Nous avons étudié les mécanismes de résistance et de sensibilité à *V. alfalfae* par une approche transcriptomique en utilisant les lignées A17 et F83005.5 qui sont respectivement résistante et sensible (Ben et al., 2013). De plus, nous avons cherché à élucider la signalisation hormonale de la réponse de défense par des traitements exogènes de phytohormones.

a) Analyse de la signalisation de la PTI et ETI

En réponse à un agent pathogène, les plantes mettent en place des mécanismes de défenses préformées et inductibles pour se défendre. La PTI constitue la première barrière de réponse qui a pour but de contenir le pathogène et d'empêcher la colonisation. L'ETI constitue la deuxième barrière qui se met en place suite à la reconnaissance des effecteurs (Nürnberger and Brunner, 2002 ; Jones and Dangl, 2006). Notre analyse transcriptomique nous a permis d'identifier plusieurs groupes de gènes qui codent pour des LRR-RLKs, des NB-LRRs, des gènes impliqués dans la signalisation et des facteurs de transcription qui sont induits chez A17 en réponse à *Va* V31-2.

Des gènes qui codent pour **des protéines impliquées dans la perception des PAMPs** ont été identifiés tels que le gène codant pour CERK1, un récepteur de la chitine (Miya et al., 2007). Nous avons aussi identifié des gènes de chitinases qui, comme leur nom l'indique, sont des enzymes qui dégradent la paroi des champignons permettant la libération de fragments de chitines renforçant ainsi la défense (Adams, 2004). *PRK5* code pour une protéine récepteur kinase dont le domaine extracellulaire permettant la fixation au ligand appartient à la famille des PR5 (Wang et al., 1996). Il est donc possible que PRK5 fixe les mêmes ligands que PR5. Or les PR5 fixent et hydrolysent spécifiquement les β -1,3-glucanes qui sont des constituants de la paroi fongique et d'oomycètes

(Osmond et al., 2001). Le rôle exact de PRK5 dans les mécanismes de défense reste encore à définir. BAK1 (aussi connu sous le nom de SERK3/BAK1) est nécessaire pour la fonction de certains PRRs qui ne possèdent pas de domaine de signalisation cytoplasmique comme *Ve1* (Heese et al., 2007 ; Wang et al., 2010 ; Fradin et al., 2014). BAK1 interagit aussi avec le récepteur EFR dont nous avons également identifié le gène dans le transcriptome (Heese et al., 2007). EFR reconnaît spécifiquement elf18/elf26, un éliciteur dérivé du facteur d'élongation bactérien EF-Tu (Zipfel et al., 2006). Par une analyse par Blast réalisée en utilisant la séquence protéique de l'EF-Tu de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (identifiant Genbank : Q889X3.1), nous avons identifié un homologue d'EF-Tu chez *V. alfalfae*. Il reste à démontrer un rôle du complexe EFR-BAK1 dans la réponse *V. alfalfae* chez *M. truncatula* et si l'homologue d'EF-Tu est produit dans les conditions de l'interaction. Suite à la reconnaissance des PAMPs par les PRRs, on observe une dépolarisation de la membrane qui provoque une augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytoplasmique (Jeworutzki et al., 2010). Un gène codant pour le transporteur de calcium CNGC10 est induit chez A17. Nous avons aussi identifié le gène codant pour MEK2, une MAP-kinase nécessaire pour la signalisation de la PTI (Rasmussen et al., 2012).

Des gènes codant pour **des protéines impliquées dans la signalisation des mécanismes de défense** ont été identifiés également. Parmi ces gènes, il y a les gènes qui codent pour NDR1, EDR1 et RPM1. *NDR1* est nécessaire pour l'activité de plusieurs gènes R de type CC-NB-LRR. NDR1 est activé par la protéine R RPM1 (Aarts et al., 1998). EDR1 est une MAP-kinase qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activation des cascades de MAPK et joue donc un rôle essentiel dans la régulation des mécanismes de défense (Zhao et al., 2014a). Concernant la résistance contre *Verticillium*, les mécanismes de signalisation les plus caractérisés sont ceux de la tomate qui impliquent *Ve1* et ceux du coton qui impliquent *GbVe1* (Fradin et al., 2009 ; Zhang et al., 2012). Les analyses génétiques montrent que dans le cas de *Ve1*, les gènes *EDS1*, *NDR1*, *BAK1* et *MEK2* sont impliqués (Fradin et al., 2009). Dans le cas de *GbVe1*, il a été montré que *NDR1* et *MKK2* sont nécessaires pour la résistance (Zhang et al., 2012). A part cet aspect de la signalisation, ces deux

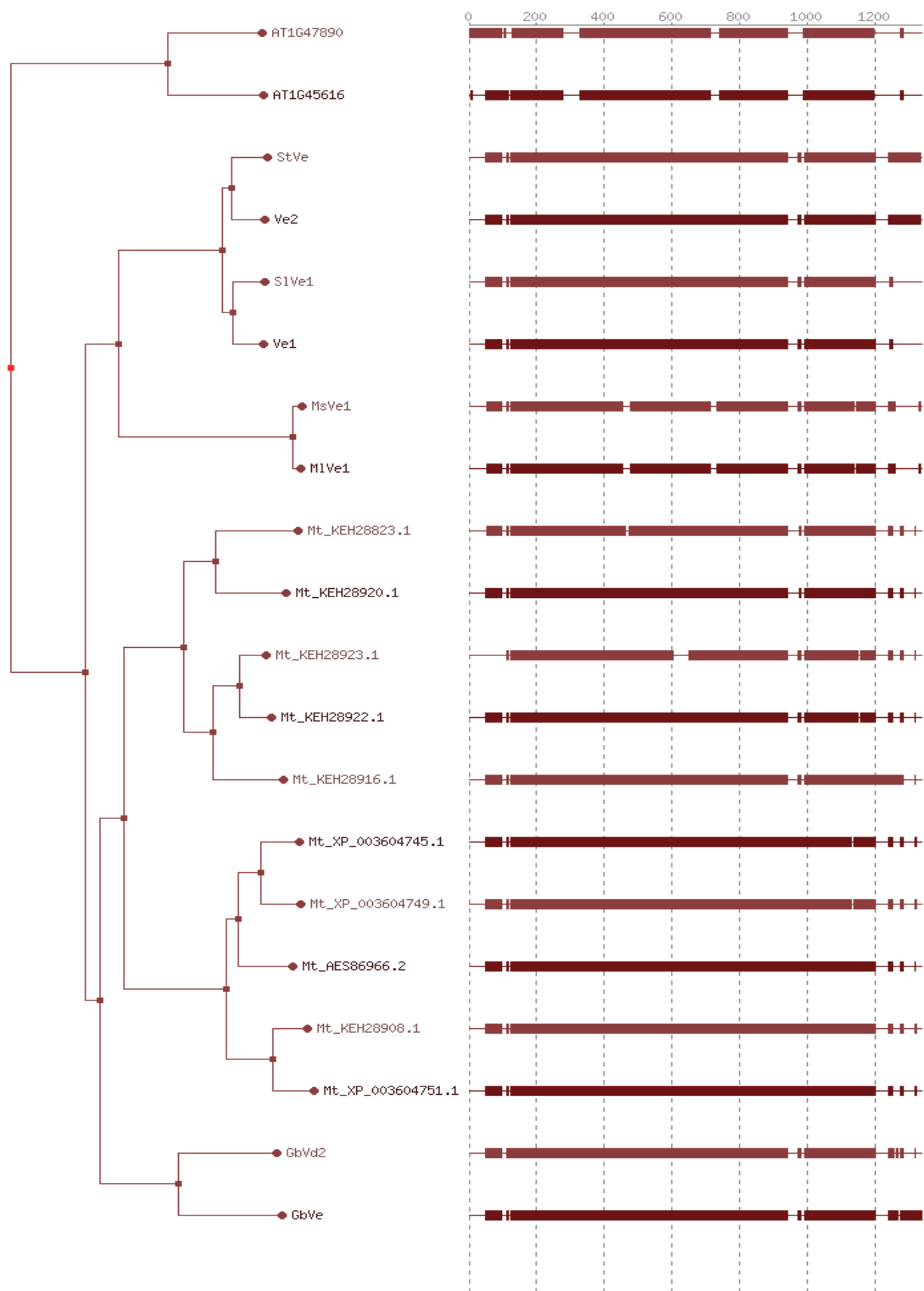


Figure D. 2 : Arbre phylogénétique des protéines Ve-like. Alignement des 10 homologues les plus proches de Ve1 identifiés chez *M. truncatula* avec GbVe (EU855795), GbVd2 (GU299534, StVe (AY311527), Ve1 (AF272367), Ve2 (AF365929), et deux gènes d' *A. thaliana*, AT1G47890 et AT1G45616 avec un seuil de 50%. Mt, *M. truncatula*.

mécanismes sont tout à fait différents. En effet, *Ve1* permet une résistance contre les souches produisant l'effecteur *Ave1* alors que *Gbve1* permet une résistance qui n'est pas race-spécifique (Zhang et al., 2012). *GbVe1* reconnaît donc un effecteur encore inconnu et différent d'*Ave1*. Nous avons cherché des homologues de *Ve1* et *GbVe1* chez *M. truncatula*. **Les homologues identifiés ne présentent pas un fort degré d'identité avec (Ben et al., 2013), et les séquences les plus proches de Ve1 (Figure D. 2) ne sont pas exprimées dans nos banques.** De plus, la caractérisation moléculaire de *Va V31-2* montre que celle-ci ne possède pas le gène qui code pour l'effecteur *Ave1* (Figure I. 1). En tenant compte de nos analyses et de la littérature, nous pouvons conclure que chez *M. truncatula* lignée A17 nous sommes en présence d'un mécanisme de résistance différent des résistances *Ve1* et *GbVe1* dépendantes.

Les parois cellulaires des plantes ne sont pas uniquement des barrières physiques mais sont capables de percevoir les modifications provoquées par les pathogènes et de les convertir en signaux intracellulaires. Parmi les gènes codant pour des protéines qui sont impliquées dans les **mécanismes de résistance liés à la paroi**, nous avons identifié des homologues de *Wat1* (*walls are thin 1*) et *MLO2* (*mildew resistance locus O 2*). Les protéines MLOs sont impliquées dans la résistance contre le Mildiou chez l'orge (Consonni et al., 2006). Elles sont localisées au niveau de la membrane plasmique, et des études avec *A. thaliana* ont montré qu'elles empêchent la pénétration du mildiou en inhibant l'élongation des hyphes avant et après l'entrée du pathogène dans la cellule (Nakao et al., 2011). *AtWAT1* code pour un homologue de la *Nodulin 21* de *M. truncatula*. *MtN21* est un transporteur membranaire de la famille des "drug/metabolite exporter" qui est essentiel pour la formation des parois secondaires (Ranocha et al., 2010). Le mutant *wat1* est plus résistant contre les pathogènes vasculaires dont *R. solanacearum*, *Xanthomonas c* pv. *Campestris*, *V. dahliae*, *V. albo-atrum* et *Plectosphaerella cucumerina*. Cependant, ce mutant est incapable de stopper la progression de *R. solanacearum* vers la partie foliaire. *Wat1* est donc nécessaire pour inhiber la colonisation systémique des pathogènes vasculaires (Denancé et al., 2013). On observe chez le mutant *mlo2* une activation de la voie de SA et chez le mutant et *wat1* une répression de la voie de

l'auxine. *Wat1* et *Mlo2* sont donc nécessaires pour l'activation de la voie de l'auxine dans son antagonisme à la voie de SA. Il est nécessaire de rappeler que la voie de SA n'est pas impliquée dans la résistance contre le mildiou chez le blé ni contre *V. dahliae* chez la tomate (Consonni et al., 2006 ; Fradin et al., 2011). L'induction des homologues de *Wat1* et *Mlo2* chez *M. truncatula* en réponse à *Va* V31-2 suggère fortement une activation de la voie de l'auxine et non celle de SA.

b) Analyse de la signalisation hormonale

La signalisation hormonale joue un rôle essentiel dans la PTI et l'ETI. De façon générale, on observe un antagonisme entre la voie de SA et les voies JA et ET (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Une autre interaction antagoniste implique la voie de SA et la voie de l'auxine et existe particulièrement au niveau des racines (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Nous avons montré dans ce travail que les prétraitements de plantes de *M. truncatula* avec SA, ABA, IAA et ACC augmentent la tolérance contre *Va* V31-2, tandis que le MeJA n'avait pas d'effet. Cependant, le niveau de résistance observé n'est pas le même pour toutes les molécules. Dans le cas du traitement avec l'ACC, nous avons plutôt observé un ralentissement du développement de la maladie. Un classement par ordre d'efficacité donnerait ABA>SA>IAA>ACC. L'étude de la colonisation par quantification de l'ADN du pathogène *in planta* montre que les traitements avec ces hormones inhibent la croissance du pathogène. D'un autre côté, l'analyse GO term des gènes identifiés par l'étude transcriptomique indique que les voies d'ABA, de l'auxine, d'ET et des brassinostéroïdes sont induites chez la lignée résistante en réponse à *V. alfalfae*. Chez la lignée sensible nous avons aussi observé une induction de la voie JA, ET et de l'auxine, mais une répression de la voie d'ABA. Aucun gène lié directement à la voie de SA comme PR1 ou NPR1 n'a été identifié dans le transcriptome que ce soit chez A17 ou chez F83005.5. Malgré le fait qu'un traitement par le SA protège les plantes sensibles contre V31-2, cette voie ne semble donc pas être induite dans la lignée résistante. Ce résultat illustre que des traitements exogènes ne permettent pas de conclure définitivement quant au rôle d'une hormone.

Il faut cependant garder dans l'esprit que l'analyse transcriptomique porte sur une période jusqu'à 24 h après inoculation seulement.

Nos observations suggèrent fortement que la voie d'ABA est susceptible d'être impliquée dans la mise en place de la résistance chez A17. Seule l'analyse de l'inactivation endogène à savoir par un mutant de signalisation permettrait de confirmer cette hypothèse. Les données dans la littérature indiquent l'implication des voies de signalisation hormonales différentes dans la résistance *Ve1*-dépendante et *GbVe1*-dépendante. L'étude de la réponse de mutants des voies de signalisation hormonale chez *A. thaliana* montre que la voie de SA est impliquée dans la résistance *GbVe1*-dépendante (Zhang et al., 2013b), tandis que c'est la voie de JA qui est nécessaire pour la résistance *Ve1*-dépendante (Fradin et al., 2011). Toutefois, il a été observé que l'expression de *GbVe1* est activée par des traitements exogènes d'ET, SA et JA, et qu'il y a des motifs de régulation de ces voies au niveau des promoteurs du gène. Il est donc possible que *GbVe1* soit régulé par un réseau de signalisation multi-hormonal (Zhang et al., 2013b).

La voie de l'ET joue un double rôle dans les mécanismes de défense contre *Verticillium* (Robison et al., 2001a). En effet, l'activation de la voie par des traitements exogènes mais aussi son blocage par un inhibiteur ou par mutation augmentent les réponses de défenses chez *A. thaliana* en réponse à *V. dahliae* et *V. albo-atrum* race 1 (Robison et al., 2001 ; Robison et al., 2001b ; Fradin et al., 2011). Les traitements exogènes d'ET par le biais de l'ACC ont provoqué un ralentissement de l'évolution de la maladie et de la colonisation par le pathogène chez la lignée sensible F83005.5. Contrairement aux études antérieures menées dans notre laboratoire qui montraient une augmentation de la résistance à *Va* V31-2 chez le mutant *sk1* (mutant d'*EIN2* dérivé de la lignée résistante, A17) (Ben et al., 2013), je n'ai pas pu observer ce phénotype en condition hydroponique. Cela pourrait indiquer un effet de l'environnement sur la voie de l'ET. Une autre explication serait qu'il y a un ralentissement de la senescence chez le mutant *sk1*, ce qui ferait que les plantes sont mieux portantes

que les plantes sauvages (Grbić and Bleecker, 1995) et que cet effet est dépendant de l'environnement.

Le traitement exogène avec SA a protégé la lignée sensible contre *Va* V31-2. Pour pouvoir mener des études plus directes sur l'implication de la voie SA, nous avons cherché un mutant dans la collection des mutants *Tnt1*. Nous avons identifié la lignée NF2859 comme étant muté sur un gène NPR1. Des descendants ont été dérivés à partir des graines reçues de The Samuel Roberts Noble Foundation. Leur caractérisation moléculaire est en cours pour l'identification et la fixation des mutants.

c) Autres voies de signalisation

Nous avons observé qu'en réponse à l'infection par *V. alfalfae*, la lignée résistante induit une réponse de défense très coordonnée permettant l'activation des gènes adaptés pour la mise en place de la résistance contrairement à ce qu'on observe chez la lignée sensible. Cette reprogrammation de l'expression de gènes est corrélée avec l'induction de 11 facteurs de transcription qui seraient à l'origine de cette modification du transcriptome. En particulier, 8 facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'ET ont été identifiés dont des ERF (Figure III. 8). Trois autres ont été trouvés par une analyse Blast sur le Gene Atlas. Au total, 4 facteurs de transcription sont impliqués dans la réponse à l'ET. De plus, plusieurs gènes codant des ACC Oxydases ainsi que des gènes avec des annotations GO "response to ethylene stimulus" comme le gène de la *EBF1* (ein3-binding f-box protein 1) ont été isolés dans le transcriptome. Il devient évident que la voie de l'ET est activée en réponse à *V. alfalfae*. Cependant, cette voie d'ET est aussi activée chez la plante sensible, ce qui indiquerait que l'activation ne permet pas la résistance chez *M. truncatula*.

Parmi les autres familles de facteurs de transcription, on trouve MYB transcription factor, NAC1, bHLH et WRKY. Il existe 4 classes de facteurs de transcription MYB. Ils sont impliqués entre

autres dans le métabolisme primaire et secondaire, dans la morphogenèse cellulaire dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques et dans le développement des chloroplastes (Ambawat et al., 2013).

Les familles des NAC, MYB, WRKY et bHLH sont les plus représentées dans la réponse à *V. dahliae* chez le coton (Zhang et al., 2013b). Les WRKY jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense (Pandey and Somssich, 2009). Les facteurs de transcription NAC sont impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Les NAC1 sont particulièrement connus pour être impliqués dans la réponse aux pathogènes (Nuruzzaman et al., 2013). bHLH 93 est connu pour être impliqué dans la floraison chez *A. thaliana*. Un lien entre le temps de la floraison et la gravité des symptômes de *V. longisporum* a été observé chez *A. thaliana* (Häffner et al., 2010). La famille des "Zn-finger transcription factors" est notamment impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Davletova et al., 2005).

Grâce au projet MIRMED, nous avons commencé à étudier l'implication des miR dans la régulation de la résistance contre *V. alfalfae*. Nous avons observé d'un côté que des miR sont induits en réponse à l'infection (Formey et al., in press) et d'un autre coté nous avons identifié des cibles potentielles de miR parmi les gènes dans le réseau de régulation de la résistance contre *V. alfalfae*. Ainsi, nous avons pu dresser une liste de miR candidats pour une validation fonctionnelle. Parmi ces miR, certains ont pour cibles potentielles des gènes de défenses. Plusieurs nouveaux miR ont également été identifiés comme répondant différemment à l'infection. Dans l'interaction entre *V. dahliae* et l'aubergine (Yang et al., 2013) ou le coton (Yin et al., 2012), les miRomes montrent que plusieurs miR répondent différemment à l'inoculation. Certains de ces miR sont aussi différemment exprimé chez *M. truncatula* en réponse à *V. alfalfae*, comme le miR172. Celui-ci a pour cible plusieurs facteurs de transcription tels des bHLH et des AP2 qui régulent la voie de l'ET. Ces données suggèrent fortement que les miR pourraient intervenir dans la régulation de la résistance contre *V. alfalfae* chez *M. truncatula*.

3. Les molécules de défenses dans la réponse de la lignée A17 à V31-2.

Plusieurs gènes typiquement associés à la réponse de défense et la réponse aux stress ont été identifiés dans le transcriptome. Certains codent pour des protéines ayant un effet direct sur les pathogènes ou codant pour des enzymes impliqués dans la biosynthèse de molécules antimicrobiennes, tels des peroxydases, des chitinases, la PAL, des germin-like protéines, des PR10 et des Bet v1. Nos résultats sont en accord avec d'autres analyses transcriptomiques en réponse à *Verticillium* (Robb et al., 2012 ; Faino et al., 2012 ; Zhang et al., 2013a ; Zhang et al., 2013b ; Sun et al., 2013). Les gènes codant pour des Bet v1 sont particulièrement induits chez le coton en réponse à *V. dahliae* (Zhang et al., 2013) ce qui indiquerait des similitudes entre la réponse observée chez le coton et celle chez *M. truncatula*.

En plus des gènes codant pour des protéines de défenses, nous avons observé l'induction de gènes du métabolisme secondaire. Les métabolites secondaires jouent un rôle fondamental dans la résistance des plantes par leurs activités antimicrobiennes (Naoumkina et al., 2010). Ces composés sont aussi produits au cours du développement normal de la plante, dans ce cas on les appelle les phytoanticipines. Lorsqu'ils sont produits en réponse à un agent pathogène, on les appelle des phytoalexines (VanEtten et al., 1994). Leur biosynthèse fait intervenir plusieurs voies dont la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, des terpenoïdes, et des acides aminés aromatiques dont celle du tryptophane (Naoumkina et al., 2010 ; Iven et al., 2012). Plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de biosynthèses des phytoalexines tels que PAL, chalcone synthase, leucoanthocyanidin dioxygénase et terpène synthase sont induits chez *M. truncatula* en réponse à *V. alfalfae*. La médicarpine, un isoflavonoïde constitue la classe majoritaire des phytoalexines chez *Medicago* sp (Naoumkina et al., 2010). Il serait intéressant d'identifier et de comparer la composition de ces métabolites chez une plante résistante par rapport à celle d'une plante sensible.

E. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A ce jour, l'efficacité des méthodes de contrôle de la verticilliose utilisées par les producteurs de luzerne reste limitée du fait de la persistance de l'inoculum dans le sol et le développement vasculaire et systémique du pathogène. La culture de variétés résistantes reste le seul moyen efficace et durable. La luzerne étant une espèce tétraploïde, nous avons choisi de faire nos études sur la plante modèle *M. truncatula*. Ces travaux de thèse ont porté sur l'analyse comparative d'une interaction compatible et incompatible entre *V. alfalfae* et *M. truncatula* par des approches cytologiques et transcriptomiques. Nous avons pour objectif d'étudier le processus d'infection de *V. alfalfae*, les voies de signalisation des réactions de défense ainsi que les mécanismes de sensibilité. Les résultats montrent que suite à l'infection, la lignée résistante est capable d'éliminer *V. alfalfae* dans les toutes premières phases de l'infection. Cette élimination du pathogène coïncide temporellement avec la production de composés phénoliques. L'analyse du transcriptome de la phase précoce de l'infection indique que contrairement à la lignée sensible, la lignée A17 est capable d'induire rapidement un réseau de régulation structuré et coordonné permettant la mise en place de la résistance adaptée. Dans cette réponse de défense, nous avons identifié des gènes impliqués dans la signalisation des interactions plantes-pathogènes, des facteurs de transcription, des gènes de défenses ainsi que des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires. Ces résultats constituent une première étape vers la compréhension des bases moléculaires impliquées dans la résistance contre *V. alfalfae* chez les espèces de *Medicago*. En revanche, notre connaissance de cette signalisation reste encore partielle et surtout, nous n'avons pas encore identifié le gène nécessaire et suffisant pour la mise en place de la résistance de la lignée A17 vis-à-vis de la souche V31-2. Ce que nous pouvons dire c'est que cette résistance est différente de la résistance *VeI*-dépendante de la tomate et qu'on observe quelques similitudes avec la résistance *GbVeI*-dépendante identifiée chez le coton à l'exception du fait qu'il n'y a pas de gènes *Ve* chez *M. truncatula*. Nos résultats nous permettent de proposer un modèle de résistance totale *Ve* et *AveI* indépendante chez *M. truncatula*. Dans ce modèle, un facteur d'avirulence différent d'*AveI* serait reconnu par une protéine produite par un gène de résistance encore inconnu. Par la suite, un réseau

| | Tomate | Coton | <i>M. truncatula</i> |
|--------------------------------|---|---|---|
| Effecteur | <i>Ave1</i> | ? | ? |
| Gène de résistance | <i>Ve1</i> | <i>GbVe1</i> | ? |
| Voie de signalisation | <i>Serk3/Bak1</i> <i>NDR1</i> <i>Mek2</i> <i>EDS1</i> <i>NRC1</i> | <i>Serk3/Bak1</i> <i>NDR1</i> <i>Mek2</i> | <i>Serk3/Bak1</i> * <i>NDR1</i> * <i>Mek2</i> * <i>RPM1</i> * <i>EDR1</i> * |
| Signalisation hormonale | JA ET | SA ET* JA* | ABA* ET* IAA* |

Tableau VI. 1: Comparaison de la signalisation du mécanisme *Ve1*-dépendant, *GbVe1*-dépendant et du mécanisme de défense de la lignée A17. Un récepteur *Ve* est nécessaire et suffisant pour la résistance chez la tomate et le coton. La résistance *GbVe1*-dépendante n'est pas spécifique à la race de la souche et nécessite la voie de signalisation de SA contrairement à la résistance *Ve1*-dépendante. Dans le transcriptome d'A17, *SERK3/BAK1*, *NDR1*, *MEK2* sont induits ainsi que la voie de signalisation d'ABA, d'ET et celle de l'auxine. (Fradin et al., 2009 ; 2011 ; Zhang et al., 2012). La résistance développée par A17 ne nécessite pas *Ve1*, ni *Ave1*. * Validation génétique non réalisée.

de régulation impliquant les miR est activé permettant la mise en place d'un stress oxydatif, l'activation de la voie de signalisation de l'ET, de l'ABA et des brassinostéroïdes, la production de métabolites secondaires et l'expression de gènes de résistance. Plusieurs éléments restent encore à identifier pour compléter ce modèle (**Figure C. 1**). D'autres études concernant les mécanismes génétiques, moléculaires et biochimiques impliqués dans cette résistance nous permettront de mieux comprendre la résistance contre la verticilliose et ainsi identifier des outils qui pourraient être utiles aux producteurs pour améliorer le contrôle de *V. alfalfae*. Plusieurs angles seront particulièrement intéressants à étudier pour la suite de ce projet et sont présentés ci-après comme des questions auxquelles il faut répondre.

Question 1 : L'induction des mécanismes de résistance nécessite-t-elle la reconnaissance d'une protéine d'avirulence par un gène de résistance ?

Même si *V. alfalfae* arrive à germer et initier la colonisation des racines, la lignée A17 parvient à le supprimer totalement comme indiqué par les études cytologiques et par la quantification de l'ADN fongique par PCR quantitative. Les études transcriptomiques montrent que contrairement à la lignée sensible, A17 met en place une réponse de défense structurée orientée vers l'induction de gène de défense. D'autres résultats obtenus dans notre laboratoire montrent que la lignée A17 répond différemment selon les souches de *Verticillium*. En effet, A17 montre des symptômes lorsqu'elle est infectée par des souches de race 1 comme *V. dahliae* JR2 et *V. nonalfalfae* 5431, ou de race 2 comme *V. nonalfalfae* LPP0323 et Va1, et *V. alfalfae* Va2 ((Negahi et al., 2014 ; Sbeiti et al., données non publiées), même si ces symptômes sont plus faibles que ceux qu'on observe dans la lignée F83005.5 infectée par V31-2. D'autre part, les lignées de *M. truncatula* réagissent différemment en réponse à Va V31-2. Ainsi, les lignées A17, ESP048-F, ESP043-B, et F20058-6 sont résistantes et les lignées ESP095-C, TN9.4 et SA22322 sont tolérantes alors que les lignées F83005.5, TN8.28, SA07763 et

SA22323 sont sensibles (Mazurier et al., données non publiées). L'ensemble de ces observations semble indiquer que la résistance observée chez A17 serait de type gène pour gène.

La résistance gène pour gène est observée lorsque l'induction des mécanismes de défense dépend de la reconnaissance du produit d'un gène du pathogène (gène d'avirulence) par le produit d'un gène de l'hôte (gène de résistance). Il faudrait donc chercher des mutants sensibles de la lignée A17 pour identifier le gène de résistance ainsi que des mutants de la souche *Va* V31-2 pour identifier le gène d'avirulence.

Il n'est pas facile d'obtenir des mutants de *M. truncatula* par transformation génétique à cause de sa faible efficacité de régénération. Ces mutants devraient être obtenus par une méthode qui n'est pas soumise à l'efficacité de régénération telle que le traitement au méthanesulfonate d'éthyle (EMS).

C'est un long processus pour obtenir un mutant caractérisé et stable d'eucaryote. Nous pensons que l'utilisation des banques existantes nous permettrait de gagner du temps. A ce sujet, une banque de mutants obtenus par traitement au EMS est disponible au sein du projet RevGenUK (<http://revgenuk.jic.ac.uk>). L'idée serait d'identifier des mutants affectés dans des gènes impliqués dans les voies de signalisation hormonales par TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes). Il est aussi envisageable d'identifier le gène de résistance par cette méthode en criblant des mutants pour identifier ceux qui sont sensibles à *Va* V31-2.

Pour l'identification du gène d'avirulence, on pourrait commencer la production de mutants de *Va* V31-2. Etant donné que nous cherchons un gène particulier, une méthode de mutation qui permet une seule insertion dans le génome est préconisée. La production de mutants pourra être faite par transformation génétique par *A. tumefaciens*, comme cela a été fait pour l'introduction du gène GFP. Il sera cependant nécessaire d'améliorer le protocole pour obtenir un grand nombre de transformants. Cette méthode facilitera l'identification des gènes en utilisant les séquences d'*A. tumefaciens* comme repère.

Il est aussi envisageable d'utiliser la variabilité naturelle en augmentant notre collection de souches de *V. alfalfae*. Des essais d'inoculation sur A17 nous permettraient d'identifier deux groupes de souches. Un groupe de souches pour lequel A17 est résistante et un autre pour lequel A17 est sensible. Il faudrait certainement plusieurs dizaines de souches. La suite consisterait à séquencer ces souches et comparer les génomes des deux groupes de souches pour repérer une séquence codante commune à toutes les souches avirulentes et absente chez les souches virulentes.

La séquence codante identifiée serait clonée, séquencée pour identifier la protéine d'avirulence. Des essais d'agroinfiltration sur des feuilles d'A17 nous permettront de valider le gène candidat.

Question 2 : La partie racinaire est-elle le siège de la résistance contre la colonisation et la partie foliaire, le siège de la résistance contre les symptômes ?

Dans le domaine de la recherche concernant la verticilliose, l'idée d'un découplage entre la biomasse du pathogène *in planta* et l'apparition des symptômes commence à naître. La parfaite illustration de ce phénomène a été observée chez la tomate. En effet, il a été noté que les plantes qui portent le gène *VeI* sont sensibles aux toxines des souches de race 1. En revanche, lorsqu'on inocule la variété 'Craigella' (qui est sensible aux souches race 1) avec une souche de *V. dahliae*, on n'observe pas de symptômes malgré le fait que ses vaisseaux soient fortement colonisés (Robb, 2007). C'est la définition même de la tolérance. Fradin et Thomma (2006) suggèrent que la tolérance et ce découplage seraient dus aux toxines secrétées par *Verticillium sp.* Une glycoprotéine (Davis et al., 1998) et les deux peptides VdNEP (Wang et al., 2004) et PevD1 (Bu et al., 2014) produits par *V. dahliae* induisent des mécanismes de défense chez le coton, alors qu'à forte concentration, VdNEP et PevD1 induisent des symptômes typiques de la verticilliose (Wang et al., 2004 ; Bu et al., 2014). Il y'aurait donc certainement deux mécanismes de résistance distincts : l'un qui inhiberait la colonisation et l'autre qui inhiberait les effets des toxines. Chez *A. thaliana*, il existe

en effet deux *loci* de résistance distincts (Häffner et al. 2010) : l'un inhibe le développement du *V. longisporum* et l'autre inhibe l'expression des symptômes.

Dans notre laboratoire, des QTLs de résistance différents sur la même population de lignées recombinantes ont été détectés en utilisant deux souches différentes (*V. nonalfalfae* LPP0323 et *Va* V31-2) (Ben et al., 2013 ; Negahi et al., 2014). De plus, des tests préliminaires indiquent qu' A17 et F83005.5 développent des symptômes de verticilliose suite à un traitement avec un filtrat de culture de *Va* V31-2. Etant donné que ces deux lignées sont sensibles aux filtrats de cultures, il faudrait réaliser ces tests sur des lignées tolérantes à *Va* V31-2 pour identifier des lignées.

Verticillium provoque des flétrissements foliaires et produit des toxines. On pourrait se demander si le siège de la résistance aux toxines ne serait pas situé dans la partie foliaire. Après avoir identifié une lignée résistante aux filtrats de culture, il faudrait comparer les mécanismes de défense qui sont induits dans ses parties foliaires par rapport à ceux induits dans la partie foliaire des lignées A17 et F83005.5. Dans le cadre de notre étude transcriptomique, des échantillons des parties foliaires ont été prélevés dans les mêmes conditions que les échantillons racinaires. On pourrait réaliser une analyse par MACE sur ces échantillons aussi et ensuite comparer la réponse développée dans la partie foliaire par rapport à celle développée dans la partie racinaire.

Il serait également intéressant d'identifier les effecteurs de *Va* V31-2 pour étudier leurs modes d'action. La première approche serait d'analyser les gènes exprimés de *Va* V31-2 dans le pool tardif de notre étude transcriptomique qui est enrichi en séquences de *Verticillium*. La deuxième approche serait de purifier les toxines par des méthodes biochimiques.

Question 3 : Quelle est la contribution des voies de l'éthylène, de l'acide abscissique et des brassinostéroïdes dans la signalisation de la résistance contre V. alfalfae ?

Les études génétiques restent le seul moyen pour confirmer l'implication d'une voie de signalisation dans la réponse à un pathogène. Les études réalisées sur le mutant *sk1* dérivé de la lignée résistante A17 et affecté dans la signalisation de l'ET indiquent une augmentation de la

résistance (Ben et al., 2013). Pour étudier le rôle de la voie de SA, un mutant *npr1* dérivé de la lignée R108 a été identifié dans la banque des mutants *Tnt1* de The Samuel Roberts Noble Foundation. La réponse de ce mutant vis-à-vis du pathogène sera étudiée dans les prochains mois.

Ne disposant pas de suffisamment de mutants qui soient affectés dans des voies hormonales, nous avons choisi de réaliser des traitements exogènes. La combinaison des résultats de ces expériences avec les données de nos analyses transcriptomiques semble indiquer que la voie d'ABA serait impliquée dans la résistance mais pas celles de SA ou JA. Cependant, comme dans le cas des composés phénoliques, il peut y avoir un écart entre l'expression du gène et la production du composé final. Nous proposons dans un premier temps de doser la quantité de toutes les hormones *in planta* après infection. Dans un deuxième temps, il sera nécessaire d'obtenir des mutants de la lignée A17, comme expliqué dans la question 1 (page 301).

Question 4 : La composition et la teneur en métabolites secondaires sont-elles des éléments clefs dans la résistance ?

A partir de 24 heures après l'inoculation, les spores du champignon vont germer et initier la colonisation des tissus vasculaires. Durant cette période, il a été décrit que la plante accumule dès les premières phases de l'infection des métabolites secondaires pour inhiber le développement du pathogène. Nos données transcriptomiques indiquent que les deux lignées induisent des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces métabolites. Étant donnée leur activité antimicrobienne, on pourrait se demander pourquoi la plante sensible est incapable de stopper la progression du pathogène. Il est possible que l'induction de l'expression des gènes ne suffise pas pour l'accumulation du produit final.

Nous proposons d'identifier et de quantifier les composés phénoliques produits par chacune des lignées en réponse à l'inoculation. Plusieurs observations nous poussent dans cette voie. En effet,

dans le laboratoire, nous avons observé la formation d'un halo d'inhibition de la croissance de *V. alfalfae* au niveau des racines de la lignée A17 cultivée *in vitro* sur milieu solide (Martina Rickauer, communication personnelle). Il est donc possible que des molécules antimicrobiennes diffusent dans le milieu de culture. Les études cytologiques ont indiqué que la lignée A17 accumule des composés phénoliques. De plus, l'analyse transcriptomique indique qu'il y a des différences entre la lignée résistante et la lignée sensible concernant le type des gènes induits impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires et l'intensité de l'induction.

Nous proposons de réaliser une étude cinétique pour observer d'éventuels changements dans les profils des métabolites secondaires puisqu'il est possible que le pathogène inhibe des voies de biosynthèse ou dégrade les composés phénoliques (Soby et al., 1996 ; Báidez et al., 2007). Ce projet devrait se faire dans le cadre d'une collaboration puisque le laboratoire ne possède pas les appareils et les compétences nécessaires pour l'analyse de ce type de composés.

Question 5 : Les microARN sont-ils impliqués dans la régulation de la résistance contre *V. alfalfae* ?

Dans le cadre du projet MIRMED, des échantillons de petits ARN de la lignée A17 ont été séquencés pour identifier les microARN (miR) différentiellement exprimés en réponse à *Va* V31-2. Plusieurs miR dont des miR qui répondent à l'infection ont été identifiés (Formey et al., in press).

La validation du rôle biologique des miR candidats identifiés dans la régulation de la réponse de défense devra se poursuivre par des analyses fonctionnelles. Dans un premier temps, il sera nécessaire de valider l'expression de ces miR et de leurs cibles présumées par PCR quantitative. L'approche consistera à analyser le patron d'expression du miR candidat au cours d'une cinétique d'infection dans l'interaction compatible et incompatible entre *M. truncatula* et *V. alfalfae*. Cela permettra d'identifier les miR qui répondent spécifiquement dans une des interactions et de savoir dans quelle phase du processus d'infection le miR serait actif.

Cette vérification constitue la première étape du processus de validation. Après confirmation de l'expression différentielle du miR par qRT-PCR, il est indispensable de réaliser des études fonctionnelles par transformation racinaire pour sur-exprimer ou inhiber l'expression des miR candidats. L'inoculation des plantes chimériques ainsi obtenues permettra d'observer l'effet d'un miR sur la résistance ou la sensibilité. On ne validera pas les cibles si le miR n'a pas d'influence sur l'interaction entre la plante et le pathogène. L'autre possibilité serait de rechercher des mutants affectés dans les gènes de miR.

La méthode de validation des cibles dépend de l'activité du miR. Dans un premier temps, il faudra comparer le patron d'expression du miR par rapport à celui de la cible. Si celui-ci régule l'expression en dégradant l'ARNm cible on s'attend à des patrons d'expression opposés entre le miR et la cible. En cas de corrélation négative entre l'expression du miR et de la cible prédite, la méthode de RLM-RACE (RNA ligase-mediated 5' amplification of cDNA ends) permettra de voir si le miR provoque la coupure de la cible (Lasham et al., 2010). Pour observer si un miR agit par inhibition de l'expression de la protéine, on peut réaliser une fusion entre le gène cible avec un gène rapporteur tel que le gène codant pour la GFP ou le système GUS (GUS: β -glucuronidase) (Jefferson, 1989).

Et à plus long terme.....

Parmi les gènes identifiés dans ce travail, certains sont des bons candidats pour le contrôle de la verticilliose chez *M. truncatula*, la luzerne et d'autres légumineuses. Il a été montré que la transformation par un gène de défense ou de signalisation était suffisante pour rendre les plantes résistantes (**Tableau C. 2**). Parmi ces gènes, nous avons identifié des chitinases. Au-delà de l'approche de transformation, ces gènes peuvent servir dans une stratégie de sélection assistée par marqueur.

Tableau C. 2 : Plantes transgéniques produites pour augmenter la résistance à *Verticillium* chez plusieurs espèces hôtes (Fradin and Thomma, 2006).

| Plante | Transgène | Donneur | Test | Phénotype |
|----------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------|
| Tomate | ACC déaminase | <i>Enterobacter cloacae</i> | serre | T |
| coton | chitinase | <i>Phaseolus vulgaris</i> | extrait | ND |
| Fraise | chitinase | <i>Lycopersicon chilense</i> | serre | R |
| Tomate | chitinase | <i>Lycopersicon chilense</i> | serre | R |
| Coton | D4E1 | synthétique | extrait | ND |
| Aubergine | défensine | <i>Dahlia merckii</i> | <i>in vitro</i> | R |
| Pomme de terre | défensine | <i>Medicago sativa</i> | champ | R |
| Coton | gastrodianine | <i>Gastrodia elata</i> | champ | R |
| Coton / Tabac | glucose oxidase | <i>Talaromyces flavus</i> | serre | R |
| Tabac | magainine | synthétique | extrait | ND |
| Pomme de terre | PGIP | <i>Malus domestica</i> | champ | UA |
| Aubergine | Δ -9 désaturase | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | serre | R |

La performance des plantes transgéniques en réponse à *Verticillium* a été testée en observant les effets inhibiteurs des extraits de plantes transgéniques sur *Verticillium* (extrait) ou en co-cultivant les plantes transgéniques et *Verticillium* *in vitro* (*in vitro*), ou avec des tests d'inoculation en serre (serre) ou au champ (champ). D4E1 (peptide synthétique de 17 acides aminés), PGIP (Polygalacturonase-inhibiting protein). Les phénotypes sont décrits par rapport aux observations des auteurs qui ont mené les essais. R, augmentation de la résistance ; T, augmentation de la tolérance ; UA, pas d'effet ; ND, indéterminé.

F. BIBLIOGRAPHIE

11th International Verticillium Symposium 2013.

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 10306–10311.
- Acharya, S.N. and Huang, H.-C.** (2003). Breeding alfalfa for resistance to verticillium wilt: A sound strategy.
- Adams, D.J.** (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol. Read. Engl.* **150**: 2029–2035.
- Agarkova, I.V., Lambrecht, P.A., Vidaver, A.K., and Harveson, R.M.** (2012). Genetic diversity among *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* populations in the American high plains. *Can. J. Microbiol.* **58**: 788–801.
- Agrios, G.N.** (2004). *Plant pathology* (Elsevier Academic Press: Amsterdam; Boston).
- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* **17**: 73–90.
- Albert, M.** (2013). Peptides as triggers of plant defence. *J. Exp. Bot.* **64**: 5269–5279.
- Alon, M., Malka, O., Eakteiman, G., Elbaz, M., Moyal Ben Zvi, M., Vainstein, A., and Morin, S.** (2013). Activation of the Phenylpropanoid Pathway in *Nicotiana tabacum* Improves the Performance of the Whitefly *Bemisia tabaci* via Reduced Jasmonate Signaling. *PLoS ONE* **8**: e76619.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., and Yadav, R.C.** (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants Int. J. Funct. Plant Biol.* **19**: 307–321.
- Amborabé, B.-E., Fleurat-Lessard, P., Chollet, J.-F., and Roblin, G.** (2002). Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure–activity relationship. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 1051–1060.
- Andersen, P.C. and Brodbeck, B.V.** (1989). Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudate from *Vitis rotundifolia*. *Physiol. Plant.* **75**: 63–70.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K.** (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.

- Anders, S. and Huber, W.** (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**: R106.
- Apel, K. and Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 373–399.
- Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., Covarrubias, A.A., and Reyes, J.L.** (2009). Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol. Biol.* **70**: 385–401.
- Ariel, F., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R., and Crespi, M.** (2010). Environmental Regulation of Lateral Root Emergence in *Medicago truncatula* Requires the HD-Zip I Transcription Factor HB1. *Plant Cell Online* **22**: 2171–2183.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., and Billington, R.V.** (1975). *Fusarium oxysporum* Forma Specialis *Voandzeiae*, a New Form Species Causing Wilt of Bambarra Groundnut. *Mycologia* **67**: 709.
- Arraouadi, S., Badri, M., Abdelly, C., Huguet, T., and Aouani, M.E.** (2012). QTL mapping of physiological traits associated with salt tolerance in *Medicago truncatula* Recombinant Inbred Lines. *Genomics* **99**: 118–125.
- Ausubel, F.M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* **6**: 973–979.
- Avia, K. et al.** (2013). Genetic variability and QTL mapping of freezing tolerance and related traits in *Medicago truncatula*. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **126**: 2353–2366.
- Baca, B.E. and Elmerich, C.** (1970). Microbial Production of Plant Hormones.: 113–143.
- Bae, H., Kim, M.S., Sicher, R.C., Bae, H.-J., and Bailey, B.A.** (2006). Necrosis- and Ethylene-Inducing Peptide from *Fusarium oxysporum* Induces a Complex Cascade of Transcripts Associated with Signal Transduction and Cell Death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**: 1056–1067.
- Báidez, A.G., Gómez, P., Del Río, J.A., and Ortuño, A.** (2007). Dysfunctionality of the Xylem in *Olea europaea* L. Plants Associated with the Infection Process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of Phenolic Compounds in Plant Defense Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 3373–3377.
- Bari, R. and Jones, J.D.G.** (2008). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **69**: 473–488.
- Bari, R., Pant, B.D., Stitt, M., and Scheible, W.-R.** (2006). PHO2, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants. *Plant Physiol.* **141**: 988–999.
- Barker, D.G. et al.** (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics

of the Rhizobium–legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Report.* **8**: 40–49.

- Barrero, J.M., Rodriguez, P.L., Quesada, V., Alabadí, D., Blázquez, M.A., Boutin, J.-P., Marion-Poll, A., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2008). The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **31**: 227–234.
- Beckman, C.H.** (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**: 101–110.
- Beckman, C.H.** (1987). *The nature of wilt diseases of plants* (APS Press).
- Beckman, C.H. and Talboys, P.W.** (1981). *Anatomy of resistance* Academic Press. (In M. E. Mace, A. A. Bell, and C. H. Beckman [eds.] *Fungal wilt diseases of plants* 487–521: New York, New York, USA).
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangl, J.L.** (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 391–399.
- Bell, E. and Mullet, J.E.** (1993). Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* **103**: 1133–1137.
- Ben, C. et al.** (2013a). Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to *Verticillium* wilt. *J. Exp. Bot.* **64**: 317–332.
- Ben, C., Debelle, F., Berges, H., Bellec, A., Jardinaud, M.-F., Anson, P., Huguet, T., Gentzbittel, L., and Vaillau, F.** (2013b). MtQRRS1, an R-locus required for *Medicago truncatula* quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* **199**: 758–772.
- Benhamou, N. and Nicole, M.** (1999). Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem.* **37**: 703–719.
- Bennett, M.D. and Leitch, I.J.** (1995). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Ann. Bot.* **76**: 113–176.
- Bennett, R.N. and Wallsgrove, R.M.** (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **127**: 617–633.
- Bent, A.F. and Mackey, D.** (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**: 399–436.
- Berlanger, I. and Powelson, M.L.** (2000). *Verticillium* wilt.

- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Brière, C., de Wit, P.J.G.M., Marco, Y., and Deslandes, L.** (2008). RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* **20**: 2252–2264.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M.** (1983). An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* **22**: 15–IN13.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M.** (1984). Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. II. Invasion of resistant cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **24**: 277–289.
- Bittner, F., Oreb, M., and Mendel, R.R.** (2001). ABA3 Is a Molybdenum Cofactor Sulfurase Required for Activation of Aldehyde Oxidase and Xanthine Dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**: 40381–40384.
- Blaedow, R.A. and Juzwik, J.** (2010). Spatial and temporal distribution of *Ceratocystis fagacearum* in roots and root grafts of oak wilt affected red oaks. *Arboric. Urban For.* **36**: 28–34.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U.** (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bohin, J.P.** (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 11–19.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G.** (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **MPMI 14**: 695–700.
- Boller, T. and Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379–406.
- Bolwell, G.P.** (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 287–294.
- Bonas, U., Stall, R.E., and Staskawicz, B.** (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* **MGG 218**: 127–136.
- Boyes, D.C., Nam, J., and Dangl, J.L.** (1998). The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the

hypersensitive response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**: 15849–15854.

- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., and Breitenbach, M.** (1989). The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. EMBO J. **8**: 1935–1938.
- Britto-Kido, S. de A., o, Ferreira Neto, J., Costa, R., Pandolfi, V., Marcelino-Guimarã, Es, F.C., a, Nepomuceno, A.L., Vilela Abdelnoor, R., Benko-Iseppon, A.M., and Kido, E.A.** (2013). Natural Antisense Transcripts in Plants: A Review and Identification in Soybean Infected with *Phakopsora pachyrhizi* SuperSAGE Library. Sci. World J. **2013**: e219798.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G.** (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **107**: 9452–9457.
- Bu, B., Qiu, D., Zeng, H., Guo, L., Yuan, J., and Yang, X.** (2014). A fungal protein elicitor PevD1 induces Verticillium wilt resistance in cotton. Plant Cell Rep. **33**: 461–470.
- Buchner, V., Burstein, Y., and Nachmias, A.** (1989). Comparison of Verticillium dahliae-produced phytotoxic peptides purified from culture fluids and infected potato stems. Physiol. Mol. Plant Pathol. **35**: 253–269.
- Bunn, C.R., McNeill, J.J., and Matrone, G.** (1968). Comparison of amino acid and alfalfa supplementation of purified diets ruminants. J. Nutr. **94**: 47–51.
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E.E., and Dong, X.** (2011). Arabidopsis lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. Plant Mol. Biol. **75**: 25–33.
- Calpas, J.T. and Rahe, J.E.** (1995). Distribution of Verticillium albo-atrum in the root systems of resistant and susceptible alfalfa plants. Can. J. Plant Pathol. **17**: 240–246.
- Carder, J.H. and Barbara, D.J.** (1991). Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of Verticillium. Mycol. Res. **95**: 935–942.
- Carpita, N.C. and Gibeaut, D.M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J. Cell Mol. Biol. **3**: 1–30.
- Chai, Y., Zhao, L., Liao, Z., Sun, X., Zuo, K., Zhang, L., Wang, S., and Tang, K.** (2003). Molecular cloning of a potential Verticillium dahliae resistance gene SIVe1 with multi-site polyadenylation from Solanum lycopersicoides. DNA Seq. J. DNA Seq. Mapp. **14**: 375–384.

- Chalupowicz, L., Zellermann, E.-M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I., and Manulis-Sasson, S.** (2012). Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* **102**: 23–31.
- Chen, L.-H., Chiou, G.-Y., Chen, Y.-W., Li, H.-Y., and Chiou, S.-H.** (2010a). microRNA and aging: A novel modulator in regulating the aging network. *Ageing Res. Rev.* **9, Supplement**: S59–S66.
- Chen, P., Lee, B., and Robb, J.** (2004). Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **64**: 283–291.
- Chen, X., Chern, M., Canlas, P.E., Ruan, D., Jiang, C., and Ronald, P.C.** (2010b). An ATPase promotes autophosphorylation of the pattern recognition receptor XA21 and inhibits XA21-mediated immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 8029–8034.
- Chen, X. and Ronald, P.C.** (2011). Innate immunity in rice. *Trends Plant Sci.* **16**: 451–459.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671.
- Choat, B., Ball, M., Luly, J., and Holtum, J.** (2003). Pit Membrane Porosity and Water Stress-Induced Cavitation in Four Co-Existing Dry Rainforest Tree Species. *Plant Physiol.* **131**: 41–48.
- Choat, B., Jansen, S., Zwieniecki, M.A., Smets, E., and Holbrook, N.M.** (2004). Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vestured pits. *J. Exp. Bot.* **55**: 1569–1575.
- Choi, H.-K., Mun, J.-H., Kim, D.-J., Zhu, H., Baek, J.-M., Mudge, J., Roe, B., Ellis, N., Doyle, J., Kiss, G.B., Young, N.D., and Cook, D.R.** (2004). Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 15289–15294.
- Chong, J., Pierrel, M.A., Atanassova, R., Werck-Reichhart, D., Fritig, B., and Saindrenan, P.** (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol.* **125**: 318–328.
- Christen, A.A. and French, R.C.** (1982). Growth and pathogenicity of alfalfa strains of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Dis.* **66**: 416–418.

- Christie, B.R., Papadopoulos, Y.A., and Busch, L.V.** (1985). Genetics and Breeding for Resistance to Verticillium Wilt in Alfalfa. *Can. J. Plant Pathol.* **7**: 206–210.
- Chuck, G., Candela, H., and Hake, S.** (2009). Big impacts by small RNAs in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 81–86.
- Clark, K.L., Larsen, P.B., Wang, X., and Chang, C.** (1998). Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 5401–5406.
- Clérivet, A., Déon, V., Alami, I., Lopez, F., Geiger, J.-P., and Nicole, M.** (2000). Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus × acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Trees* **15**: 25–31.
- Cochard, H. and Tyree, M.T.** (1990). Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. *Tree Physiol.* **6**: 393–407.
- Cohen, J.D., Slovin, J.P., and Hendrickson, A.M.** (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **8**: 197–199.
- Collett, D.** (2002). *Modelling Binary Data, Second Edition* (CRC Press).
- Coll, N.S., Epple, P., and Dangl, J.L.** (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* **18**: 1247–1256.
- Conesa, A. and Götz, S.** (2008). Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *Int. J. Plant Genomics* **2008**: e619832.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., and Mauch-Mani, B.** (2002). Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **7**: 210–216.
- Consonni, C., Humphry, M.E., Hartmann, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S.C., and Panstruga, R.** (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat. Genet.* **38**: 716–720.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., and VandenBosch, K.** (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**: 43–55.
- Corsini, D.L., Thompson, C., and Pavek, J.J.** (1989). The effect of plant growth regulators on Verticillium wilt of potato. *Am. Potato J.* **66**: 125–136.

- Costacurta, A. and Vanderleyden, J.** (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**: 1–18.
- Cowan, M.M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 564–582.
- Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., and Wang, Z.-Y.** (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* -transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* **223**: 1344–1354.
- Cronshaw, D.K. and Pegg, G.F.** (1976). Ethylene as a toxin synergist in *Verticillium* wilt of tomato. *Physiol. Plant Pathol.* **9**: 33–44.
- Danna, C.H., Millet, Y.A., Koller, T., Han, S.-W., Bent, A.F., Ronald, P.C., and Ausubel, F.M.** (2011). The *Arabidopsis* flagellin receptor FLS2 mediates the perception of *Xanthomonas* Ax21 secreted peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 9286–9291.
- Daugherty, M.P., Lopes, J.R.S., and Almeida, R.P.P.** (2010). Strain-specific alfalfa water stress induced by *Xylella fastidiosa*. *Eur. J. Plant Pathol.* **127**: 333–340.
- Davis, D.A., Low, P.S., and Heinstein, P.** (1998). Purification of a glycoprotein elicitor of phytoalexin formation from *Verticillium dahliae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 259–273.
- Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., and Mittler, R.** (2005). The Zinc-Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**: 847–856.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J.** (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* **266**: 1247–1250.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I., and Wasternack, C.** (2006). Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, Products, Regulation. *Plant Biol.* **8**: 297–306.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585–588.
- Denancé, N. et al.** (2013). *Arabidopsis* wat1 (walls are thin1)-mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross-regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *Plant J.* **73**: 225–239.
- Denance, N., Sanchez-Vallet, A., Goffner, D., and Molina, A.** (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* **4**.

- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 8024–8029.
- Devoto, A. and Turner, J.G.** (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* **92**: 329–337.
- Diwan, N., Fluhr, R., Eshed, Y., Zamir, D., and Tanksley, S.D.** (1999). Mapping of Ve in tomato: a gene conferring resistance to the broad-spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 315–319.
- Djébali, N., Jauneau, A., Ameline-Torregrosa, C., Chardon, F., Jaulneau, V., Mathé, C., Bottin, A., Cazaux, M., Pilet-Nayel, M.-L., and Baranger, A.** (2009). Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **22**: 1043–1055.
- Doares, S.H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A., and Ryan, C.A.** (1995). Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol.* **108**: 1741–1746.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnwald, U., Kahmann, R., and Kämper, J.** (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **56**: 181–195.
- Does, D.V. der, Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Verk, M.C.V., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Körbes, A.P., Memelink, J., Ritsema, T., Wees, S.C.M.V., and Pieterse, C.M.J.** (2013). Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCO11-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *Plant Cell Online*: tpc.112.108548.
- Van der Does, H.C. and Rep, M.** (2007). Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **20**: 1175–1182.
- Durrant, W.E. and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 185–209.
- Dute, R.R., Duncan, K.M., and Duke, B.** (1999). TYLOSES IN ABSCISSION SCARS OF LOBLOLLY PINE1» 2. *IAWA J.* **20**: 67.
- Du, T. and Zamore, P.D.** (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Dev. Camb. Engl.* **132**: 4645–4652.

- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z.** (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res.* **38**: W64–70.
- Ellendorff, U., Fradin, E.F., de Jonge, R., and Thomma, B.P.H.J.** (2009). RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease. *J. Exp. Bot.* **60**: 591–602.
- Esau, K.** (1960). *Anatomy of seed plants* (Wiley).
- Esmailzadeh, M., Soleimani, M.J., and Rouhani, H.** (2008). Exogenous Applications of Salicylic Acid for Inducing Systemic Acquired Resistance Against Tomato Stem Canker Disease. *J. Biol. Sci.* **8**: 1039–1044.
- Espagne, E. et al.** (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* **9**: R77.
- Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoecker, G., Karlovsky, P., and Tiedemann, A. von** (2007). Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur. J. Plant Pathol.* **118**: 259–274.
- Eynck, C., Koopmann, B., Karlovsky, P., and Von Tiedemann, A.** (2009). Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology* **99**: 802–811.
- Fåhraeus, G.** (1957). The Infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 374–381.
- Faino, L., de Jonge, R., and Thomma, B.P.H.J.** (2012). The transcriptome of *Verticillium dahliae*-infected *Nicotiana benthamiana* determined by deep RNA sequencing. *Plant Signal. Behav.* **7**: 1065–1069.
- De Faria, S.M., Lewis, G.P., Sprent, J.I., and Sutherland, J.M.** (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol.* **111**: 607–619.
- Fei, J., Chai, Y., Wang, J., Lin, J., Sun, X., Sun, C., Zuo, K., and Tang, K.** (2004). CDNA cloning and characterization of the Ve homologue gene StVe from *Solanum torvum* Swartz. *DNA Seq. J. DNA Seq. Mapp.* **15**: 88–95.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **18**: 265–276.
- Feofilova, E.P., Ivashechkin, A.A., Alekhin, A.I., and Sergeeva, Y.E.** (2012). Fungal spores: Dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **48**: 1–11.

- Fick, G.N. and Zimmer, D.E.** (1974). Monogenic Resistance to Verticillium Wilt in Sunflowers I. *Crop Sci.* **14**: 895.
- Field, B., Jordán, F., and Osbourn, A.** (2006). First encounters – deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytol.* **172**: 193–207.
- Fonseca, S., Chico, J.M., and Solano, R.** (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 539–547.
- Formey, D. et al.** The small RNA diversity from *Medicago truncatula* roots under biotic interactions evidences the environmental plasticity of the miRNAome. *Press.*
- Fradin, E.F., Abd-El-Haliem, A., Masini, L., van den Berg, G.C.M., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2011). Interfamily transfer of tomato Ve1 mediates Verticillium resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**: 2255–2265.
- Fradin, E.F. and Thomma, B.P.H.J.** (2006). Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* **7**: 71–86.
- Fradin, E.F., Zhang, Z., Juarez Ayala, J.C., Castroverde, C.D.M., Nazar, R.N., Robb, J., Liu, C.-M., and Thomma, B.P.H.J.** (2009). Genetic Dissection of Verticillium Wilt Resistance Mediated by Tomato Ve1. *PLANT Physiol.* **150**: 320–332.
- Fradin, E.F., Zhang, Z., Rovenich, H., Song, Y., Liebrand, T.W.H., Masini, L., van den Berg, G.C.M., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2014). Functional Analysis of the Tomato Immune Receptor Ve1 through Domain Swaps with Its Non-Functional Homolog Ve2. *PLoS ONE* **9**: e88208.
- Fragkostefanakis, S., Simm, S., Paul, P., Bublak, D., Scharf, K.-D., and Schleiff, E.** (2014). Chaperone network composition in *Solanum lycopersicum* explored by transcriptome profiling and microarray meta-analysis. *Plant Cell Environ.*: n/a–n/a.
- Freeman** (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *Plant Health Instr.*
- Freitag, J., Lanver, D., Böhmer, C., Schink, K.O., Bölker, M., and Sandrock, B.** (2011). Septation of Infectious Hyphae Is Critical for Appressoria Formation and Virulence in the Smut Fungus *Ustilago Maydis*. *PLoS Pathog* **7**: e1002044.
- Fritz-Laylin, L.K., Krishnamurthy, N., Tör, M., Sjölander, K.V., and Jones, J.D.G.** (2005). Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 611–623.
- Frugoli, J. and Harris, J.** (2001). *Medicago truncatula* on the Move! *Plant Cell Online* **13**: 458–463.

- Fuller, K.K., Ringelberg, C.S., Loros, J.J., and Dunlap, J.C.** (2013). The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. *mBio* **4**: e00142–13.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., and Dong, X.** (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228–232.
- Gaige, A.R., Ayella, A., and Shuai, B.** (2010). Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **74**: 412–418.
- Gams, D.W. and Zaayen, D.A.V.** (1982). Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. I. Taxonomy. *Neth. J. Plant Pathol.* **88**: 57–78.
- Gao, L.-L., Anderson, J.P., Klingler, J.P., Nair, R.M., Edwards, O.R., and Singh, K.B.** (2007). Involvement of the Octadecanoid Pathway in Bluegreen Aphid Resistance in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **20**: 82–93.
- Garber, R.H.** (1960). The Penetration and Development of *Verticillium Albo-atrum* Reinke and Berth. in the Cotton Plant (University of California, Berkeley).
- Gartemann, K.-H. et al.** (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* **190**: 2138–2149.
- Gassmann, W. and Bhattacharjee, S.** (2012). Effector-Triggered Immunity Signaling: From Gene-for-Gene Pathways to Protein-Protein Interaction Networks. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**: 862–868.
- Gayoso, C., Pomar, F., Novo-Uzal, E., Merino, F., and de Ilárduya, Ó.M.** (2010). The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biol.* **10**: 232.
- Genin, S.** (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* **187**: 920–928.
- Gijzen, M. and Nürnberger, T.** (2006). Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**: 1800–1807.
- Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Jr, and Warren, R.A.** (1991). Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* **55**: 303–315.

- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205–227.
- Gold, J., Lee, B., and Robb, J.** (1996). Colonization of tomatoes by *Verticillium dahliae*: determinative phase II. *Can. J. Bot.* **74**: 1279–1288.
- Gomez-Roldan, V. et al.** (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–194.
- Grant, M.R. and Jones, J.D.G.** (2009). Hormone (Dis)harmony Moulds Plant Health and Disease. *Science* **324**: 750–752.
- Grau, C.R., Nygaard, S.L., Army, D.C., and Delwiche, P.A.** (1991). Comparison of methods to evaluate alfalfa cultivars for reaction to *Verticillium albo-atrum*. *Plant Dis.* **75**: 82–85.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271–276.
- Grbić, V. and Bleeker, A.B.** (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **8**: 595–602.
- Griffen, A.M., Heale, J.B., and Bainbridge, B.W.** (1994). Cloning and characterization of the ribosomal RNA gene complex from the plant pathogen *Verticillium albo-atrum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 291–296.
- Groß, F., Durner, J., and Gaupels, F.** (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front. Plant Sci.* **4**: 419.
- Gupta, G.P.** (2004). *Plant Pathology* (Discovery Publishing House).
- Gupta, I., Clauder-Münster, S., Klaus, B., Järvelin, A.I., Aiyar, R.S., Benes, V., Wilkening, S., Huber, W., Pelechano, V., and Steinmetz, L.M.** (2014). Alternative polyadenylation diversifies post-transcriptional regulation by selective RNA–protein interactions. *Mol. Syst. Biol.* **10**: 719.
- Gutierrez, L., Bussell, J.D., Păcurar, D.I., Schwambach, J., Păcurar, M., and Bellini, C.** (2009). Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in *Arabidopsis* Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *Plant Cell Online* **21**: 3119–3132.
- Häffner, E., Karlovsky, P., and Diederichsen, E.** (2010). Genetic and environmental control of the *Verticillium* syndrome in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **10**: 235.
- Hamon, C., Baranger, A., Miteul, H., Lecointe, R., Goff, I.L., Deniot, G., Onfroy, C., Moussart, A., Prospero, J.-M., Tivoli, B., Delourme, R., and Pilet-Nayel, M.-L.** (2010). A complex genetic network involving a broad-spectrum locus and strain-specific loci controls resistance to

different pathotypes of *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Theor. Appl. Genet.* **120**: 955–970.

- Harper, A.M. and Huang, H.C.** (1984). Contamination of Insects by the Plant Pathogen *Verticillium albo-atrum* in an Alfalfa Field. *Environ. Entomol.* **13**: 117–120.
- Harrison, M.J. and Dixon, R.A.** (1994). Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.* **6**: 9–20.
- Harrison, N.A. and Beckman, C.H.** (1982). Time/space relationships of colonization and host response in wilt-resistant and wilt-susceptible cotton (*Gossypium*) cultivars inoculated with *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Physiol. Plant Pathol.* **21**: 193–207.
- Hartmann, A., Senning, M., Hedden, P., Sonnewald, U., and Sonnewald, S.** (2011). Reactivation of Meristem Activity and Sprout Growth in Potato Tubers Require Both Cytokinin and Gibberellin. *Plant Physiol.* **155**: 776–796.
- Hartman, R.E., Keen, N.T., and Long, M.** (1972). Carbon Dioxide Fixation by *Verticillium albo-atrum*. *J. Gen. Microbiol.* **73**: 29–34.
- Harwood, T.D., Tomlinson, I., Potter, C.A., and Knight, J.D.** (2011). Dutch elm disease revisited: past, present and future management in Great Britain. *Plant Pathol.* **60**: 545–555.
- Hayes, R.J., McHale, L.K., Vallad, G.E., Truco, M.J., Michelmore, R.W., Klosterman, S.J., Maruthachalam, K., and Subbarao, K.V.** (2011). The inheritance of resistance to *Verticillium* wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **123**: 509–517.
- Heale, J.** (2000). Diversification and speciation in *Verticillium* – an overview Tjamos EC, Rowe RC, Heale JB, Fravel DR. (Advances in *Verticillium* research and disease management.: St. Paul, MN: APS Press).
- Heale, J.B.** (1985). *Verticillium* Wilt of Alfalfa, Background and Current Research. *Can. J. Plant Pathol.* **7**: 191–198.
- Hedlund, T.** (1923). Om några sjukdomar och skador på våra lantbruksväxter. *Allm. Jordbrukstidskrift* **5**: 166–168.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 12217–12222.

- Heinz, R., Lee, S.W., Saparno, A., Nazar, R.N., and Robb, J.** (1998). Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 385–396.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1998). The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425–479.
- Hilaire, E., Young, S.A., Willard, L.H., McGee, J.D., Sweat, T., Chittoor, J.M., Guikema, J.A., and Leach, J.E.** (2001). Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **14**: 1411–1419.
- Hongmei, C. and Guiliang, J.** (2005). Increase of *Fusarium*- and *Verticillium*-resistance by transferring chitinase and glucanase gene into cotton. *Sci. Agric. Sin.*
- Houterman, P.M., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M.** (2008). Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. *PLoS Pathog* **4**: e1000061.
- Houterman, P.M., Speijer, D., Dekker, H.L., De Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M.** (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 215–221.
- Huang, H.C.** (1985). Infection of Alfalfa Pollen by *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* **75**: 859.
- Huang, H.C., Hanna, M.R., and Kokko, E.G.** (1985). Mechanisms of seed contamination by *Verticillium albo-atrum* in alfalfa. *Phytopathology* **75**: 482–488.
- Huang, H.C., Harper, A.M., Kokko, E.G., and Howard, R.J.** (1983). Aphid transmission of *Verticillium albo-atrum* to alfalfa. *Can. J. Plant Pathol.* **5**: 141–147.
- Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., and Dangl, J.L.** (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO J.* **22**: 5679–5689.
- Hückelhoven, R.** (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**: 101–127.
- Hu, G., deHart, A.K.A., Li, Y., Ustach, C., Handley, V., Navarre, R., Hwang, C.-F., Aegerter, B.J., Williamson, V.M., and Baker, B.** (2005). EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene *Ve*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **42**: 376–391.
- Huisman, O.C.** (1982). Interrelations of Root Growth Dynamics to Epidemiology of Root-Invasive Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**: 303–327.
- Ichihara, A., Nonaka, M., Sakamura, S., Sato, R., and Tajimi, A.** (1988). Structure and synthesis of alboatrin, a novel phytotoxic metabolite from *Verticillium albo-atrum*. *Chem. Lett.*: 27–30.

- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, R.M., Usami, T., Platt, H.W., and Subbarao, K.V.** (2011a). Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE* **6**: e28341.
- Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., and Subbarao, K.V.** (2013). Identification and Differentiation of *Verticillium* Species and *V. longisporum* Lineages by Simplex and Multiplex PCR Assays. *PloS One* **8**: e65990.
- Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., and Subbarao, K.V.** (2011b). The Ascomycete *Verticillium longisporum* Is a Hybrid and a Plant Pathogen with an Expanded Host Range. *PLoS ONE* **6**: e18260.
- Ingram, R.** (1968). *Verticillium dahliae* var. *longisporum*, a stable diploid. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **51**: 339–341.
- Ioannou, N.** (1977). Effect of Oxygen, Carbon Dioxide, and Ethylene on Growth, Sporulation, and Production of Microsclerotia by *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **77**: 645.
- Ireland, K.F. and Leath, K.T.** (1987). Potential of using culture filtrates from *Verticillium albo-atrum* to evaluate alfalfa germ plasm for resistance to *Verticillium* wilt. *Plant Dis.* **71**: 900–903.
- Isaac, I.** (1953). A further comparative study of pathogenic isolates of *Verticillium*: *V. nubilum* Pethybr. and *V. tricorpus* sp.nov. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **36**: 180–IN2.
- Isaac, I.** (1967). Speciation in *Verticillium*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **5**: 201–222.
- Isaac, I.** (1957a). *Verticillium* Wilt of Brussels Sprout. *Ann. Appl. Biol.* **45**: 276–283.
- Isaac, I.** (1957b). Wilt of Lucerne Caused by Species of *Verticillium*. *Ann. Appl. Biol.* **45**: 550–558.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **27**: 325–333.
- Iven, T., König, S., Singh, S., Braus-Stromeier, S.A., Bischoff, M., Tietze, L.F., Braus, G.H., Lipka, V., Feussner, I., and Dröge-Laser, W.** (2012). Transcriptional Activation and Production of Tryptophan-Derived Secondary Metabolites in *Arabidopsis* Roots Contributes to the Defense against the Fungal Vascular Pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol. Plant* **5**: 1389–1402.
- Jakse, J., Cerenak, A., Radisek, S., Satovic, Z., Luthar, Z., and Javornik, B.** (2013). Identification of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **126**: 1431–1443.

- Jane Robb, A.S.** (2011). Wilts caused by *Verticillium* species. A cytological survey of vascular alterations in leaves. *Can. J. Bot.* **60**: 825–837.
- Janse, J.D. and Obradovic, A.** (2010). *Xylella Fastidiosa*: Its Biology, Diagnosis, Control and Risks. *J. Plant Pathol.* **92**: S35–S48.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adrian, M.** (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 2731–2741.
- Jefferson, R.A.** (1989). The GUS reporter gene system. *Nature* **342**: 837–838.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anshütz, U., Krol, E., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., and Becker, D.** (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J.* **62**: 367–378.
- Jiménez-Díaz, R.M. and Millar, R.L.** (1986). Lack of systemic colonization of alfalfa plants after inoculation of uninjured leaves with conidia of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Disease* **70**: 509–515.
- Jirage, D., Toofle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J.** (1999). Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 13583–13588.
- Johansson, A., Staal, J., and Dixelius, C.** (2006). Early responses in the Arabidopsis-*Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**: 958–969.
- Johnson, P.R. and Ecker, J.R.** (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 227–254.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jones, P. et al.** (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**: 1236–1240.
- De Jonge, R., Bolton, M.D., and Thomma, B.P.H.J.** (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 400–406.
- De Jonge, R., Peter van Esse, H., Maruthachalam, K., Bolton, M.D., Santhanam, P., Saber, M.K., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K.V., and Thomma, B.P.H.J.** (2012). Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and

RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 5110–5115.

Jr (1995). *Phytohormones in Soils Microbial Production & Function* (CRC Press).

Julier, B., Huguet, T., Chardon, F., Ayadi, R., Pierre, J.-B., Prosperi, J.-M., Barre, P., and Huyghe, C. (2007). Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 1391–1406.

Juzwik, J., Harrington, T.C., MacDonald, W.L., and Appel, D.N. (2008). The origin of *Ceratocystis fagacearum*, the oak wilt fungus. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 13–26.

Kahl, G., Molina, C., Rotter, B., Jüngling, R., Frank, A., Krezdorn, N., Hoffmeier, K., and Winter, P. (2012). Reduced representation sequencing of plant stress transcriptomes. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **21**: 119–127.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 11086–11091.

Kamble, A., Koopmann, B., and von Tiedemann, A. (2013). Induced resistance to *Verticillium longisporum* in *Brassica napus* by β -aminobutyric acid. *Plant Pathol.* **62**: 552–561.

Kamphuis, L.G., Lichtenzveig, J., Oliver, R.P., and Ellwood, S.R. (2008). Two alternative recessive quantitative trait loci influence resistance to spring black stem and leaf spot in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* **8**: 30.

Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 27–30.

Karapapa, V.K., Bainbridge, B.W., and Heale, J.B. (2000). Classical and molecular characterization of the new species of *Verticillium longisporum* (*V. dahliae* var. *longisporum* Stark 1961; comb. nov. Karapapa et al., 1997) pathogenic to oilseed rape. In *Advances in Verticillium: Research and Disease Management* (Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., Fravel, D.R.: St. Paul, Minnesota), pp. 196–203.

Karapapa, V.K., Bainbridge, B.W., and Heale, J.B. (1997). Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol. Res.* **101**: 1281–1294.

Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J., and Vries, S. de (2006). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 Protein Complex Includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell Online* **18**: 626–638.

- Kawchuk, L.M., Hachey, J., Lynch, D.R., Kulcsar, F., Van Rooijen, G., Waterer, D.R., Robertson, A., Kokko, E., Byers, R., and Howard, R.J.** (2001). Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 6511–6515.
- Kazan, K. and Manners, J.M.** (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol.* **146**: 1459–1468.
- Kemmerling, B. et al.** (2007). The BRI1-Associated Kinase 1, BAK1, Has a Brassinolide-Independent Role in Plant Cell-Death Control. *Curr. Biol.* **17**: 1116–1122.
- Kim, J.H., Woo, H.R., Kim, J., Lim, P.O., Lee, I.C., Choi, S.H., Hwang, D., and Nam, H.G.** (2009). Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-Dependent Cell Death Involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science* **323**: 1053–1057.
- Kishimoto, K., Kouzai, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., and Nishizawa, Y.** (2010). Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **64**: 343–354.
- Kliebenstein, D.J. and Rowe, H.C.** (2008). Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Sci.* **174**: 551–556.
- Klosterman, S.J. et al.** (2011). Comparative Genomics Yields Insights into Niche Adaptation of Plant Vascular Wilt Pathogens. *PLoS Pathog.* **7**: e1002137.
- Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., and Subbarao, K.V.** (2009). Diversity, pathogenicity, and management of verticillium species. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**: 39–62.
- Koch, K.A., Quiram, G.L., and Venette, R.C.** (2010). A review of oak wilt management: A summary of treatment options and their efficacy. *Urban For. Urban Green.* **9**: 1–8.
- Kumar, D. and Klessig, D.F.** (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 16101–16106.
- Lab 4 -** (2014).
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P.H.J., Staskawicz, B., Jones, J.D.G., and Zipfel, C.** (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* **28**: 365–369.
- Larsen, R.C., Vandemark, G.J., Hughes, T.J., and Grau, C.R.** (2007). Development of a real-time

polymerase chain reaction assay for quantifying *Verticillium albo-atrum* DNA in resistant and susceptible alfalfa. *Phytopathology* **97**: 1519–1525.

Lasham, A., Herbert, M., Coppieiers 't Wallant, N., Patel, R., Feng, S., Eszes, M., Cao, H., and Reid, G. (2010). A rapid and sensitive method to detect siRNA-mediated mRNA cleavage in vivo using 5' RACE and a molecular beacon probe. *Nucleic Acids Res.* **38**: e19.

Latunde-Dada, A.O. and Lucas, J.A. (1986). Influence of temperature on host resistance and fungal sensitivity to medicarpin in lucerne callus lines infected with *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **28**: 89–97.

Laugé, R., Goodwin, P.H., de Wit, P.J., and Joosten, M.H. (2000). Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **23**: 735–745.

Laugé, R., Joosten, M.H.A.J., Van den Ackerveken, G.F.J.M., Van den Broek, H.W.J., and De Wit, P.J.G.M. (1997). The In Planta-Produced Extracellular Proteins ECP1 and ECP2 of *Cladosporium fulvum* Are Virulence Factors. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **10**: 725–734.

Laugé, R., Joosten, M.H.A.J., Haanstra, J.P.W., Goodwin, P.H., Lindhout, P., and Wit, P.J.G.M.D. (1998). Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 9014–9018.

Lee, B.-M. et al. (2005). The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* **33**: 577–586.

Lee, I.C., Hong, S.W., Whang, S.S., Lim, P.O., Nam, H.G., and Koo, J.C. (2011). Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol.* **52**: 651–662.

Lee, S.C. and Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ.* **35**: 53–60.

Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O., and Staskawicz, B.J. (2005). Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **17**: 1268–1278.

Lelandais-Brière, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., Gouzy, J., and Crespi, M. (2009). Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *Plant Cell* **21**: 2780–2796.

Lesins, K.A. and Lesins, I. (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae): a taxogenetic study. *Biomedical*

and Life Sciences.

- Lévesque, C.A. et al.** (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol.* **11**: R73.
- Lievens, B., Rep, M., and Thomma, B.P.H.J.** (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Manag. Sci.* **64**: 781–788.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., and Baker, B.** (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 1790–1795.
- Ligoxigakis, E.K., Vakalounakis, D.J., and Thanassouloupoulos, C.C.** (2002). Weed hosts of *Verticillium dahliae* in crete: Susceptibility, symptomatology and significance. *Phytoparasitica* **30**: 511–518.
- Li, S., Zhang, N., Zhang, Z., Luo, J., Shen, B., Zhang, R., and Shen, Q.** (2013a). Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. *Biol. Fertil. Soils* **49**: 295–303.
- Liu, J., Liu, X., Dai, L., and Wang, G.** (2007). Recent Progress in Elucidating the Structure, Function and Evolution of Disease Resistance Genes in Plants. *J. Genet. Genomics* **34**: 765–776.
- Liu, Y.-X., Wang, M., and Wang, X.-J.** (2014). Endogenous Small RNA Clusters in Plants. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **12**: 64–71.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods San Diego Calif* **25**: 402–408.
- Li, W., Teixeira, D.C., Hartung, J.S., Huang, Q., Duan, Y., Zhou, L., Chen, J., Lin, H., Lopes, S., Ayres, A.J., and Levy, L.** (2013b). Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *J. Microbiol. Methods* **92**: 79–89.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G.** (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**: 465–474.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., and Sandberg, G.** (2005). Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell Online* **17**: 1090–1104.
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., Jordá, L., Parker, J., and Molina, A.** (2008). Repression of the Auxin Response Pathway Increases

Arabidopsis Susceptibility to Necrotrophic Fungi. *Mol. Plant* **1**: 496–509.

- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch–Mani, B., and Ton, J.** (2011). Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **24**: 183–193.
- Lynch, D.R., Kawchuk, L.M., Hachey, J., Bains, P.S., and Howard, R.J.** (1997). Identification of a Gene Conferring High Levels of Resistance to Verticillium Wilt in *Solanum chacoense*. *Plant Dis.* **81**: 1011–1014.
- Maciá–Vicente, J.G., Jansson, H.–B., Talbot, N.J., and Lopez–Llorca, L.V.** (2009). Real–time PCR quantification and live–cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytol.* **182**: 213–228.
- Mackie, J.M., Musial, J.M., Armour, D.J., Phan, H.T.T., Ellwood, S.E., Aitken, K.S., and Irwin, J. a. G.** (2007). Identification of QTL for reaction to three races of *Colletotrichum trifolii* and further analysis of inheritance of resistance in autotetraploid lucerne. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **114**: 1417–1426.
- Maddox, C.E., Laur, L.M., and Tian, L.** (2010). Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* **60**: 53–58.
- Majer, A.** (2013). HLVe1, a hop (*Humulus lupulus* L.) homolog of the tomato Ve1 gene, recognizes the fungal effector Ave1.
- Malcolm, G.M., Kuldau, G.A., Gugino, B.K., and Jiménez–Gasco, M. del M.** (2013). Hidden Host Plant Associations of Soilborne Fungal Pathogens: An Ecological Perspective. *Phytopathology* **103**: 538–544.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., and Dietrich, R.A.** (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* **26**: 403–410.
- Ma, L.–J. et al.** (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367–373.
- Mansoori, B., Milton, J.M., and Smith, C.J.** (1995). Isolation and Partial Purification of a Phytotoxin Related to Pathogenic *Verticillium* species. *J. Phytopathol.* **143**: 33–36.
- Maróti, G. and Kondorosi, É.** (2014). Nitrogen–fixing *Rhizobium*–legume symbiosis: are polyploidy and host peptide–governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Microb. Symbioses* **5**: 326.
- Martin, F.N. and Loper, J.E.** (1999). Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium* spp.: Ecology,

Epidemiology, and Prospects for Biological Control. Crit. Rev. Plant Sci. **18**: 111–181.

Martin, G.B., Bogdanove, A.J., and Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. Annu. Rev. Plant Biol. **54**: 23–61.

Maruthachalam, K., Klosterman, S.J., Anchieta, A., Mou, B., and Subbarao, K.V. (2013). Colonization of Spinach by *Verticillium dahliae* and Effects of Pathogen Localization on the Efficacy of Seed Treatments. Phytopathology **103**: 268–280.

Maruthachalam, K., Klosterman, S.J., Kang, S., Hayes, R.J., and Subbarao, K.V. (2011). Identification of Pathogenicity-Related Genes in the Vascular Wilt Fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated T-DNA Insertional Mutagenesis. Mol. Biotechnol. **49**: 209–221.

Mashiguchi, K. et al. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci.: 201108434.

Al-Masri, M.I., Ali-Shtayeh, M.S., Elad, Y., Sharon, A., Tudzynski, P., and Barakat, R. (2002). Effect of Plant Growth Regulators on White Mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) on Bean and Cucumber. J. Phytopathol. **150**: 481–487.

Mathre, D. (1986). Occurrence of *Verticillium Dahliae* on Barley. Plant Dis. **70**: 981–981.

Mathre, D. (1989). Pathogenicity of an Isolate of *Verticillium-Dahliae* Form Barley. Plant Dis. **73**: 164–167.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. Cell **126**: 969–980.

Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., and Jiménez-Díaz, R.M. (2004). Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. Biol. Control **30**: 474–486.

Michielse, C.B. and Rep, M. (2009). Pathogen profile update. *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant Pathol. **10**: 311–324.

Mishina, T.E. and Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. Plant J. Cell Mol. Biol. **50**: 500–513.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**: 19613–19618.

- Modrek, B. and Lee, C.** (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* **30**: 13–19.
- Mohnen, D.** (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 266–277.
- Mohr, P.G. and Cahill, D.M.** (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Funct. Integr. Genomics* **7**: 181–191.
- Mojtaba Ghalandar, E.C.** (2004). Verticillium wilt (*Verticillium albo-atrum*) on *Medicago sativa* (alfalfa) in Iran. *Plant Pathol.* **53**: 812–812.
- Molinéro-Demilly, V., Montegano, B., Julier, B., Giroult, C., Baudouin, P., Chosson, J.F., Bayle, B., Noël, D., Guénard, M., and Gensollen, V.** (2006). Resistance to *Verticillium albo-atrum* in lucerne (*Medicago sativa* L.) to distinguish between varieties. *Euphytica* **153**: 227–232.
- Mol, L. and Riessen, H.W. van** (1995). Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 673–678.
- Monaghan, J. and Zipfel, C.** (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 349–357.
- Mysore, K.S. and Ryu, C.-M.** (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* **9**: 97–104.
- Nachmias, A., Buchner, V., Tsrur, L., Burnstein, Y., and Keen, N.** (1987). Differential phytotoxicity of peptides from culture fluids of *verticillium dahliae* races 1 and 2 and their relationship to pathogenicity of the fungi on tomato. *Phytopathology*: 506–510.
- Nakamura, S., Akiyama, C., Sasaki, T., Hattori, H., and Chino, M.** (2008). Effect of cadmium on the chemical composition of xylem exudate from oilseed rape plants (*Brassica napus* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* **54**: 118–127.
- Nakao, M., Nakamura, R., Kita, K., Inukai, R., and Ishikawa, A.** (2011). Non-host resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **1**.
- Nakashima, J., Takabe, K., Fujita, M., and Fukuda, H.** (2000). Autolysis during in vitro tracheary element differentiation: formation and location of the perforation. *Plant Cell Physiol.* **41**: 1267–1271.
- Naoumkina, M.A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P.X., and Dixon, R.A.** (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 829–846.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D.G.**

- (2006). A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* **312**: 436–439.
- Nawrath, C. and Métraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**: 1393–1404.
- Negahi, A., Ben, C., Gentzbittel, L., Maury, P., Nabipour, A.R., Ebrahimi, A., Sarrafi, A., and Rickauer, M.** (2014). Quantitative trait loci associated with resistance to a potato isolate of *Verticillium albo-atrum* in *Medicago truncatula*. *Plant Pathol.* **63**: 308–315.
- Neumann, M.J. and Dobinson, K.F.** (2003). Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **38**: 54–62.
- Newhouse, A.E., Schrodt, F., Liang, H., Maynard, C.A., and Powell, W.A.** (2007). Transgenic American elm shows reduced Dutch elm disease symptoms and normal mycorrhizal colonization. *Plant Cell Rep.* **26**: 977–987.
- Newman, M.-A., Sundelin, T., Nielsen, J.T., and Erbs, G.** (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* **4**.
- N'guessan, C.A., Abo, K., Fondio, L., Chiroleu, F., Lebeau, A., Poussier, S., Wicker, E., and Koné, D.** (2012). So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia Solanacearum* populations from Côte d'Ivoire in Africa. *Phytopathology* **102**: 733–740.
- Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C., and Bogdanove, A.J.** (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* **7**: 303–324.
- Nolan, K.E., Rose, R.J., and Gorst, J.R.** (1989). Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Rep.* **8**: 278–281.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.-P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., and Marion-Poll, A.** (2007). The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **50**: 810–824.
- Nothnagel, E.A., McNeil, M., Albersheim, P., and Dell, A.** (1983). Host-Pathogen Interactions : XXII. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant Cell Walls Elicits Phytoalexins. *Plant Physiol.* **71**: 916–926.
- Nürnbergger, T. and Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels

between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 318–324.

- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**: 249–266.
- Nürnbergger, T. and Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 335–345.
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A.M., and Kikuchi, S.** (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Front. Microbiol.* **4**: 248.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., and Bolwell, G.P.** (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* **236**: 765–779.
- Oliva, R. et al.** (2010). Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* **12**: 705–715.
- Osmond, R.I., Hrmova, M., Fontaine, F., Imberty, A., and Fincher, G.B.** (2001). Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)-beta-D-glucans. Kinetics, specificity, structural analysis and biological implications. *Eur. J. Biochem. FEBS* **268**: 4190–4199.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K.** (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol. CB* **15**: 531–535.
- Ouellette, G.B. and Rioux, D.** (1992). Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch elm disease.
- Page, F., Altabe, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Lacroix, J.M., Robert-Baudouy, J., and Bohin, J.P.** (2001). Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **183**: 3134–3141.
- Pandey, S.P. and Somssich, I.E.** (2009). The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiol.* **150**: 1648–1655.
- Pantelides, I.S., Tjamos, S.E., and Paplomatas, E.J.** (2010). Ethylene perception via *ETR1* is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 191–202.
- Park, C.-J., Han, S.-W., Chen, X., and Ronald, P.C.** (2010). Elucidation of XA21-mediated innate immunity. *Cell. Microbiol.* **12**: 1017–1025.
- Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R.** (2002). A

knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **31**: 1–12.

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., and Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**: 255–265.

Paternotte, S.J. and Kesteren, H.A.V. (1993). A new aggressive strain of *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium* resistant cultivars of tomato in the Netherlands. *Neth. J. Plant Pathol.* **99**: 169–172.

Peer, W.A., Blakeslee, J.J., Yang, H., and Murphy, A.S. (2011). Seven Things We Think We Know about Auxin Transport. *Mol. Plant* **4**: 487–504.

Pegg, G.F. (1965). Phytotoxin Production by *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berthold. *Nature* **208**: 1228–1229.

Pegg, G.F. (1984). The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopathol. Mediterr.* **23**: 176–192.

Pegg, G.F. and Brady, B.L. (2002). *Verticillium Wilts* (CABI).

Peleg-Grossman, S., Golani, Y., Kaye, Y., Melamed-Book, N., and Levine, A. (2009). NPR1 Protein Regulates Pathogenic and Symbiotic Interactions between *Rhizobium* and Legumes and Non-Legumes. *PLoS ONE* **4**: e8399.

Peng, Z. et al. (2009). *Arabidopsis* Hormone Database: a comprehensive genetic and phenotypic information database for plant hormone research in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* **37**: D975–982.

Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.-P., and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **10**: 2103–2113.

Pennypacker, B.W. (1990). Growth and Physiological Response of Resistant Alfalfa Clones Infected with *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* **80**: 1247.

Pennypacker, B.W., Leath, K.T., and Hill, R.R.J. (1985). Resistant alfalfa plants as symptomless carriers of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Dis.* **69**: 510–511.

Pérez-Donoso, A.G., Sun, Q., Roper, M.C., Greve, L.C., Kirkpatrick, B., and Labavitch, J.M. (2010). Cell Wall-Degrading Enzymes Enlarge the Pore Size of Intervessel Pit Membranes in Healthy and *Xylella fastidiosa*-Infected Grapevines. *Plant Physiol.* **152**: 1748–1759.

- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C., and Bent, A.F.** (2004). Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **17**: 696–706.
- Phylogeny.fr: “One Click” Mode.**
- Pietro, A.D., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., and Roncero, M.I.G.** (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol. Plant Pathol.* **4**: 315–325.
- Pirhofer-Walzl, K., Eriksen, J., Rasmussen, J., Høgh-Jensen, H., Søgaard, K., and Rasmussen, J.** (2013). Effect of four plant species on soil 15N-access and herbage yield in temporary agricultural grasslands. *Plant Soil* **371**: 313–325.
- Pitzschke, A. and Hirt, H.** (2006). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Plant Physiol.* **141**: 351–356.
- Pomar, F., Novo, M., Bernal, M.A., Merino, F., and Barceló, A.R.** (2004). Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytol.* **163**: 111–123.
- Postel, S. and Kemmerling, B.** (2009). Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**: 1025–1031.
- Postnikova, O.A., Shao, J., and Nemchinov, L.G.** (2013). Analysis of the Alfalfa Root Transcriptome in Response to Salinity Stress. *Plant Cell Physiol.* **54**: 1041–1055.
- Powelson, M.L. and Rowe, R.C.** (1993). Biology and Management of Early Dying of Potatoes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 111–126.
- Powney, R., Smits, T.H.M., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J.E., Plummer, K.M., Beer, S.V., Luck, J., Duffy, B., and Rodoni, B.** (2011). Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. *J. Bacteriol.* **193**: 785–786.
- Presley, J.T., Carnes, H.R., Taylor, E.E., and Schnathorst, W.C.** (1966). Movement of conidia of *verticillium albo-atrum* in cotton plants. *Phytopathology*: 375.
- Prieto, P., Navarro-Raya, C., Valverde-Corredor, A., Amyotte, S.G., Dobinson, K.F., and Mercado-Blanco, J.** (2009). Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microb. Biotechnol.* **2**: 499–511.

- Ptashne, M.** (1992). A genetic switch: phage [lambda] and higher organisms (Cell Press : Blackwell Scientific Publications: Cambridge, Mass.).
- Qian, W. et al.** (2005). Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* **15**: 757–767.
- Qiu, L., Xie, F., Yu, J., and Wen, C.-K.** (2012). Arabidopsis RTE1 Is Essential to Ethylene Receptor ETR1 Amino-Terminal Signaling Independent of CTR11[C]. *Plant Physiol.* **159**: 1263–1276.
- Qutob, D. et al.** (2006). Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *Plant Cell Online* **18**: 3721–3744.
- Radovic, J., Sokolovic, D., and Markovic, J.** (2009). Alfalfa–most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnol. Anim. Husb.* **25**: 465–475.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., and Grill, E.** (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* **15**: 395–401.
- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P., Blancaflor, E.B., and Baskin, T.I.** (2007). Auxin, actin and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **50**: 514–528.
- Rahman, M.A., Abdullah, H., and Vanhaecke, M.** (1999). Histopathology of Susceptible and Resistant *Capsicum annuum* Cultivars Infected with *Ralstonia solanacearum*. *J. Phytopathol.* **147**: 129–140.
- Ralhan, A., Schottle, S., Thurow, C., Iven, T., Feussner, I., Polle, A., and Gatz, C.** (2012). The Vascular Pathogen *Verticillium longisporum* Requires a Jasmonic Acid-Independent COI1 Function in Roots to Elicit Disease Symptoms in Arabidopsis Shoots. *PLANT Physiol.* **159**: 1192–1203.
- Ranocha, P., Denancé, N., Vanholme, R., Freydier, A., Martinez, Y., Hoffmann, L., Köhler, L., Pouzet, C., Renou, J.-P., Sundberg, B., Boerjan, W., and Goffner, D.** (2010). Walls are thin 1 (WAT1), an Arabidopsis homolog of *Medicago truncatula* NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers. *Plant J.* **63**: 469–483.
- Rasmussen, M.W., Roux, M., Petersen, M., and Mundy, J.** (2012). MAP kinase cascades in Arabidopsis innate immunity. *Plant Proteomics* **3**: 169.
- Ravasz, E., Somera, A.L., Mongru, D.A., Oltvai, Z.N., and Barabási, A.-L.** (2002). Hierarchical Organization of Modularity in Metabolic Networks. *Science* **297**: 1551–1555.
- Receveur, V., Czjzek, M., Schüle, M., Panine, P., and Henrissat, B.** (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of a two domain fungal cellulase in solution probed by small angle

X-ray scattering. *J. Biol. Chem.* **277**: 40887–40892.

Reinke, J. and Berthold, G. (1879). Die Kräuselkrankheit der Kartoffel. Untersuchungen aus dem botanischen Laboratorium der Universität Göttingen (Parey Berlin).

Rep, M., Van Der Does, H.C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., De Koster, C.G., and Cornelissen, B.J.C. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol. Microbiol.* **53**: 1373–1383.

Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., Polle, A., Lipka, V., and Teichmann, T. (2012). *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7-dependent de novo xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 3823–3837.

Reusche, M., Truskina, J., Thole, K., Nagel, L., Rindfleisch, S., Tran, V.T., Braus-Stromeier, S.A., Braus, G.H., Teichmann, T., and Lipka, V. (2013). Infections with the vascular pathogens *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae* induce distinct disease symptoms and differentially affect drought stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.*

Rey, P., Benhamou, N., and Tirilly, Y. (1998). Ultrastructural and Cytochemical Investigation of Asymptomatic Infection by *Pythium* spp. *Phytopathology* **88**: 234–244.

Rioux, D., Nicole, M., Simard, M., and Ouellette, G.B. (1998). Immunocytochemical Evidence that Secretion of Pectin Occurs During Gel (Gum) and Tylosis Formation in Trees. *Phytopathology* **88**: 494–505.

Robb, J. (2007). *Verticillium* tolerance: resistance, susceptibility, or mutualism? *Can. J. Bot.* **85**: 903–910.

Robb, J., Lee, S.W., Mohan, R., and Kolattukudy, P.E. (1991). Chemical characterization of stress-induced vascular coating in tomato. *Plant Physiol.* **97**: 528–536.

Robb, J., Shittu, H., Soman, K.V., Kurosky, A., and Nazar, R.N. (2012). Arsenal of elevated defense proteins fails to protect tomato against *Verticillium dahliae*. *Planta* **236**: 623–633.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense. more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 317–343.

Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., and Jones, J.D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 372–379.

- Robison, M.M., Griffith, M., Pauls, K.P., and Glick, B.R.** (2001a). Dual Role for Ethylene in Susceptibility of Tomato to Verticillium Wilt. *J. Phytopathol.* **149**: 385–388.
- Robison, M.M., Shah, S., Tamot, B., Pauls, K.P., Moffatt, B.A., and Glick, B.R.** (2001b). Reduced symptoms of Verticillium wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Mol. Plant Pathol.* **2**: 135–145.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364–368.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., and Delledonne, M.** (2004). Nitric oxide signalling functions in plant–pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**: 795–803.
- Roper, M.C.** (2011). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Mol. Plant Pathol.* **12**: 628–637.
- Rotter, A., Usadel, B., Baebler, S., Stitt, M., and Gruden, K.** (2007). Adaptation of the MapMan ontology to biotic stress responses: application in solanaceous species. *Plant Methods* **3**: 10.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F.G., Tör, M., Vries, S. de, and Zipfel, C.** (2011). The Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens. *Plant Cell Online* **23**: 2440–2455.
- Rowe, R.C. and Powelson, M.L.** (2002). Potato Early Dying: Management Challenges in a Changing Production Environment. *Plant Dis.* **86**: 1184–1193.
- Roy, B.A. and Kirchner, J.W.** (2000). Evolutionary Dynamics of Pathogen Resistance and Tolerance. *Evolution* **54**: 51–63.
- Rygulla, W., Snowdon, R.J., Friedt, W., Happstadius, I., Cheung, W.Y., and Chen, D.** (2008). Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytopathology* **98**: 215–221.
- Saitoh, T., Ohtani, J., and Fukazawa, K.** (1993). The occurrence and morphology of tyloses and gums in the vessels of Japanese hardwoods. *IAWA-J.* v. **14(4)** p. **359–371**.
- Salanoubat, M. et al.** (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**: 497–502.
- Sanabria, N., Goring, D., Nürnberger, T., and Dubery, I.** (2008). Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytol.* **178**: 503–514.

- Sangster, T.A. and Queitsch, C.** (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 86–92.
- Sasu, M.A., Seidl-Adams, I., Wall, K., Winsor, J.A., and Stephenson, A.G.** (2010). Floral transmission of *Erwinia tracheiphila* by cucumber beetles in a wild *Cucurbita pepo*. *Environ. Entomol.* **39**: 140–148.
- Sattler, S. and Funnell-Harris, D.** (2013). Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens?†. *Plant Biotechnol.* **4**: 70.
- Schaible, L., Cannon, O.S., and Waddoups, V.** (1951). Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a Tomato cross. *Phytopathology* **41**: 986–990 pp.
- Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., and Mercado-Blanco, J.** (2012). Genetic Responses Induced in Olive Roots upon Colonization by the Biocontrol Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PLoS ONE* **7**: e48646.
- Schmitt, U. and Liese, W.** (1993). Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* **8**: 23–30.
- Schnathorst, W.C.** (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In *Fungal wilt diseases of plants*, edited by Marshall E (New York, Academic Press, 1981.).
- Schroeder, H.W.** (1955). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (Univ. of Minnesota.).
- Schumann, G.L. and D’Arcy, C.J.** (2010). *Essential plant pathology* (APS Press).
- Sebahia, M., Bocsanczy, A.M., Biehl, B.S., Quail, M.A., Perna, N.T., Glasner, J.D., DeClerck, G.A., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Bentley, S.D., Parkhill, J., and Beer, S.V.** (2010). Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *J. Bacteriol.* **192**: 2020–2021.
- Selman, I.W. and Buckley, W.R.** (1959). Factors affecting the invasion of tomato roots by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **42**: 227–IN6.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., and De Bolle, M.F.C.** (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 941–950.
- Shah, J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 365–371.
- Sharp, J.K., McNeil, M., and Albersheim, P.** (1984). The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial

walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *J. Biol. Chem.* **259**: 11321–11336.

- Sharp, R.E., LeNoble, M.E., Else, M.A., Thorne, E.T., and Gherardi, F.** (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *J. Exp. Bot.* **51**: 1575–1584.
- Shivaprasad, P.V., Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A.C.M., and Baulcombe, D.C.** (2012). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site–Leucine–Rich Repeats and Other mRNAs. *Plant Cell Online* **24**: 859–874.
- Shu-Ling, Z., Xing-Fen, W., Yan, Z., Jian-Feng, L., Li-Zhu, W., Dong-Mei, Z., and Zhi-Ying, M.** (2012). GbWRKY1, a novel cotton (*Gossypium barbadense*) WRKY gene isolated from a bacteriophage full-length cDNA library, is induced by infection with *Verticillium dahliae*. *Indian J. Biochem. Biophys.* **49**: 405–413.
- Siebrecht, S., Herdel, K., Schurr, U., and Tischner, R.** (2003). Nutrient translocation in the xylem of poplar—diurnal variations and spatial distribution along the shoot axis. *Planta* **217**: 783–793.
- Simko, I., Costanzo, S., Haynes, K.G., Christ, B.J., and Jones, R.W.** (2004a). Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 217–224.
- Simko, I., Haynes, K.G., Ewing, E.E., Costanzo, S., Christ, B.J., and Jones, R.W.** (2004b). Mapping genes for resistance to *Verticillium albo-atrum* in tetraploid and diploid potato populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis. *Mol. Genet. Genomics* **271**: 522–531.
- Simon, S. and Petrášek, J.** (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci.* **180**: 454–460.
- Simpson, A.J. et al.** (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**: 151–159.
- Sinha, A.K. and Wood, R.K.S.** (1967). The effect of growth substances on *Verticillium* wilt of tomato plants. *Ann. Appl. Biol.* **60**: 117–128.
- Smits, T.H.M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.E., and Duffy, B.** (2010). Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol. Plant–Microbe Interact. MPMI* **23**: 384–393.

- Soby, S., Caldera, S., Bates, R., and Vanetten, H.** (1996). Detoxification of the phytoalexins maackian and medicarpin by fungal pathogens of alfalfa. *Phytochemistry* **41**: 759–765.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., and Ronald, P.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**: 1804–1806.
- Soon, F.-F. et al.** (2012). Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases. *Science* **335**: 85–88.
- Spollen, W.G., LeNoble, M.E., Samuels, T.D., Bernstein, N., and Sharp, R.E.** (2000). Abscisic Acid Accumulation Maintains Maize Primary Root Elongation at Low Water Potentials by Restricting Ethylene Production. *Plant Physiol.* **122**: 967–976.
- Staswick, P.E. and Tiryaki, I.** (2004). The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **16**: 2117–2127.
- Stergiopoulos, I., De Kock, M.J.D., Lindhout, P., and De Wit, P.J.G.M.** (2007). Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **20**: 1271–1283.
- Subbarao, K.V., Raid, R.N., Kurtz, E.A., and Davis, R.M.** (1997). *Compendium of Lettuce Diseases* (Amer Phytopathological Society: St. Paul, Minn.).
- Sun, Q., Jiang, H., Zhu, X., Wang, W., He, X., Shi, Y., Yuan, Y., Du, X., and Cai, Y.** (2013a). Analysis of sea-island cotton and upland cotton in response to *Verticillium dahliae* infection by RNA sequencing. *BMC Genomics* **14**: 852.
- Sun, Q., Sun, Y., Walker, M.A., and Labavitch, J.M.** (2013b). Vascular Occlusions in Grapevines with Pierce’s Disease Make Disease Symptom Development Worse. *Plant Physiol.* **161**: 1529–1541.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., and Bent, A.F.** (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* **18**: 764–779.
- Takken, F.L., Albrecht, M., and Tameling, W.I.** (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 383–390.
- Takken, F. and Rep, M.** (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 309–314.
- Talboys, P.W.** (1964). A Concept of the Host-Parasite Relationship in *Verticillium* Wilt Diseases.

Nature **202**: 361–364.

Talboys, P.W. (1958). Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **41**: 249–IN8.

Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F. (2003). Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317–330.

Tellström, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Küster, H., and Niehaus, K. (2007). The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **143**: 825–837.

The R Project for Statistical Computing.

Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., and Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **37**: 914–939.

Thomma, B.P.H.J., Nurnberger, T., and Joosten, M.H.A.J. (2011). Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* **23**: 4–15.

Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., and Cammue, B.P. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.* **13**: 63–68.

Tjamos, E.C., Beckman, C.H., and Division, N.A.T.O.S.A. (1989). *Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control* (Springer-Verlag).

Tjamos, E.C. and Smith, I.M. (1975). The expression of resistance to *Verticillium albo-atrum* in monogenically resistant tomato varieties. *Physiol. Plant Pathol.* **6**: 215–225.

Tronchet, M., Balagué, C., Kroj, T., Jouanin, L., and Roby, D. (2010). Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 83–92.

Tsuda, K., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2008a). The interplay between MAMP and SA signaling. *Plant Signal. Behav.* **3**: 359–361.

Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., and Katagiri, F. (2008b). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **53**: 763–775.

Typas, M.A., Griffen, A.M., Bainbridge, B.W., and Heale, J.B. (1992). Restriction fragment length

polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **95**: 157–162.

Tzeng, D.D. and DeVay, J.E. (1984). Ethylene production and toxigenicity of methionine and its derivatives with riboflavin in cultures of *Verticillium*, *Fusarium* and *Colletotrichum* species exposed to light. *Physiol. Plant.* **62**: 545–552.

Uknes, S., Mauch–Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **4**: 645–656.

Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordana, X., and Holuigue, L. (2004). NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Mol. Plant–Microbe Interact. MPMI* **17**: 34–42.

Urbanczyk–Wochniak, E. et al. (2006). Conversion of MapMan to allow the analysis of transcript data from Solanaceous species: effects of genetic and environmental alterations in energy metabolism in the leaf. *Plant Mol. Biol.* **60**: 773–792.

Vallad, G.E. and Subbarao, K.V. (2008). Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* **98**: 871–885.

Vandemark, G.J., Larsen, R.C., and Hughes, T.J. (2006). Heritability of Resistance to *Verticillium* Wilt in Alfalfa. *Plant Dis.* **90**: 314–318.

VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., and Farmer, E.E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *Plant Cell* **6**: 1191–1192.

Varma Penmetsa, R. et al. (2008). The *Medicago truncatula* ortholog of *Arabidopsis* EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant J.* **55**: 580–595.

Verdier, J. et al. (2013). A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds. *Plant Physiol.* **163**: 757–774.

Verhage, A., Wees, S.C.M. van, and Pieterse, C.M.J. (2010). Plant Immunity: It’s the Hormones Talking, But What Do They Say? *Plant Physiol.* **154**: 536–540.

Veronese, P., Narasimhan, M.L., Stevenson, R.A., Zhu, J.–K., Weller, S.C., Subbarao, K.V., and Bressan, R.A. (2003a). Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in

Arabidopsis thaliana. Plant J. **35**: 574–587.

- Veronese, P., Narasimhan, M.L., Stevenson, R.A., Zhu, J.-K., Weller, S.C., Subbarao, K.V., and Bressan, R.A.** (2003b). Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. Cell Mol. Biol. **35**: 574–587.
- Viands, D.R.** (1985). Comparison of “Maris Kabul” with “Vertus” Alfalfa for Resistance to *Verticillium* Wilt1. Crop Sci. **25**: 1096.
- Vicente, J.G., Conway, J., Roberts, S.J., and Taylor, J.D.** (2001). Identification and Origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and Related Pathovars. Phytopathology **91**: 492–499.
- Vining, K.J., Zhang, Q., Smith, C.A., and Davis, T.M.** (2007). Identification of Resistance Gene Analogs and *Verticillium* Wilt Resistance-like Sequences in *Mentha longifolia*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. **132**: 541–550.
- Vorhölter, F.-J., Wiggerich, H.-G., Scheidle, H., Sidhu, V.K., Mrozek, K., Küster, H., Pühler, A., and Niehaus, K.** (2012). Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases. BMC Microbiol. **12**: 239.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Van Loon, L.C., Dicke, M., and Pieterse, C.M.J.** (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI **18**: 923–937.
- Walters, D. and Heil, M.** (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol. **71**: 3–17.
- Wang, G., Fiers, M., Ellendorff, U., Wang, Z., de Wit, P.J.G.M., Angenent, G.C., and Thomma, B.P.H.J.** (2010). The Diverse Roles of Extracellular Leucine-rich Repeat-containing Receptor-like Proteins in Plants. Crit. Rev. Plant Sci. **29**: 285–299.
- Wang, H.-M., Lin, Z.-X., Zhang, X.-L., Chen, W., Guo, X.-P., Nie, Y.-C., and Li, Y.-H.** (2008). Mapping and quantitative trait loci analysis of *verticillium* wilt resistance genes in cotton. J. Integr. Plant Biol. **50**: 174–182.
- Wang, J.-Y., Cai, Y., Gou, J.-Y., Mao, Y.-B., Xu, Y.-H., Jiang, W.-H., and Chen, X.-Y.** (2004). VdNEP, an Elicitor from *Verticillium dahliae*, Induces Cotton Plant Wilting. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 4989–4995.
- Wang, K.L.-C., Li, H., and Ecker, J.R.** (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell

- Wang, M., Verdier, J., Benedito, V.A., Tang, Y., Murray, J.D., Ge, Y., Becker, J.D., Carvalho, H., Rogers, C., Udvardi, M., and He, J.** (2013). LegumeGRN: a gene regulatory network prediction server for functional and comparative studies. *PloS One* **8**: e67434.
- Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M., and Lawton, M.** (1996). The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 2598–2602.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Ann. Bot.* **100**: 681–697.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562–565.
- Wilton, M., Subramaniam, R., Elmore, J., Felsensteiner, C., Coaker, G., and Desveaux, D.** (2010). The type III effector HopF2 Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 2349–2354.
- Winkel, B.S.J.** (2004). Metabolic Channeling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 85–107.
- De Wit, P.J.G.M., Mehrabi, R., Van den Burg, H.A., and Stergiopoulos, I.** (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol. Plant Pathol.* **10**: 735–747.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., and Després, C.** (2012). The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Rep.* **1**: 639–647.
- Xie, C., Wang, C., Wang, X., and Yang, X.** (2013). Proteomics-based analysis reveals that *Verticillium dahliae* toxin induces cell death by modifying the synthesis of host proteins. *J. Gen. Plant Pathol.* **79**: 335–345.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., and Zhu, J.-K.** (2002). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**: 8588–8596.
- Xu, R. and Shi, L.** (2000). Influence of exogenous hormones on the disease incidence of *Verticillium dahliae* in cotton plants. *Plant Prot.* **26**: 7–8.
- Yadav, P.K., Singh, V.K., Yadav, S., Yadav, K.D.S., and Yadav, D.** (2009). In silico analysis of pectin lyase and pectinase sequences. *Biochem. Biokhimiia* **74**: 1049–1055.
- Yadeta, K.A. and Thomma, B.P.H.** (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* **4**.

- Yakovlev, I.A., Lee, Y., Rotter, B., Olsen, J.E., Skråppa, T., Johnsen, Ø., and Fossdal, C.G.** (2014). Temperature-dependent differential transcriptomes during formation of an epigenetic memory in Norway spruce embryogenesis. *Tree Genet. Genomes* **10**: 355–366.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M.A., and Raskin, I.** (1993). Pathway of Salicylic Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco. *Plant Physiol.* **103**: 315.
- Yang, L., Jue, D., Li, W., Zhang, R., Chen, M., and Yang, Q.** (2013). Identification of MiRNA from Eggplant (*Solanum melongena* L.) by Small RNA Deep Sequencing and Their Response to *Verticillium dahliae* Infection. *PLoS ONE* **8**: e72840.
- Yang, S.F. and Hoffman, N.E.** (1984). Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 155–189.
- Yan, S. and Dong, X.** (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20C**: 64–68.
- Yin, Z., Li, Y., Han, X., and Shen, F.** (2012). Genome-wide profiling of miRNAs and other small non-coding RNAs in the *Verticillium dahliae*-inoculated cotton roots. *PloS One* **7**: e35765.
- Young, N.D. et al.** (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**: 520–524.
- Young, N.D., Mudge, J., and Ellis, T.H.N.** (2003). Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 199–204.
- Yuan, H.-Y., Yao, L.-L., Jia, Z.-Q., Li, Y., and Li, Y.-Z.** (2006). *Verticillium dahliae* toxin induced alterations of cytoskeletons and nucleoli in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Protoplasma* **229**: 75–82.
- Zare, R., Gams, W., Starink-Willemse, M., and Summerbell, R.C.** (2007). *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwig.* **85**: 463–489.
- Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Müller, S., Rotter, B., Winter, P., Fliser, D., and Heine, G.H.** (2014). Massive analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* **9**: 161–172.
- Zeise, K. and Von Tiedemann, A.** (2002). Host Specialization among Vegetative Compatibility Groups of *Verticillium dahliae* in Relation to *Verticillium longisporum*. *J. Phytopathol.* **150**: 112–119.

- Zhai, J. et al.** (2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.* **25**: 2540–2553.
- Zhang, A., Wan, L., Wu, C., Fang, Y., Han, G., Li, H., Zhang, Z., and Wang, H.** (2013a). Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV using wavelength switching detection. *Mol. Basel Switz.* **18**: 14241–14257.
- Zhang, B. and Horvath, S.** (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **4**: Article17.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., and Anderson, T.A.** (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev. Biol.* **289**: 3–16.
- Zhang, B., Yang, Y., Chen, T., Yu, W., Liu, T., Li, H., Fan, X., Ren, Y., Shen, D., Liu, L., Dou, D., and Chang, Y.** (2012). Island Cotton Gbve1 Gene Encoding A Receptor-Like Protein Confers Resistance to Both Defoliating and Non-Defoliating Isolates of *Verticillium dahliae*. *PLoS ONE* **7**: e51091.
- Zhang, J., Du, X., Wang, Q., Chen, X., Lv, D., Xu, K., Qu, S., and Zhang, Z.** (2010). Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. *BMC Res. Notes* **3**: 208.
- Zhang, J. and Zhou, J.-M.** (2010). Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Mol. Plant* **3**: 783–793.
- Zhang, S. and Klessig, D.F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* **6**: 520–527.
- Zhang, W., He, S.Y., and Assmann, S.M.** (2008). The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **56**: 984–996.
- Zhang, W.-W., Jiang, T.-F., Cui, X., Qi, F.-J., and Jian, G.-L.** (2013b). Colonization in cotton plants by a green fluorescent protein labelled strain of *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* **135**: 867–876.
- Zhang, Y., Wang, X.F., Ding, Z.G., Ma, Q., Zhang, G.R., Zhang, S.L., Li, Z.K., Wu, L.Q., Zhang, G.Y., and Ma, Z.Y.** (2013c). Transcriptome profiling of *Gossypium barbadense* inoculated with *Verticillium dahliae* provides a resource for cotton improvement. *BMC Genomics* **14**: 637.
- Zhang, Z., van Esse, H.P., van Damme, M., Fradin, E.F., Liu, C.-M., and Thomma, B.P.H.J.** (2013d). Ve1-mediated resistance against *Verticillium* does not involve a hypersensitive response in

Arabidopsis. *Mol. Plant Pathol.* **14**: 719–727.

- Zhang, Z., Fradin, E., de Jonge, R., van Esse, H.P., Smit, P., Liu, C.-M., and Thomma, B.P.H.J.** (2013e). Optimized agroinfiltration and virus-induced gene silencing to study Ve1-mediated *Verticillium* resistance in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **26**: 182–190.
- Zhao, C., Nie, H., Shen, Q., Zhang, S., Lukowitz, W., and Tang, D.** (2014a). EDR1 Physically Interacts with MKK4/MKK5 and Negatively Regulates a MAP Kinase Cascade to Modulate Plant Innate Immunity. *PLoS Genet* **10**: e1004389.
- Zhao, P., Zhao, Y.-L., Jin, Y., Zhang, T., and Guo, H.-S.** (2014b). Colonization process of *Arabidopsis thaliana* roots by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Protein Cell* **5**: 94–98.
- Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y., and Dong, X.** (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* **11**: 587–596.
- Zhou, X.-J., Lu, S., Xu, Y.-H., Wang, J.-W., and Chen, X.-Y.** (2002). A cotton cDNA (GaPR-10) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity. *Plant Sci.* **162**: 629–636.
- Zhu, H., Choi, H.-K., Cook, D.R., and Shoemaker, R.C.** (2005). Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiol.* **137**: 1189–1196.
- Zhu, Q.-H., Fan, L., Liu, Y., Xu, H., Llewellyn, D., and Wilson, I.** (2013). miR482 regulation of NBS-LRR defense genes during fungal pathogen infection in cotton. *PLoS One* **8**: e84390.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganai, M., and Wasternack, C.** (2000). Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *J. Biol. Chem.* **275**: 19132–19138.
- Zipfel, C.** (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 414–420.
- Zipfel, C.** (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **20**: 10–16.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760.

G. ANNEXES

Tableau S. 1 : Gènes qui répondent différemment à l'inoculation dans la lignée A17 (résistante).

| Gène | logCPM | Fold | p-Value | Annotation |
|----------------------------|--------|-------|---------|--|
| IMGA contig_64564_1.1 | 5,11 | 7,30 | 2,6E-11 | myb sant-like dna-binding domain protein |
| IMGA Medtr7g086320.1 | 5,81 | 5,84 | 7,5E-15 | hypothetical protein MTR_7g086320 |
| contig_126470 | 3,77 | 5,54 | 1,2E-05 | contig_126470 |
| IMGA Medtr1g014320.1 | 2,80 | 4,83 | 6,5E-07 | nadp-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| IMGA Medtr5g022390.1 | 6,49 | 4,68 | 4,1E-11 | rhodanese-related sulfurtransferase |
| IMGA Medtr2g035440.1 | 4,02 | 4,41 | 3,0E-05 | haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3 |
| IMGA Medtr1g097910.1 | 4,08 | 4,25 | 5,0E-09 | universal stress protein a-like protein |
| TC187179 | 5,15 | 4,21 | 3,8E-05 | alcohol dehydrogenase |
| IMGA Medtr3g089970.1 | 7,41 | 3,92 | 3,8E-04 | alcohol dehydrogenase |
| TC176541 | 5,93 | 3,90 | 1,2E-04 | alcohol dehydrogenase |
| IMGA contig_240964_1.1 | 4,48 | 3,85 | 1,6E-07 | wound-responsive family protein |
| TC183087 | 6,70 | 3,84 | 2,7E-04 | haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3 |
| IMGA Medtr1g098140.1 | 4,46 | 3,71 | 4,8E-07 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr1g083950.1 | 7,19 | 3,55 | 3,7E-04 | Universal stress protein Alike protein c |
| TC174347 | 5,32 | 3,41 | 1,5E-08 | probable caffeoyl- o-methyltransferase at4g26220-like |
| gi 388517796 gb BT147166.1 | 3,91 | 3,21 | 1,8E-04 | alcohol dehydrogenase |
| TC194155 | 4,64 | 3,19 | 8,1E-06 | chalcone synthase |
| TC194710 | 2,38 | 3,06 | 2,3E-04 | patatin-like phospholipase |
| TC194357 | 4,70 | 2,82 | 3,3E-06 | Bet v1 |
| TC175803 | 2,76 | 2,74 | 4,5E-04 | isoflavone synthase |
| IMGA Medtr7g016700.1 | 4,41 | 2,74 | 8,3E-05 | chalcone synthase |
| IMGA Medtr7g055630.1 | 6,60 | 2,71 | 4,3E-06 | ankyrin repeat protein |
| IMGA contig_104207_1.1 | 5,86 | 2,71 | 2,1E-04 | non-symbiotic hemoglobin |
| IMGA Medtr7g104460.1 | 5,63 | 2,61 | 2,2E-04 | dt1 |
| TC185805 | 6,93 | 2,58 | 2,3E-04 | Bet v1 |
| IMGA Medtr4g120860.1 | 5,67 | 2,57 | 4,3E-05 | Bet v1 |
| IMGA Medtr2g099470.1 | 4,69 | 2,54 | 3,4E-04 | endochitinase PR4 |
| IMGA Medtr5g022380.1 | 4,35 | 2,46 | 1,7E-04 | nodulin family protein |
| contig_7825 | 4,60 | 2,42 | 6,0E-05 | contig_7825 |
| IMGA Medtr1g007920.1 | 4,34 | 2,42 | 4,8E-04 | iq calmodulin-binding motif protein |
| TC196800 | 6,22 | 2,40 | 2,0E-04 | hypothetical protein MTR_2g016650 |
| IMGA contig_54032_1.1 | 6,11 | 2,29 | 1,1E-04 | polygalacturonase at1g48100-like |
| IMGA contig_59636_1.1 | 5,46 | 2,28 | 7,8E-05 | isoflavone synthase 1 |
| IMGA Medtr8g078170.1 | 4,71 | -2,32 | 1,9E-04 | coiled-coil domain-containing protein |
| TC174196 | 3,22 | -2,47 | 4,6E-04 | ribonuclease h protein at1g65750-like |
| IMGA Medtr8g022300.1 | 6,91 | -2,60 | 8,1E-05 | dormancy auxin associated protein |
| IMGA Medtr2g096120.1 | 3,07 | -2,65 | 2,3E-04 | uncharacterized loc101218723 |
| IMGA contig_167649_1.1 | 5,38 | -2,74 | 6,5E-06 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha mitochondrial-like |
| IMGA Medtr6g008680.1 | 4,26 | -2,80 | 3,2E-04 | hypothetical protein MTR_6g008680 |
| IMGA Medtr5g089580.1 | 2,53 | -3,06 | 5,7E-04 | hypothetical protein MTR_5g089580 |
| IMGA Medtr2g009480.1 | 4,64 | -3,57 | 4,8E-04 | chalcone synthase |
| TC176640 | 5,44 | -3,75 | 3,1E-08 | dormancy auxin associated protein |
| IMGA Medtr2g101370.1 | 6,55 | -3,81 | 1,6E-04 | major intrinsic protein family transporter |
| TC191486 | 4,02 | -4,13 | 9,7E-07 | f-box protein skp2a |

| | | | | |
|----------------------------|------|--------|---------|----------------------------|
| IMG contig_70372_1.1 | 3,70 | -5,42 | 1,2E-05 | defensin-like protein |
| gi 217071181 gb BT051287.1 | 2,06 | -16,07 | 5,3E-06 | 60s ribosomal protein l35a |
| ABPE01002352 | 3,58 | 125,69 | 8,9E-37 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01003149 | 1,60 | 153,95 | 8,8E-16 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01000696 | 2,85 | 205,84 | 3,8E-29 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01002781 | 2,55 | 304,66 | 1,5E-27 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01000172 | 2,91 | 389,40 | 2,5E-32 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01000318 | 1,20 | 613,66 | 1,7E-14 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01003735 | 1,27 | 656,93 | 4,3E-15 | Verticillium sp. VaMs.102 |

logCPM (log du nombre de comptage par million) ; Fold (coefficient de variation de l'expression du gène) ; *p-value* (mesure statistique de la différence d'expression entre la condition inoculée et la condition contrôle).

Un code couleur permet de visualiser facilement l'échelle des intensités d'expression. Ainsi, une couleur rouge est attribuée aux gènes induits et une couleur verte est attribuée aux gènes qui sont réprimés.

Les gènes qui sont en grisé sont ceux dont nous n'avons pas pu extraire les séquences nucléotidiques en raison d'un manque de précision sur leurs identifiants

Tableau S. 2 : Gènes qui répondent différenciellement à l'inoculation dans la lignée F83005.5.

| Gène | logCPM | Fold | P-Value | Annotation |
|-------------------------|--------|-------------|---------|---|
| IMGAMedtr3g034640.1 | 2,64 | 6,29 | 9,4E-12 | specific tissue protein |
| IMGAMedtr3g070860.1 | 2,44 | 5,83 | 5,4E-05 | oxidoreductase family protein |
| IMGAcontig_56839_1.1 | 3,11 | 5,80 | 2,7E-23 | seed linoleate 9s-lipoxygenase |
| IMGAMedtr7g086320.1 | 5,51 | 5,56 | 1,9E-04 | hypothetical protein MTR_7g086320 |
| IMGAcontig_240964_1.1 | 2,69 | 4,67 | 1,9E-04 | wound-responsive family protein |
| IMGAcontig_64564_1.1 | 3,92 | 4,52 | 6,8E-13 | myb sant-like dna-binding domain protein |
| IMGAMedtr4g113820.1 | 6,21 | 3,88 | 9,9E-04 | early nodulin-93-like |
| IMGAMedtr6g044810.1 | 4,24 | 3,81 | 3,4E-04 | kunitz type trypsin inhibitor alpha-fucosidase |
| IMGAMedtr8g018570.1 | 5,88 | 3,75 | 4,3E-10 | polypeptide with a gag-like domain-containing protein |
| IMGAcontig_123443_1.1 | 2,98 | 3,60 | 1,0E-10 | extracellular dermal glycoprotein |
| TC190379 | 2,74 | 3,52 | 3,2E-03 | caffeic acid o-methyltransferase |
| gi335970139gbJL881343.1 | 1,16 | 3,46 | 1,3E-05 | unknown |
| TC177302 | 1,28 | 3,29 | 4,2E-05 | protein tify 10a-like |
| TC187186 | 1,64 | 3,24 | 3,9E-07 | cs domain protein |
| IMGAcontig_68072_1.1 | 1,11 | 3,12 | 1,4E-04 | sucrose transporter 1 |
| IMGAMedtr5g022380.1 | 2,52 | 2,98 | 1,4E-04 | nodulin family protein |
| IMGAMedtr3g082260.1 | 1,84 | 2,94 | 5,9E-05 | atfp4-like protein |
| TC173388 | 1,96 | 2,92 | 1,0E-03 | allergen pru |
| TC185249 | 3,30 | 2,90 | 1,5E-08 | papain family cysteine protease |
| IMGAMedtr4g119050.1 | 1,72 | 2,80 | 3,1E-06 | monothiol glutaredoxin-s2-like |
| IMGAcontig_83034_1.1 | 3,15 | 2,78 | 2,1E-03 | leucoanthocyanidin dioxygenase-like |
| contig_15274 | 1,20 | 2,74 | 2,7E-04 | unknown |
| contig_10268 | 1,61 | 2,72 | 1,9E-05 | unknown |
| IMGAMedtr1g083950.1 | 5,96 | 2,71 | 1,3E-03 | universal stress protein a-like protein |
| IMGAMedtr4g119030.1 | 3,16 | 2,69 | 4,9E-06 | monothiol glutaredoxin-s2-like |
| TC186741 | 4,77 | 2,69 | 6,5E-04 | alcohol dehydrogenase |
| contig_115027 | 3,27 | 2,67 | 5,2E-06 | unknown |
| IMGAMedtr5g022390.1 | 4,21 | 2,65 | 3,3E-04 | rhodanese-related sulfurtransferase |
| IMGAcontig_127792_1.1 | 3,29 | 2,57 | 6,8E-05 | wound-responsive family protein |
| TC198322 | 2,30 | 2,54 | 1,2E-04 | pollen protein ole e i-like protein |
| IMGAcontig_120264_2.1 | 3,10 | 2,51 | 4,1E-06 | pgpd14 isoform 1 |
| IMGAMedtr4g079140.1 | 2,17 | 2,51 | 1,1E-06 | mlo-like protein 12-like |
| IMGAMedtr6g018270.1 | 3,94 | 2,49 | 1,3E-03 | lob domain-containing protein 41-like |
| IMGAMedtr8g022440.1 | 2,69 | 2,48 | 4,5E-04 | auxin-responsive family protein |
| BE323045 | 3,06 | 2,47 | 1,7E-04 | hypothetical protein MTR_2g016650 |
| IMGAMedtr1g061640.1 | 5,65 | 2,45 | 1,4E-03 | myb sant-like dna-binding domain protein |
| IMGAcontig_8838_1.1 | 1,74 | 2,42 | 4,7E-05 | unknown |
| IMGAcontig_132576_1.1 | 4,36 | 2,39 | 1,3E-03 | sesquiterpene synthase |
| contig_7825 | 2,65 | 2,38 | 5,7E-05 | unknown |
| IMGAMedtr5g016320.1 | 2,34 | 2,34 | 3,3E-04 | indole-3-acetic acid-amido synthetase |
| IMGAMedtr7g085120.1 | 4,07 | 2,34 | 1,2E-03 | apyrase |
| TC187179 | 4,49 | 2,34 | 4,8E-04 | unknown |
| IMGAcontig_49356_1.1 | 1,95 | 2,33 | 4,5E-05 | dynammin-related protein 5a-like |
| gi62083993embAJ866733.1 | 3,15 | 2,29 | 1,9E-03 | allene oxide cyclase chloroplastic-like |

| | | | | |
|-------------------------|------|------|---------|--|
| IMGAMedtr4g126920.1 | 2,08 | 2,29 | 2,5E-04 | xyloglucan endotransglycosylase 6 |
| TC196800 | 5,66 | 2,27 | 5,9E-05 | hypothetical protein MTR_2g016650 |
| BQ152373 | 1,76 | 2,26 | 4,7E-05 | unknown |
| TC201574 | 3,16 | 2,24 | 5,0E-05 | laccase-7-like |
| IMGAContig_75277_2.1 | 3,73 | 2,21 | 7,0E-04 | wrky family transcription factor |
| contig_116016 | 1,91 | 2,19 | 4,7E-04 | unknown |
| TC179073 | 4,12 | 2,17 | 8,6E-05 | jasmonate zim-domain protein |
| IMGAMedtr5g036810.1 | 1,89 | 2,16 | 1,9E-03 | f-box family protein |
| IMGAMedtr4g054920.1 | 4,11 | 2,16 | 2,5E-07 | cytochrome p450 94a1 |
| TC177953 | 4,75 | 2,15 | 9,8E-06 | ap2 erf and b3 domain-containing transcription repressor tem1-like |
| contig_69027 | 1,67 | 2,14 | 2,8E-03 | unknown |
| TC184983 | 1,54 | 2,14 | 1,7E-03 | plant phospholipase-like protein |
| IMGAMedtr4g106500.1 | 4,07 | 2,14 | 1,3E-06 | cdp-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3- partial |
| gi388494705gbBT135624.1 | 2,38 | 2,14 | 1,1E-03 | flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like |
| TC191281 | 4,90 | 2,13 | 5,1E-04 | wound-responsive family protein |
| IMGAMedtr1g093600.1 | 2,01 | 2,10 | 1,7E-03 | ap2 erf and b3 domain-containing transcription repressor tem1-like |
| TC186292 | 1,56 | 2,09 | 2,4E-03 | auxin-repressed protein |
| IMGAContig_64381_1.1 | 1,65 | 2,09 | 1,2E-03 | wrky1b transcription factor |
| contig_106602 | 3,43 | 2,08 | 1,0E-05 | unknown |
| IMGAContig_13703_1.1 | 3,11 | 2,06 | 2,6E-05 | e3 ubiquitin-protein ligase pub22-like |
| TC187968 | 3,44 | 2,05 | 1,8E-04 | phenylalanine ammonia-lyase |
| TC200494 | 5,45 | 2,02 | 2,4E-03 | unknown |
| IMGAMedtr5g079890.1 | 2,46 | 2,02 | 6,5E-04 | elicitor-responsive protein 1-like |
| IMGAMedtr7g027960.1 | 1,52 | 2,01 | 2,9E-03 | flavone synthase ii |
| IMGAContig_57575_1.1 | 2,83 | 2,01 | 1,6E-04 | sucrose synthase |
| IMGAMedtr3g064420.1 | 4,26 | 2,00 | 2,3E-05 | butyrate-- ligase peroxisomal-like |
| IMGAMedtr8g091590.1 | 7,68 | 1,99 | 3,2E-03 | hypothetical protein MTR_8g091590 |
| IMGAMedtr1g090150.1 | 3,10 | 1,99 | 3,1E-04 | tau class glutathione transferase gstu43 |
| TC175054 | 3,49 | 1,98 | 1,3E-05 | duf4050 family protein |
| IMGAMedtr7g009710.1 | 2,10 | 1,97 | 3,7E-04 | 2-aminoethanethiol dioxygenase-like |
| TC184709 | 1,85 | 1,96 | 2,8E-03 | feruloyl esterase a |
| IMGAMedtr5g036410.1 | 2,51 | 1,96 | 6,1E-04 | metalloendoproteinase 1-like |
| IMGAMedtr1g106430.1 | 3,12 | 1,96 | 2,0E-03 | btb poz domain-containing protein npy2-like |
| contig_240314 | 4,61 | 1,96 | 1,4E-03 | unknown |
| IMGAMedtr2g098060.1 | 2,14 | 1,95 | 1,3E-03 | hypothetical protein MTR_2g098060 |
| TC194155 | 5,64 | 1,95 | 1,1E-03 | chalcone synthase |
| IMGAMedtr7g093820.1 | 3,98 | 1,94 | 4,1E-05 | disease resistance response protein |
| TC184160 | 1,46 | 1,93 | 2,7E-03 | guanine nucleotide-binding 3 homolog |
| IMGAMedtr1g088110.1 | 1,75 | 1,91 | 3,0E-03 | pollen ole e i family allergen |
| IMGAMedtr7g102820.1 | 2,62 | 1,91 | 1,3E-04 | probable 2-oxoglutarate fe -dependent dioxygenase-like |
| IMGAMedtr1g097900.1 | 3,09 | 1,91 | 6,0E-05 | chalcone synthase |
| IMGAMedtr5g018720.1 | 2,30 | 1,91 | 3,2E-03 | hth-type transcriptional regulator protein ptxe |
| IMGAMedtr1g098140.1 | 5,06 | 1,90 | 3,6E-04 | chalcone synthase |
| IMGAMedtr4g059670.1 | 3,23 | 1,90 | 1,3E-03 | root cap late embryogenesis-like protein |
| IMGAContig_70008_1.1 | 1,79 | 1,89 | 1,2E-03 | guanine nucleotide-binding 3 homolog |
| gi388514404gbBT145470.1 | 6,19 | 1,89 | 7,1E-06 | sucrose synthase |
| gi388522822gbBT149679.1 | 4,64 | 1,89 | 8,1E-05 | extracellular dermal glycoprotein |

| | | | | |
|-------------------------|-------|-------|---------|--|
| gi388511662gbBT144099.1 | 3,42 | 1,88 | 8,9E-04 | sugar transport protein 13-like |
| TC191665 | 1,75 | 1,87 | 1,8E-03 | senescence-associated family protein |
| TC178644 | 2,39 | 1,85 | 1,3E-03 | hypothetical protein MTR_2g075590 |
| IMGAMedtr5g013770.1 | 3,88 | 1,83 | 4,3E-05 | senescence-associated family protein |
| IMGAMedtr7g113420.1 | 3,77 | 1,83 | 2,6E-03 | cp12 domain-containing family protein |
| IMGAMedtr2g082050.1 | 3,76 | 1,81 | 3,5E-04 | terpene synthase metal-binding domain protein |
| IMGAMedtr5g015190.1 | 3,42 | 1,80 | 4,5E-04 | vq motif protein |
| IMGAcontig_105546_1.1 | 2,34 | 1,79 | 9,6E-04 | calcium-binding protein cml38 |
| IMGAMedtr4g100380.1 | 5,71 | 1,79 | 5,5E-05 | ethylene-responsive transcription factor 1a-like |
| TC192375 | 6,85 | 1,79 | 7,5E-05 | sucrose synthase |
| IMGAMedtr1g099310.1 | 4,92 | 1,78 | 8,9E-04 | acidic chitinase |
| IMGAMedtr7g065660.1 | 4,28 | 1,78 | 3,2E-04 | glutathione s-transferase gst |
| TC194512 | 3,11 | 1,77 | 6,4E-04 | unknown |
| TC185457 | 2,50 | 1,77 | 1,3E-03 | protein gast1-like |
| TC184671 | 2,37 | 1,77 | 8,5E-04 | senescence-associated family protein |
| IMGAMedtr5g062240.1 | 3,93 | 1,76 | 1,3E-03 | hypothetical protein MTR_5g062240 |
| IMGAMedtr5g013260.1 | 3,86 | 1,76 | 6,5E-04 | zeaxanthin epoxidase |
| TC179111 | 5,61 | 1,75 | 3,3E-03 | phenylalanine ammonia-lyase |
| TC202037 | 4,76 | 1,74 | 1,1E-03 | haloacid dehalogenase-like hydrolase superfamily protein isoform 2 |
| TC189980 | 7,09 | 1,74 | 1,7E-03 | sucrose synthase |
| IMGAMedtr1g005680.1 | 4,16 | 1,72 | 8,6E-04 | ribosomal protein s3 |
| IMGAMedtr3g028450.1 | 3,83 | 1,72 | 3,5E-04 | transmembrane |
| IMGAMedtr5g035670.1 | 2,83 | 1,72 | 9,8E-04 | dufl262 family protein |
| TC191760 | 7,95 | 1,71 | 2,0E-04 | extracellular dermal glycoprotein |
| IMGAMedtr6g083900.1 | 3,02 | 1,70 | 2,3E-03 | chy zinc finger protein |
| IMGAMedtr4g127160.1 | 3,08 | 1,70 | 2,1E-03 | nucleolar and coiled-body phosphoprotein |
| IMGAMedtr1g097910.1 | 5,15 | 1,70 | 1,5E-03 | chalcone synthase |
| IMGAMedtr3g009050.1 | 3,81 | 1,69 | 2,8E-03 | leucine-rich repeat family protein |
| IMGAMedtr4g094010.1 | 3,43 | 1,68 | 1,2E-03 | white-brown-complex abc transporter family |
| IMGAMedtr6g078330.1 | 3,11 | 1,68 | 2,8E-03 | glycoside hydrolase family 1 protein |
| IMGAMedtr7g101680.1 | 6,40 | 1,67 | 2,4E-03 | phenylalanine ammonia-lyase |
| IMGAcontig_58326_1.1 | 2,48 | 1,67 | 3,1E-03 | zinc finger ccch domain-containing protein 11-like |
| IMGAMedtr2g099010.1 | 6,42 | 1,66 | 9,9E-04 | salt tolerance-like protein |
| gi335971876gbJL883080.1 | 4,93 | 1,66 | 3,2E-03 | phenylalanine ammonia-lyase |
| IMGAMedtr7g055630.1 | 5,45 | 1,66 | 2,1E-03 | ankyrin repeat protein |
| IMGAMedtr7g050950.1 | 5,87 | 1,64 | 6,8E-04 | pectin methylesterase |
| IMGAMedtr3g109160.1 | 3,91 | 1,64 | 9,1E-04 | auxin-induced protein 6b |
| IMGAcontig_90018_1.1 | 4,05 | 1,63 | 2,0E-03 | inactive purple acid phosphatase-like protein |
| IMGAMedtr3g014180.1 | 3,80 | 1,63 | 2,5E-03 | transmembrane protein, putative |
| IMGAMedtr7g038480.1 | 4,76 | 1,61 | 1,2E-03 | oxidoreductase ferric-chelate reductase |
| IMGAMedtr5g089820.1 | 4,08 | 1,61 | 1,9E-03 | duf4228 domain protein |
| IMGAMedtr4g133620.1 | 5,78 | 1,58 | 1,8E-03 | auxin-induced in root cultures protein 12-like |
| IMGAMedtr2g029860.1 | 4,79 | 1,54 | 2,7E-03 | peroxidase family protein |
| IMGAMedtr6g065460.1 | 8,36 | 1,51 | 2,7E-03 | kunitz type trypsin inhibitor alpha-fucosidase |
| IMGAcontig_52252_2.1 | 5,58 | -1,53 | 2,7E-03 | homeobox-leucine zipper protein hat5-like |
| IMGAMedtr2g025780.1 | 10,46 | -1,54 | 1,4E-03 | hypothetical protein MTR_2g026420 |
| IMGAMedtr5g016750.1 | 6,11 | -1,54 | 3,2E-03 | dehydration responsive element-binding protein 1 |
| IMGAMedtr8g020650.1 | 7,04 | -1,57 | 1,6E-03 | seed linoleate 9s-lipoxygenase |

| | | | | |
|-------------------------|------|-------|---------|---|
| IMGAMedtr1g011260.1 | 5,54 | -1,57 | 2,4E-03 | hypothetical chloroplast rf19 |
| IMGAcntig_64138_1.1 | 4,33 | -1,58 | 1,7E-03 | bifunctional epoxide hydrolase 2-like |
| TC173527 | 4,42 | -1,59 | 1,4E-03 | nad -binding rossmann-fold superfamily protein |
| IMGAMedtr1g088660.1 | 5,13 | -1,59 | 1,3E-03 | e3 ubiquitin-protein ligase bah1-like |
| TC180246 | 5,11 | -1,61 | 1,6E-03 | gonadotropin beta chain |
| TC173473 | 5,46 | -1,61 | 1,9E-03 | isovaleryl- dehydrogenase |
| TC192386 | 4,13 | -1,61 | 2,5E-03 | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase |
| IMGAMedtr8g095890.1 | 4,30 | -1,62 | 2,9E-03 | dpp6 n-terminal domain-like protein |
| TC188431 | 3,43 | -1,62 | 2,4E-03 | alpha-galactosidase |
| contig_12837 | 3,61 | -1,62 | 2,0E-03 | unknown |
| TC197452 | 4,29 | -1,62 | 3,1E-03 | salicylic acid-binding protein 2-like |
| IMGAMedtr3g093400.1 | 5,17 | -1,63 | 1,4E-03 | protein casp-like |
| TC180242 | 5,95 | -1,64 | 6,4E-04 | defensin-like protein |
| IMGAMedtr8g078170.1 | 4,05 | -1,64 | 2,4E-03 | coiled-coil domain-containing protein |
| TC175270 | 7,89 | -1,64 | 4,5E-04 | homeobox-leucine zipper protein hat5-like |
| TC187423 | 3,31 | -1,65 | 1,2E-03 | one helix protein ohp |
| IMGAMedtr3g108910.1 | 7,14 | -1,65 | 1,8E-03 | probable serine threonine-protein kinase kinx-like isoform x2 |
| IMGAMedtr4g132020.1 | 3,09 | -1,66 | 1,0E-03 | senescence regulator |
| TC180544 | 3,92 | -1,67 | 2,6E-03 | germin-like protein |
| TC177102 | 3,48 | -1,67 | 1,0E-03 | outer envelope pore protein chloroplastic |
| IMGAMedtr5g006360.1 | 3,80 | -1,67 | 1,2E-03 | lactoylglutathione lyase glyoxalase i family protein |
| TC175401 | 4,25 | -1,68 | 4,2E-04 | btb poz and taz domain-containing protein 4-like |
| IMGAMedtr4g131400.1 | 4,23 | -1,68 | 2,4E-03 | temperature-induced lipocalin |
| TC199441 | 4,57 | -1,69 | 1,1E-03 | hypothetical protein MTR_1g007840 |
| IMGAcntig_165242_1.1 | 2,68 | -1,69 | 2,2E-03 | sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein |
| IMGAMedtr3g101440.1 | 3,78 | -1,69 | 1,4E-03 | hypothetical chloroplast rf1 |
| TC184312 | 3,31 | -1,70 | 1,4E-03 | annexin d8 |
| IMGAMedtr4g122750.1 | 2,28 | -1,70 | 2,0E-03 | pectinesterase inhibitor |
| IMGAcntig_168205_1.1 | 3,68 | -1,70 | 1,2E-03 | bzip transcription factor bzip73a |
| IMGAMedtr7g099390.1 | 4,35 | -1,71 | 2,6E-04 | photosystem i reaction center subunit iv chloroplastic-like |
| gi388505707gbBT141126.1 | 2,62 | -1,71 | 2,8E-03 | btb poz domain-containing protein at2g24240-like |
| IMGAMedtr5g064950.1 | 2,82 | -1,71 | 1,2E-03 | transcription factor bhlh96-like |
| TC193809 | 6,53 | -1,72 | 1,1E-03 | aldehyde dehydrogenase family 7 member a1 |
| BQ156625 | 3,27 | -1,73 | 1,3E-03 | unknown |
| IMGAcntig_68314_1.1 | 2,29 | -1,73 | 2,6E-03 | galactinol synthase |
| IMGAcntig_77089_1.1 | 4,69 | -1,73 | 3,2E-03 | hypothetical protein MTR_2g022610 |
| gi335970386gbJL881590.1 | 3,99 | -1,73 | 1,9E-04 | delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase |
| IMGAMedtr5g070030.1 | 2,50 | -1,73 | 2,3E-03 | flavoprotein wrba |
| contig_57398 | 2,48 | -1,74 | 1,9E-03 | unknown |
| IMGAcntig_80044_2.1 | 3,51 | -1,74 | 9,5E-04 | dna polymerase epsilon catalytic subunit |
| IMGAMedtr2g007950.1 | 6,55 | -1,74 | 2,4E-04 | nodulin 21 -like transporter family isoform 1 |
| TC178239 | 2,74 | -1,74 | 1,8E-03 | alpha amylase family protein |
| TC176025 | 3,84 | -1,74 | 2,8E-03 | hypothetical protein MTR_5g066330 |
| IMGAMedtr4g028370.1 | 4,62 | -1,75 | 1,7E-03 | lipid transfer protein |
| gi388513106gbBT144821.1 | 2,04 | -1,75 | 3,1E-03 | glutamine amidotransferase ylr126c-like |
| TC197560 | 3,84 | -1,75 | 2,9E-03 | lysosomal beta glucosidase-like |
| TC199968 | 2,55 | -1,75 | 2,7E-03 | chlorophyll a-b binding protein chloroplastic-like |
| gi15485719embAJ401228.1 | 3,42 | -1,76 | 5,9E-04 | selenium binding protein |

| | | | | |
|-------------------------|------|-------|---------|---|
| IMGAcontig_56887_1.1 | 3,61 | -1,76 | 3,1E-04 | duf4228 domain |
| BQ157777 | 2,75 | -1,76 | 1,4E-03 | unknown |
| IMGAAC235753_1.1 | 2,78 | -1,77 | 2,4E-03 | cysteine proteinase |
| TC181762 | 3,39 | -1,77 | 6,6E-04 | glutamine amidotransferase ylr126c-like |
| TC173102 | 2,54 | -1,77 | 2,4E-03 | f-box protein at4g00755-like |
| TC179289 | 2,90 | -1,78 | 1,5E-03 | ferritin- chloroplastic-like isoform x2 |
| TC202164 | 2,86 | -1,79 | 8,4E-04 | non-ltr retroelement reverse related |
| IMGAcontig_103756_1.1 | 2,75 | -1,80 | 1,3E-03 | vacuolar iron transporter homolog 4-like |
| TC179550 | 5,39 | -1,82 | 8,2E-05 | mitochondrial uncoupling protein 1-like |
| IMGAMedtr7g109520.1 | 7,70 | -1,84 | 5,0E-05 | unknown |
| IMGAcontig_21756_1.1 | 3,39 | -1,84 | 2,1E-04 | defensin-like protein |
| IMGAMedtr7g114200.1 | 3,00 | -1,84 | 5,2E-04 | protein auxin response 4-like |
| IMGAcontig_55658_2.1 | 4,23 | -1,85 | 6,4E-05 | sucrose synthase |
| TC182312 | 5,22 | -1,86 | 6,1E-05 | duf506 family protein |
| IMGAcontig_239984_1.1 | 3,86 | -1,87 | 1,4E-03 | 21 kda |
| TC201575 | 2,78 | -1,87 | 2,8E-03 | e3 ubiquitin-protein ligase march3 |
| EY475764 | 2,72 | -1,88 | 1,2E-03 | methionyl-trna synthetase |
| IMGAMedtr8g046250.1 | 2,83 | -1,89 | 2,9E-04 | kda class iv heat shock protein |
| TC178260 | 5,56 | -1,89 | 3,1E-04 | dna polymerase epsilon catalytic subunit |
| IMGAMedtr7g021040.1 | 2,40 | -1,90 | 6,0E-04 | serine carboxypeptidase-like protein |
| IMGAcontig_91552_1.1 | 3,17 | -1,90 | 6,2E-04 | thylakoid lumenal kda chloroplastic-like |
| TC193171 | 3,23 | -1,93 | 1,5E-03 | proteinase inhibitor type-2 cevi57-like |
| IMGAMedtr3g109120.1 | 4,21 | -1,93 | 9,7E-04 | kinase c-like zinc finger protein |
| IMGAMedtr8g069450.1 | 3,77 | -1,94 | 3,4E-05 | tetratricopeptide repeat-like superfamily protein |
| IMGAcontig_51659_1.1 | 4,89 | -1,96 | 2,5E-03 | chy and ctchy and ring-type zinc finger protein |
| TC186565 | 4,40 | -1,96 | 2,5E-05 | wound-responsive family protein |
| IMGAAC235757_50.1 | 3,87 | -1,96 | 7,6E-04 | diketo-5-methylthio-1-phosphopentane phosphatase |
| IMGAcontig_162945_1.1 | 6,26 | -1,97 | 2,1E-04 | plant t31b5-30 protein |
| IMGAMedtr3g107500.1 | 4,25 | -1,97 | 4,9E-06 | eg45-like domain containing protein |
| contig_84877 | 4,05 | -1,98 | 2,1E-05 | unknown |
| IMGAcontig_66456_1.1 | 2,01 | -1,98 | 2,5E-03 | 4-coumarate: ligase-like protein |
| IMGAcontig_74549_2.1 | 5,29 | -2,01 | 1,8E-06 | unknown |
| TC196818 | 5,57 | -2,01 | 2,5E-05 | auxin-repressed protein |
| IMGAcontig_55783_1.1 | 1,78 | -2,01 | 7,1E-04 | ubiquitin ligase sinat3 |
| IMGAMedtr8g074040.1 | 2,84 | -2,02 | 2,7E-03 | probable acyl-activating enzyme 2-like |
| IMGAcontig_52282_2.1 | 6,41 | -2,05 | 1,2E-04 | udp-d-glucose udp-d-galactose 4-epimerase 1 |
| IMGAcontig_237905_1.1 | 1,45 | -2,05 | 2,2E-03 | duf1677 family protein |
| IMGAMedtr1g113960.1 | 2,50 | -2,06 | 3,3E-04 | act-like tyrosine kinase family protein |
| IMGAMedtr6g023910.1 | 3,02 | -2,08 | 1,1E-03 | short-chain alcohol dehydrogenase |
| IMGAMedtr7g072420.1 | 4,77 | -2,10 | 6,6E-06 | alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog mitochondrial-like |
| gi388501445gbBT138994.1 | 1,75 | -2,10 | 6,6E-04 | cbl-interacting protein kinase 2-like |
| TC191019 | 2,81 | -2,13 | 8,1E-05 | eg45-like domain containing protein |
| gi217072405gbBT051901.1 | 1,63 | -2,13 | 7,2E-04 | ubiquitin ligase sinat3 |
| IMGAMedtr5g098020.1 | 4,91 | -2,13 | 2,9E-06 | 14 protein |
| IMGAMedtr5g091060.1 | 5,62 | -2,14 | 3,2E-07 | 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase |
| TC182680 | 6,26 | -2,16 | 2,5E-03 | thioredoxin-like protein |
| contig_77660 | 2,37 | -2,18 | 3,0E-04 | unknown |
| TC176342 | 5,58 | -2,19 | 4,8E-04 | thiosulfate sulfurtransferase chloroplastic-like |

| | | | | |
|-------------------------|------|-------|---------|---|
| IMGAMedtr2g034720.1 | 6,21 | -2,19 | 9,0E-08 | alpha-l-arabinofuranosidase beta-d-xylosidase |
| TC174596 | 2,42 | -2,20 | 2,6E-05 | ubiquitin ligase sinat3 |
| TC185974 | 2,56 | -2,21 | 5,4E-05 | probable calcium-binding protein cml44-like |
| contig_76531 | 3,97 | -2,21 | 6,2E-07 | unknown |
| IMGAContig_53634_1.1 | 6,44 | -2,21 | 2,7E-06 | cbl-interacting protein kinase 2-like |
| TC184459 | 5,75 | -2,22 | 9,8E-04 | cytochrome p450 family 71 protein |
| IMGAMedtr4g060480.1 | 1,73 | -2,23 | 1,0E-04 | isovaleryl- dehydrogenase |
| TC179588 | 2,75 | -2,23 | 5,6E-06 | probable chlorophyll b reductase chloroplastic-like |
| TC175074 | 4,44 | -2,24 | 8,4E-08 | probable low-specificity l-threonine aldolase 1 |
| IMGAContig_168999_1.1 | 2,63 | -2,24 | 3,0E-06 | methionine gamma-lyase-like |
| IMGAMedtr5g023170.1 | 4,02 | -2,26 | 7,3E-04 | thiosulfate sulfurtransferase chloroplastic-like |
| TC181284 | 5,25 | -2,26 | 9,1E-06 | plant t7n9-9 protein |
| IMGAMedtr5g074290.1 | 3,75 | -2,26 | 1,8E-07 | duf4228 domain protein |
| IMGAMedtr7g109510.1 | 3,64 | -2,26 | 3,2E-05 | bzip transcription factor |
| TC177352 | 3,32 | -2,32 | 2,5E-07 | expansin-b3-like precursor |
| TC176253 | 5,37 | -2,32 | 1,4E-06 | auxin-repressed dormancy-associated protein |
| TC175037 | 2,01 | -2,32 | 4,8E-04 | y2k4 dehydrin variant partial |
| TC177148 | 6,56 | -2,33 | 2,5E-05 | branched-chain-amino-acid aminotransferase chloroplastic-like |
| IMGAMedtr2g021690.1 | 1,59 | -2,33 | 7,7E-04 | transmembrane protein 45b-like |
| TC184834 | 1,39 | -2,35 | 7,6E-04 | nac domain-containing protein 18-like |
| IMGAMedtr1g072690.1 | 1,60 | -2,35 | 1,7E-04 | peptidoglycan-binding domain-containing family protein |
| IMGAMedtr4g021260.1 | 1,92 | -2,35 | 5,4E-04 | avr9 cf-9 rapidly elicited protein |
| IMGAMedtr5g083170.1 | 5,39 | -2,38 | 4,7E-09 | ferritin- chloroplastic-like isoform x2 |
| IMGAMedtr5g082130.1 | 2,44 | -2,42 | 4,0E-04 | hypothetical protein MTR_5g082130 |
| IMGAContig_53621_1.1 | 1,41 | -2,43 | 2,2E-04 | mitochondrial uncoupling protein 1-like |
| IMGAMedtr8g022300.1 | 6,01 | -2,45 | 2,0E-05 | dormancy auxin associated protein |
| contig_107810 | 3,58 | -2,46 | 9,0E-05 | unknown |
| IMGAMedtr4g114080.1 | 2,54 | -2,49 | 1,4E-07 | lactoylglutathione lyase glyoxalase i family protein |
| TC176670 | 3,73 | -2,50 | 1,2E-07 | methionine gamma-lyase-like |
| IMGAContig_107810_1.1 | 2,05 | -2,53 | 1,1E-03 | flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase-like |
| TC177579 | 3,47 | -2,54 | 1,9E-07 | peroxidase 21 |
| IMGAMedtr4g087850.1 | 2,33 | -2,54 | 9,7E-04 | hypothetical protein MTR_4g087850 |
| IMGAMedtr1g080250.1 | 4,10 | -2,57 | 3,2E-10 | probable low-specificity l-threonine aldolase 1 |
| TC180413 | 3,69 | -2,59 | 4,3E-06 | fructose- - cytosolic-like |
| IMGAMedtr8g085650.1 | 3,41 | -2,64 | 3,1E-08 | f-box kelch-repeat protein at2g44130-like |
| BQ153338 | 1,15 | -2,65 | 1,3E-04 | unknown |
| IMGAMedtr8g101650.1 | 5,98 | -2,69 | 3,7E-07 | myb-like transcription factor family protein |
| TC176982 | 4,70 | -2,70 | 2,1E-07 | glutathione s- amino-terminal domain protein |
| IMGAContig_57806_1.1 | 2,00 | -2,76 | 7,2E-07 | methionine gamma-lyase-like |
| IMGAMedtr4g014540.1 | 3,27 | -2,80 | 3,3E-04 | ferritin 3 |
| IMGAMedtr5g040430.1 | 5,91 | -2,86 | 1,7E-12 | glutathione s-transferase u10-like |
| IMGAMedtr2g026760.1 | 4,18 | -2,94 | 7,5E-07 | 14 kda proline-rich |
| IMGAContig_63207_1.1 | 1,56 | -2,99 | 1,7E-05 | branched-chain amino acid aminotransferase |
| gi388512598gbBT144567.1 | 4,82 | -3,05 | 1,0E-04 | carbonic anhydrase |
| IMGAMedtr4g090530.1 | 2,37 | -3,06 | 9,8E-06 | metal transporter nramp2-like |
| TC187865 | 2,85 | -3,16 | 2,2E-10 | hypothetical protein MTR_4g082883 |
| IMGAMedtr5g081530.1 | 2,74 | -3,18 | 1,4E-05 | kda class i heat shock protein |
| TC176640 | 5,08 | -3,35 | 1,5E-10 | dormancy auxin associated protein |

| | | | | |
|-------------------------|------|--------|---------|---|
| gi388520526gbBT148531.1 | 1,35 | -3,36 | 5,9E-07 | hxxxd-type acyl-transferase family protein |
| IMGAMedtr5g090070.1 | 3,15 | -3,37 | 1,3E-10 | alanine:glyoxylate aminotransferase isoform 1 |
| IMGAcontig_70372_1.1 | 2,09 | -3,45 | 4,8E-05 | defensin-like protein |
| BQ144993 | 3,06 | -3,47 | 1,4E-04 | unknown |
| IMGAAAC235674_15.1 | 2,35 | -3,54 | 1,5E-05 | low-temperature-induced 65 kda |
| IMGAMedtr2g096120.1 | 1,71 | -3,55 | 1,1E-06 | uncharacterized loc101218723 |
| IMGAcontig_128958_1.1 | 2,08 | -3,58 | 6,5E-05 | late embryogenesis abundant protein 2-like |
| IMGAMedtr4g091090.1 | 1,57 | -3,61 | 2,8E-04 | cysteine-rich tm module stress tolerance protein |
| IMGAMedtr4g081870.1 | 3,25 | -3,65 | 7,8E-13 | nac domain protein |
| contig_53882 | 1,22 | -3,87 | 3,2E-04 | unknown |
| IMGAcontig_63793_1.1 | 1,05 | -3,93 | 2,5E-03 | bzip family protein |
| TC191486 | 3,18 | -4,14 | 3,6E-15 | f-box protein skp2a |
| IMGAMedtr8g061360.1 | 4,25 | -4,27 | 1,3E-08 | tyrosine aminotransferase |
| IMGAcontig_73988_1.1 | 1,76 | -4,46 | 7,7E-11 | zinc c3hc4 type (ring finger) protein |
| IMGAcontig_167649_1.1 | 4,00 | -4,92 | 4,4E-23 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha mitochondrial-like |
| contig_73988 | 3,64 | -5,24 | 1,1E-15 | unknown |
| IMGAMedtr3g047140.1 | 1,31 | -5,58 | 2,6E-04 | legume lectin beta domain protein |
| IMGAMedtr2g026420.1 | 3,64 | -5,99 | 1,2E-16 | unknown |
| gi335983888gbJL895092.1 | 1,14 | -19,94 | 2,5E-03 | actin |
| ABPE01000172 | 2,82 | 14,75 | 8,3E-38 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01000696 | 2,41 | 289,85 | 1,4E-51 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01002352 | 3,34 | 383,72 | 6,7E-70 | Verticillium sp. VaMs.102 |
| ABPE01002781 | 2,39 | 17,86 | 1,1E-34 | Verticillium sp. VaMs.102 |

logCPM (log du nombre de comptage par million) ; Fold (coefficient de variation de l'expression du gène) ; p-value (mesure statistique de la différence d'expression entre la condition inoculée et la condition contrôle).

Un code couleur permet de visualiser facilement l'échelle des intensités d'expression. Ainsi, une couleur rouge est attribuée aux gènes induits et une couleur verte est attribuée aux gènes qui sont réprimés.

Les gènes qui sont en grisé sont ceux dont nous n'avons pas pu extraire les séquences nucléotidiques en raison d'un manque de précision sur leurs identifiants.

Tableau S. 3 : Distribution des gènes dans les 5 modules identifiés chez la lignée A17

| Gène | Module | Fold | CV | DiffInoc | sélectionné |
|----------|--------|-------|------|----------|-------------|
| TC202835 | black | -1,70 | 0,51 | false | false |
| TC202438 | black | 1,53 | 0,48 | false | false |
| TC202372 | black | 1,60 | 0,44 | false | false |
| TC202091 | black | 1,14 | 0,40 | false | false |
| TC201918 | black | -1,57 | 0,46 | false | false |
| TC201838 | black | 1,82 | 0,46 | false | false |
| TC201581 | black | 1,08 | 0,42 | false | false |
| TC201575 | black | -1,81 | 0,60 | false | false |
| TC200795 | black | -4,29 | 1,46 | false | false |
| TC199888 | black | -1,81 | 0,42 | false | false |
| TC199850 | black | 1,64 | 0,44 | false | false |
| TC199487 | black | 1,79 | 0,40 | false | false |
| TC198817 | black | -1,88 | 0,44 | false | false |
| TC198473 | black | 1,39 | 0,41 | false | false |
| TC198295 | black | 1,14 | 0,45 | false | false |
| TC197970 | black | -1,43 | 0,45 | false | false |
| TC197513 | black | -1,83 | 0,49 | false | false |
| TC197079 | black | 1,96 | 0,43 | false | false |
| TC195437 | black | 1,63 | 0,42 | false | false |
| TC195377 | black | -2,06 | 0,47 | false | false |
| TC195360 | black | -1,55 | 0,62 | false | false |
| TC195039 | black | -2,12 | 0,58 | false | false |
| TC194651 | black | -1,65 | 0,42 | false | false |
| TC194431 | black | 1,38 | 0,42 | false | false |
| TC193616 | black | -1,91 | 0,51 | false | false |
| TC192954 | black | -1,34 | 0,58 | false | false |
| TC192953 | black | -1,31 | 0,41 | false | false |
| TC192942 | black | -1,65 | 0,43 | false | false |
| TC192349 | black | 2,41 | 0,52 | false | false |
| TC191326 | black | -1,31 | 0,42 | false | false |
| TC190792 | black | -1,23 | 0,50 | false | false |
| TC190490 | black | -1,16 | 0,50 | false | false |
| TC190113 | black | -1,79 | 0,44 | false | false |
| TC189520 | black | -1,47 | 0,45 | false | false |
| TC189208 | black | -1,77 | 0,49 | false | false |
| TC189103 | black | -1,43 | 0,41 | false | false |
| TC189019 | black | 2,17 | 0,57 | false | false |
| TC187181 | black | -1,31 | 0,44 | false | false |
| TC187062 | black | -1,47 | 0,43 | false | false |
| TC186269 | black | -1,36 | 0,41 | false | false |
| TC186115 | black | -1,34 | 0,54 | false | false |
| TC185906 | black | -1,10 | 0,50 | false | false |
| TC184996 | black | -1,56 | 0,49 | false | false |
| TC183911 | black | -1,53 | 0,57 | false | false |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------|-------|------|-------|-------|
| TC183032 | black | -1,29 | 0,41 | false | false |
| TC182743 | black | -1,80 | 0,61 | false | false |
| TC182731 | black | -1,37 | 0,56 | false | false |
| TC182509 | black | -1,26 | 0,42 | false | false |
| TC182323 | black | -1,23 | 0,42 | false | false |
| TC181226 | black | -1,66 | 0,41 | false | false |
| TC180667 | black | -1,36 | 0,42 | false | false |
| TC180559 | black | -1,33 | 0,56 | false | false |
| TC179849 | black | 1,05 | 0,49 | false | false |
| TC179517 | black | -1,50 | 0,51 | false | false |
| TC178473 | black | 2,83 | 0,75 | false | false |
| TC178325 | black | -1,85 | 0,50 | false | false |
| TC178203 | black | -1,65 | 0,61 | false | false |
| TC178110 | black | -1,76 | 0,47 | false | false |
| TC177673 | black | -2,68 | 0,84 | false | false |
| TC177233 | black | -1,56 | 0,46 | false | false |
| TC177144 | black | -1,71 | 0,42 | false | false |
| TC176855 | black | 1,61 | 0,55 | false | false |
| TC176693 | black | -1,52 | 0,44 | false | false |
| TC176670 | black | 1,28 | 0,45 | false | false |
| TC176537 | black | -1,63 | 0,43 | false | false |
| TC175311 | black | 2,02 | 0,44 | false | false |
| TC175208 | black | -1,95 | 0,67 | false | false |
| TC174619 | black | -1,67 | 0,57 | false | false |
| TC174180 | black | -1,36 | 0,44 | false | false |
| TC174166 | black | -1,17 | 0,42 | false | false |
| TC172631 | black | -1,70 | 0,48 | false | false |
| IMGA Medtr8g092590.1 | black | 2,20 | 0,60 | false | false |
| IMGA Medtr8g077610.1 | black | -1,72 | 0,64 | false | false |
| IMGA Medtr8g022300.1 | black | -2,60 | 0,82 | true | false |
| IMGA Medtr7g076540.1 | black | -1,27 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr6g078920.1 | black | -1,20 | 0,58 | false | false |
| IMGA Medtr6g077940.1 | black | -1,61 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr6g043020.1 | black | 1,28 | 0,54 | false | false |
| IMGA Medtr6g029250.1 | black | -2,07 | 0,48 | false | false |
| IMGA Medtr5g090760.1 | black | 1,89 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr5g089170.1 | black | -2,39 | 0,48 | false | false |
| IMGA Medtr5g088350.4 | black | -1,30 | 0,54 | false | false |
| IMGA Medtr5g086130.1 | black | -1,86 | 0,51 | false | false |
| IMGA Medtr5g084060.1 | black | -2,36 | 1,17 | false | false |
| IMGA Medtr5g068840.1 | black | -1,03 | 0,46 | false | false |
| IMGA Medtr5g051120.1 | black | 2,93 | 0,55 | false | false |
| IMGA Medtr5g051040.1 | black | 2,03 | 0,52 | false | false |
| IMGA Medtr5g037930.1 | black | -1,18 | 0,53 | false | false |
| IMGA Medtr5g037890.1 | black | 2,18 | 0,74 | false | false |
| IMGA Medtr5g032420.1 | black | 1,23 | 0,43 | false | false |
| IMGA Medtr5g021650.1 | black | -1,30 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr5g012010.1 | black | -1,56 | 0,43 | false | false |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------|-------|------|-------|-------|
| IMGA Medtr4g133750.1 | black | -1,57 | 0,67 | false | false |
| IMGA Medtr4g129360.1 | black | 1,23 | 0,43 | false | false |
| IMGA Medtr4g119790.1 | black | 2,41 | 0,75 | false | false |
| IMGA Medtr4g108000.1 | black | -1,74 | 0,44 | false | false |
| IMGA Medtr4g086340.1 | black | 1,04 | 0,51 | false | false |
| IMGA Medtr4g063570.1 | black | -1,80 | 0,52 | false | false |
| IMGA Medtr4g051370.1 | black | 1,99 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr4g051210.1 | black | 1,93 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr4g051140.1 | black | 2,54 | 0,55 | false | false |
| IMGA Medtr4g026390.1 | black | 1,13 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr4g013690.2 | black | -1,81 | 0,61 | false | false |
| IMGA Medtr4g006090.1 | black | 2,53 | 0,50 | false | false |
| IMGA Medtr3g111210.1 | black | -1,46 | 0,44 | false | false |
| IMGA Medtr3g100230.1 | black | -1,36 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr3g072530.1 | black | -1,75 | 0,48 | false | false |
| IMGA Medtr3g055250.1 | black | -1,35 | 0,50 | false | false |
| IMGA Medtr3g035710.1 | black | 1,97 | 0,46 | false | false |
| IMGA Medtr3g032740.1 | black | 1,48 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr3g015830.1 | black | -1,96 | 0,62 | false | false |
| IMGA Medtr2g103650.1 | black | -1,97 | 0,50 | false | false |
| IMGA Medtr2g102680.1 | black | -1,08 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr2g096120.1 | black | -2,65 | 0,42 | true | false |
| IMGA Medtr2g044940.1 | black | -1,47 | 0,48 | false | false |
| IMGA Medtr2g037990.1 | black | -1,44 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr2g034810.1 | black | -1,67 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr2g014820.1 | black | -1,76 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr2g010740.1 | black | -1,60 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr1g115900.1 | black | -1,80 | 0,45 | false | false |
| IMGA Medtr1g104840.1 | black | -1,54 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr1g099800.1 | black | -1,74 | 0,66 | false | false |
| IMGA Medtr1g099640.1 | black | -1,23 | 0,40 | false | false |
| IMGA Medtr1g093640.1 | black | -1,44 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr1g090110.1 | black | -1,22 | 0,45 | false | false |
| IMGA Medtr1g085090.1 | black | -1,64 | 0,55 | false | false |
| IMGA Medtr1g083540.1 | black | -1,13 | 0,46 | false | false |
| IMGA Medtr1g017990.1 | black | -1,94 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr1g015300.1 | black | -1,61 | 0,56 | false | false |
| IMGA Medtr1g006270.1 | black | 1,44 | 0,43 | false | false |
| IMGA Medtr1g006220.1 | black | 2,50 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr1g005580.1 | black | -1,02 | 0,73 | false | false |
| IMGA Medtr1g005090.1 | black | 2,17 | 0,47 | false | false |
| IMGA contig_91842_1.1 | black | -1,56 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_83847_1.1 | black | -1,29 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_75490_1.1 | black | -1,73 | 0,47 | false | false |
| IMGA contig_74933_1.1 | black | -1,97 | 0,74 | false | false |
| IMGA contig_74895_1.1 | black | -1,73 | 0,46 | false | false |
| IMGA contig_74219_1.1 | black | 1,19 | 0,40 | false | false |
| IMGA contig_72458_1.1 | black | 1,05 | 0,46 | false | false |

| | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|------|-------|-------|
| IMGA contig_64808_1.1 | black | -1,31 | 0,50 | false | false |
| IMGA contig_57777_1.1 | black | 1,96 | 0,40 | false | false |
| IMGA contig_57546_2.1 | black | -1,59 | 0,47 | false | false |
| IMGA contig_56839_1.1 | black | 1,75 | 0,65 | false | false |
| IMGA contig_56693_1.1 | black | -2,05 | 0,43 | false | false |
| IMGA contig_56320_2.1 | black | 1,36 | 0,59 | false | false |
| IMGA contig_55964_1.1 | black | -1,43 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_55421_1.1 | black | -1,90 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_54697_2.1 | black | -1,64 | 0,51 | false | false |
| IMGA contig_54180_1.1 | black | 2,45 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_53628_1.1 | black | -1,56 | 0,43 | false | false |
| IMGA contig_48319_2.1 | black | 2,08 | 0,59 | false | false |
| IMGA contig_247690_1.1 | black | 1,52 | 0,43 | false | false |
| IMGA contig_192917_1.1 | black | 1,20 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_168999_1.1 | black | 1,35 | 0,51 | false | false |
| IMGA contig_15611_1.1 | black | -1,42 | 0,52 | false | false |
| IMGA contig_13703_1.1 | black | 2,21 | 0,49 | false | false |
| IMGA contig_13255_1.1 | black | -1,22 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_109417_1.1 | black | -1,24 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_106719_1.1 | black | -1,51 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_106616_1.1 | black | -1,96 | 0,94 | false | false |
| IMGA contig_102134_2.1 | black | -2,04 | 0,61 | false | false |
| IMGA contig_101472_1.1 | black | -1,71 | 0,55 | false | false |
| IMGA AC202489_32.1 | black | -1,70 | 0,42 | false | false |
| gi 388521074 gb BT148805.1 | black | -2,59 | 1,07 | false | false |
| gi 388520522 gb BT148529.1 | black | 1,39 | 0,44 | false | false |
| gi 388520396 gb BT148466.1 | black | -1,90 | 0,42 | false | false |
| gi 388519220 gb BT147878.1 | black | -2,44 | 0,81 | false | false |
| gi 388518364 gb BT147450.1 | black | -1,11 | 0,44 | false | false |
| gi 388518354 gb BT147445.1 | black | 1,77 | 0,58 | false | false |
| gi 388517500 gb BT147018.1 | black | -1,69 | 0,64 | false | false |
| gi 388512148 gb BT144342.1 | black | 1,96 | 0,47 | false | false |
| gi 388510805 gb BT143675.1 | black | 1,90 | 0,47 | false | false |
| gi 388509793 gb BT143169.1 | black | -2,92 | 1,03 | false | false |
| gi 388508649 gb BT142597.1 | black | -4,03 | 1,61 | false | false |
| gi 388507681 gb BT142113.1 | black | 1,37 | 0,44 | false | false |
| gi 388494245 gb BT135394.1 | black | -1,57 | 0,42 | false | false |
| gi 388493909 gb BT135226.1 | black | -1,64 | 0,72 | false | false |
| gi 335972166 gb JL883370.1 | black | -1,31 | 0,40 | false | false |
| gi 335971928 gb JL883132.1 | black | 2,50 | 0,43 | false | false |
| gi 335964173 gb JL875377.1 | black | -1,81 | 0,43 | false | false |
| gi 335956009 gb JL867213.1 | black | 1,51 | 0,57 | false | false |
| gi 335955258 gb JL866462.1 | black | -1,75 | 0,48 | false | false |
| gi 2443835 gb AF020793.1 | black | 1,26 | 0,42 | false | false |
| gi 217075479 gb BT053440.1 | black | -1,83 | 0,58 | false | false |
| gi 217074455 gb BT052926.1 | black | -1,16 | 0,48 | false | false |
| gi 217072465 gb BT051931.1 | black | 1,68 | 0,41 | false | false |
| gi 217072353 gb BT051875.1 | black | -1,49 | 0,50 | false | false |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-------|--------|------|-------|-------|
| gi 217071369 gb BT051381.1 | black | -2,66 | 0,94 | false | false |
| gi 217071253 gb BT051323.1 | black | 1,75 | 0,55 | false | false |
| gi 217071181 gb BT051287.1 | black | -16,07 | 1,50 | true | false |
| gi 217070793 gb BT051091.1 | black | 1,46 | 0,43 | false | false |
| gi 217070121 gb BT050752.1 | black | 1,35 | 0,43 | false | false |
| GE343656 | black | -1,45 | 0,46 | false | false |
| EV254941 | black | -1,40 | 0,47 | false | false |
| contig_99219 | black | -1,36 | 0,42 | false | false |
| contig_9821 | black | -1,63 | 0,44 | false | false |
| contig_94568 | black | 1,02 | 0,60 | false | false |
| contig_91978 | black | 2,63 | 0,67 | false | false |
| contig_89426 | black | -1,65 | 0,43 | false | false |
| contig_84104 | black | -1,14 | 0,40 | false | false |
| contig_76966 | black | 2,23 | 0,53 | false | false |
| contig_76910 | black | -1,48 | 0,40 | false | false |
| contig_76462 | black | -1,30 | 0,48 | false | false |
| contig_76151 | black | -1,93 | 0,50 | false | false |
| contig_74007 | black | -1,40 | 0,85 | false | false |
| contig_67158 | black | -1,32 | 0,48 | false | false |
| contig_66406 | black | -1,16 | 0,49 | false | false |
| contig_66379 | black | -1,07 | 0,49 | false | false |
| contig_64179 | black | -1,24 | 0,40 | false | false |
| contig_64171 | black | -1,77 | 0,45 | false | false |
| contig_62418 | black | -1,09 | 0,50 | false | false |
| contig_60537 | black | -1,70 | 0,62 | false | false |
| contig_59723 | black | -1,55 | 0,47 | false | false |
| contig_57438 | black | -1,79 | 0,48 | false | false |
| contig_56634 | black | -1,49 | 0,47 | false | false |
| contig_52911 | black | -1,21 | 0,42 | false | false |
| contig_51593 | black | -1,29 | 0,49 | false | false |
| contig_248985 | black | -1,60 | 0,41 | false | false |
| contig_239639 | black | -1,56 | 0,49 | false | false |
| contig_173357 | black | -1,18 | 0,45 | false | false |
| contig_14321 | black | -1,39 | 0,51 | false | false |
| contig_13255 | black | -1,35 | 0,41 | false | false |
| contig_126721 | black | -1,45 | 0,41 | false | false |
| contig_113959 | black | -2,47 | 0,81 | false | false |
| contig_112481 | black | -1,57 | 0,69 | false | false |
| BQ150746 | black | 1,43 | 0,51 | false | false |
| BQ150589 | black | 1,31 | 0,42 | false | false |
| BQ150509 | black | 1,31 | 0,42 | false | false |
| BQ150071 | black | 1,64 | 0,41 | false | false |
| BI310293 | black | 2,57 | 0,50 | false | false |
| BG589042 | black | -1,54 | 0,47 | false | false |
| BG588295 | black | -1,76 | 0,55 | false | false |
| BG455290 | black | 2,06 | 0,55 | false | false |
| BG453428 | black | 1,56 | 0,65 | false | false |
| BE315767 | black | 1,28 | 0,48 | false | false |

| | | | | | |
|----------------------|----------|-------|------|-------|-------|
| AW684444 | black | -1,78 | 0,49 | false | false |
| AW288016 | black | 1,80 | 0,56 | false | false |
| AW256363 | black | 3,84 | 0,78 | false | false |
| AL376548 | black | -1,49 | 0,55 | false | false |
| AL374641 | black | -1,94 | 0,67 | false | false |
| AJ847697 | black | -1,53 | 0,60 | false | false |
| AJ498634 | black | 1,69 | 0,42 | false | false |
| TC202831 | darkgrey | -1,41 | 0,67 | false | false |
| TC202416 | darkgrey | -1,61 | 0,65 | false | false |
| TC195307 | darkgrey | -1,65 | 0,61 | false | false |
| TC195219 | darkgrey | -1,20 | 0,52 | false | false |
| TC194851 | darkgrey | -1,09 | 0,49 | false | false |
| TC194341 | darkgrey | -1,46 | 0,47 | false | false |
| TC194028 | darkgrey | -1,24 | 0,41 | false | false |
| TC193486 | darkgrey | -1,69 | 0,45 | false | false |
| TC192695 | darkgrey | 1,34 | 0,45 | false | false |
| TC192235 | darkgrey | -1,21 | 0,49 | false | false |
| TC192152 | darkgrey | -1,13 | 0,49 | false | false |
| TC191548 | darkgrey | -1,36 | 0,42 | false | false |
| TC191278 | darkgrey | -1,67 | 0,93 | false | false |
| TC190240 | darkgrey | -1,33 | 0,42 | false | false |
| TC189133 | darkgrey | -1,16 | 0,52 | false | false |
| TC183680 | darkgrey | -1,46 | 0,72 | false | false |
| TC183277 | darkgrey | -1,59 | 0,51 | false | false |
| TC183106 | darkgrey | -1,34 | 0,47 | false | false |
| TC182694 | darkgrey | -1,11 | 0,40 | false | false |
| TC181727 | darkgrey | -1,14 | 0,56 | false | false |
| TC179634 | darkgrey | -1,28 | 0,47 | false | false |
| TC178513 | darkgrey | -1,20 | 0,49 | false | false |
| TC178372 | darkgrey | -1,60 | 0,49 | false | false |
| TC178185 | darkgrey | -1,81 | 0,72 | false | false |
| TC177640 | darkgrey | -1,12 | 0,70 | false | false |
| TC176913 | darkgrey | -1,77 | 0,53 | false | false |
| IMGA Medtr8g104290.1 | darkgrey | -1,15 | 0,53 | false | false |
| IMGA Medtr8g014930.1 | darkgrey | -1,71 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr8g008500.1 | darkgrey | -1,41 | 0,55 | false | false |
| IMGA Medtr7g098760.1 | darkgrey | -1,10 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr7g038510.1 | darkgrey | -1,65 | 0,75 | false | false |
| IMGA Medtr7g012070.1 | darkgrey | -2,61 | 0,80 | false | false |
| IMGA Medtr7g009820.1 | darkgrey | -1,14 | 0,50 | false | false |
| IMGA Medtr5g091900.1 | darkgrey | -1,36 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr5g077710.1 | darkgrey | -1,25 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr5g075680.1 | darkgrey | -1,47 | 0,48 | false | false |
| IMGA Medtr5g055020.1 | darkgrey | -1,40 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr5g036080.1 | darkgrey | -1,48 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr5g011210.1 | darkgrey | -1,71 | 0,44 | false | false |
| IMGA Medtr5g005540.1 | darkgrey | -1,57 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr4g119220.1 | darkgrey | -1,14 | 0,43 | false | false |

| | | | | | |
|----------------------------|-------------|-------|------|-------|-------|
| IMGA Medtr4g093910.1 | darkgrey | -1,59 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr4g087870.1 | darkgrey | -2,05 | 0,65 | false | false |
| IMGA Medtr3g108320.1 | darkgrey | -1,50 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr3g087870.1 | darkgrey | -1,28 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr2g069300.1 | darkgrey | -1,54 | 0,67 | false | false |
| IMGA Medtr2g035120.1 | darkgrey | -1,56 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr2g031390.1 | darkgrey | -1,24 | 0,41 | false | false |
| IMGA Medtr2g030460.1 | darkgrey | -1,83 | 0,71 | false | false |
| IMGA Medtr1g092880.1 | darkgrey | -1,71 | 0,58 | false | false |
| IMGA Medtr1g016620.1 | darkgrey | -1,38 | 0,50 | false | false |
| IMGA contig_86816_1.1 | darkgrey | -1,45 | 0,69 | false | false |
| IMGA contig_85216_1.1 | darkgrey | -1,74 | 0,54 | false | false |
| IMGA contig_81161_1.1 | darkgrey | -1,06 | 0,63 | false | false |
| IMGA contig_73073_1.1 | darkgrey | -1,22 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_61431_1.1 | darkgrey | -1,59 | 0,71 | false | false |
| IMGA contig_60146_2.1 | darkgrey | -2,11 | 0,54 | false | false |
| IMGA contig_59969_2.1 | darkgrey | -1,94 | 0,58 | false | false |
| IMGA contig_58644_2.1 | darkgrey | -1,72 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_56611_1.1 | darkgrey | -1,72 | 0,46 | false | false |
| IMGA contig_53914_1.1 | darkgrey | -1,48 | 0,54 | false | false |
| IMGA contig_52657_2.1 | darkgrey | -1,99 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_50832_1.1 | darkgrey | -2,05 | 0,46 | false | false |
| IMGA contig_49540_1.1 | darkgrey | -1,55 | 0,45 | false | false |
| IMGA contig_14407_1.1 | darkgrey | -2,70 | 0,56 | false | false |
| IMGA AC235488_1.1 | darkgrey | -2,00 | 0,52 | false | false |
| IMGA AC233572_19.1 | darkgrey | -1,68 | 0,61 | false | false |
| IMGA AC229695_20.1 | darkgrey | -1,08 | 0,52 | false | false |
| gi 388494099 gb BT135321.1 | darkgrey | -1,12 | 0,47 | false | false |
| gi 388493193 gb BT134868.1 | darkgrey | -1,54 | 0,61 | false | false |
| contig_74541 | darkgrey | -1,37 | 0,49 | false | false |
| contig_49821 | darkgrey | 1,23 | 0,45 | false | false |
| contig_49738 | darkgrey | -1,50 | 0,60 | false | false |
| contig_246105 | darkgrey | -1,94 | 0,63 | false | false |
| contig_241842 | darkgrey | -1,30 | 0,41 | false | false |
| contig_165338 | darkgrey | -1,62 | 0,48 | false | false |
| contig_132295 | darkgrey | -1,65 | 0,46 | false | false |
| contig_121580 | darkgrey | -1,28 | 0,44 | false | false |
| contig_107822 | darkgrey | -1,24 | 0,47 | false | false |
| BG644604 | darkgrey | -1,62 | 0,46 | false | false |
| BE941309 | darkgrey | -1,72 | 0,49 | false | false |
| BE203715 | darkgrey | -1,38 | 0,50 | false | false |
| TC202978 | greenyellow | 2,44 | 0,90 | false | true |
| TC202068 | greenyellow | 2,54 | 1,21 | false | true |
| TC201476 | greenyellow | 1,96 | 0,46 | false | true |
| TC201110 | greenyellow | 1,07 | 0,47 | false | true |
| TC200494 | greenyellow | 1,55 | 0,81 | false | true |
| TC200298 | greenyellow | 1,77 | 1,02 | false | true |
| TC199980 | greenyellow | 1,56 | 0,44 | false | true |

| | | | | | |
|-----------------|-------------|-------|------|-------|------|
| TC199944 | greenyellow | 1,48 | 0,42 | false | true |
| TC198603 | greenyellow | 1,22 | 0,63 | false | true |
| TC197370 | greenyellow | 6,20 | 1,90 | false | true |
| TC196975 | greenyellow | -1,61 | 0,59 | false | true |
| TC196800 | greenyellow | 2,40 | 0,89 | true | true |
| TC195291 | greenyellow | 3,94 | 1,24 | false | true |
| TC195241 | greenyellow | 1,69 | 0,49 | false | true |
| TC195149 | greenyellow | 1,17 | 0,55 | false | true |
| TC194710 | greenyellow | 3,06 | 1,03 | true | true |
| TC194512 | greenyellow | 1,71 | 0,47 | false | true |
| TC194155 | greenyellow | 3,19 | 1,10 | true | true |
| TC193801 | greenyellow | 1,46 | 0,66 | false | true |
| TC193131 | greenyellow | 2,05 | 0,99 | false | true |
| TC192952 | greenyellow | 1,74 | 0,79 | false | true |
| TC192790 | greenyellow | 1,61 | 0,43 | false | true |
| TC192773 | greenyellow | 1,19 | 0,51 | false | true |
| TC192562 | greenyellow | 1,76 | 0,61 | false | true |
| TC192240 | greenyellow | 1,23 | 0,48 | false | true |
| TC192137 | greenyellow | 1,47 | 0,48 | false | true |
| TC191592 | greenyellow | 1,13 | 0,61 | false | true |
| TC191561 | greenyellow | 1,33 | 0,53 | false | true |
| TC191281 | greenyellow | 1,92 | 0,66 | false | true |
| TC191162 | greenyellow | 1,42 | 0,83 | false | true |
| TC190715 | greenyellow | 1,04 | 0,52 | false | true |
| TC190385 | greenyellow | 2,04 | 0,56 | false | true |
| TC190082 | greenyellow | 1,61 | 0,55 | false | true |
| TC189980 | greenyellow | 2,01 | 0,54 | false | true |
| TC189643 | greenyellow | 2,11 | 0,60 | false | true |
| TC189517 | greenyellow | 2,49 | 0,87 | false | true |
| TC188889 | greenyellow | 2,41 | 1,16 | false | true |
| TC188805 | greenyellow | 1,04 | 0,40 | false | true |
| TC187606 | greenyellow | 1,46 | 0,55 | false | true |
| TC187584 | greenyellow | 2,66 | 0,88 | false | true |
| TC187179 | greenyellow | 4,21 | 1,18 | true | true |
| TC186741 | greenyellow | 1,97 | 0,75 | false | true |
| TC186418 | greenyellow | -1,84 | 0,48 | false | true |
| TC185673 | greenyellow | -1,42 | 0,42 | false | true |
| TC184959 | greenyellow | 1,38 | 0,60 | false | true |
| TC184542 | greenyellow | 1,62 | 0,55 | false | true |
| TC184022 | greenyellow | 1,43 | 0,55 | false | true |
| TC183727 | greenyellow | 1,36 | 0,42 | false | true |
| TC183627 | greenyellow | 2,70 | 1,26 | false | true |
| TC183565 | greenyellow | 1,44 | 0,72 | false | true |
| TC183159 | greenyellow | -1,02 | 0,75 | false | true |
| TC183087 | greenyellow | 3,84 | 1,41 | true | true |
| TC182263 | greenyellow | 1,64 | 0,53 | false | true |
| TC181277 | greenyellow | 2,01 | 0,71 | false | true |
| TC180968 | greenyellow | 1,66 | 0,70 | false | true |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------|------|-------|------|
| TC180887 | greenyellow | 1,61 | 0,43 | false | true |
| TC180802 | greenyellow | 1,80 | 0,74 | false | true |
| TC180685 | greenyellow | -1,85 | 0,48 | false | true |
| TC180611 | greenyellow | 3,08 | 1,36 | false | true |
| TC180421 | greenyellow | 1,29 | 0,44 | false | true |
| TC180413 | greenyellow | -1,58 | 0,49 | false | true |
| TC180172 | greenyellow | -1,33 | 0,58 | false | true |
| TC179953 | greenyellow | 1,72 | 0,59 | false | true |
| TC179701 | greenyellow | 1,44 | 0,41 | false | true |
| TC179539 | greenyellow | 1,74 | 0,80 | false | true |
| TC179158 | greenyellow | 1,46 | 0,77 | false | true |
| TC178634 | greenyellow | 1,38 | 0,42 | false | true |
| TC178458 | greenyellow | 1,31 | 0,40 | false | true |
| TC178418 | greenyellow | 2,57 | 1,07 | false | true |
| TC178310 | greenyellow | -1,62 | 0,45 | false | true |
| TC178109 | greenyellow | 2,62 | 0,75 | false | true |
| TC176914 | greenyellow | 1,69 | 0,42 | false | true |
| TC176699 | greenyellow | 1,96 | 0,94 | false | true |
| TC176541 | greenyellow | 3,90 | 1,35 | true | true |
| TC176130 | greenyellow | 1,63 | 0,73 | false | true |
| TC175745 | greenyellow | 2,05 | 0,55 | false | true |
| TC175627 | greenyellow | -1,85 | 0,52 | false | true |
| TC175561 | greenyellow | 1,21 | 0,49 | false | true |
| TC175523 | greenyellow | 1,70 | 1,14 | false | true |
| TC175331 | greenyellow | 2,46 | 1,31 | false | true |
| TC175054 | greenyellow | 1,40 | 0,41 | false | true |
| TC175005 | greenyellow | 1,50 | 0,58 | false | true |
| TC174658 | greenyellow | 2,59 | 1,02 | false | true |
| TC174615 | greenyellow | 1,08 | 0,59 | false | true |
| TC174444 | greenyellow | 1,75 | 0,50 | false | true |
| TC174347 | greenyellow | 3,41 | 1,28 | true | true |
| TC174271 | greenyellow | -1,01 | 0,41 | false | true |
| TC174209 | greenyellow | 2,36 | 1,11 | false | true |
| TC174033 | greenyellow | 1,35 | 0,51 | false | true |
| TC173670 | greenyellow | 1,35 | 0,45 | false | true |
| TC173595 | greenyellow | -1,50 | 0,42 | false | true |
| TC173578 | greenyellow | 1,43 | 0,61 | false | true |
| TC173473 | greenyellow | -1,51 | 0,40 | false | true |
| TC173292 | greenyellow | 1,70 | 0,43 | false | true |
| TC172754 | greenyellow | 1,40 | 0,42 | false | true |
| IMGA Medtr8g102380.1 | greenyellow | 1,53 | 0,48 | false | true |
| IMGA Medtr8g089110.1 | greenyellow | 1,87 | 0,67 | false | true |
| IMGA Medtr8g087710.1 | greenyellow | 1,88 | 0,50 | false | true |
| IMGA Medtr8g087420.1 | greenyellow | 1,75 | 0,48 | false | true |
| IMGA Medtr8g087380.1 | greenyellow | 1,43 | 0,43 | false | true |
| IMGA Medtr8g078170.1 | greenyellow | -2,32 | 0,46 | true | true |
| IMGA Medtr8g074040.1 | greenyellow | -1,85 | 0,47 | false | true |
| IMGA Medtr8g046210.1 | greenyellow | 1,86 | 0,61 | false | true |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------|------|-------|------|
| IMGA Medtr8g039090.1 | greenyellow | 1,64 | 0,64 | false | true |
| IMGA Medtr8g022810.1 | greenyellow | -1,04 | 0,41 | false | true |
| IMGA Medtr8g022440.1 | greenyellow | 1,84 | 0,54 | false | true |
| IMGA Medtr7g105070.1 | greenyellow | 1,52 | 0,44 | false | true |
| IMGA Medtr7g102820.1 | greenyellow | 1,90 | 0,58 | false | true |
| IMGA Medtr7g093850.1 | greenyellow | 1,68 | 0,54 | false | true |
| IMGA Medtr7g093820.1 | greenyellow | 2,10 | 0,70 | false | true |
| IMGA Medtr7g092700.1 | greenyellow | 1,33 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr7g090570.1 | greenyellow | -1,10 | 0,48 | false | true |
| IMGA Medtr7g090180.1 | greenyellow | 1,11 | 0,47 | false | true |
| IMGA Medtr7g086320.1 | greenyellow | 5,84 | 1,77 | true | true |
| IMGA Medtr7g081580.1 | greenyellow | 1,15 | 0,43 | false | true |
| IMGA Medtr7g080900.1 | greenyellow | 1,39 | 0,49 | false | true |
| IMGA Medtr7g078680.1 | greenyellow | 1,80 | 0,63 | false | true |
| IMGA Medtr7g077180.1 | greenyellow | 1,32 | 0,66 | false | true |
| IMGA Medtr7g065600.1 | greenyellow | 1,98 | 0,71 | false | true |
| IMGA Medtr7g055630.1 | greenyellow | 2,71 | 0,93 | true | true |
| IMGA Medtr7g035060.1 | greenyellow | 1,47 | 0,40 | false | true |
| IMGA Medtr7g023740.1 | greenyellow | 2,29 | 0,78 | false | true |
| IMGA Medtr7g023690.1 | greenyellow | 2,08 | 0,78 | false | true |
| IMGA Medtr7g023670.1 | greenyellow | 2,04 | 0,65 | false | true |
| IMGA Medtr7g023650.1 | greenyellow | 2,94 | 0,95 | false | true |
| IMGA Medtr7g016800.1 | greenyellow | 2,14 | 0,62 | false | true |
| IMGA Medtr7g016780.1 | greenyellow | 2,19 | 0,84 | false | true |
| IMGA Medtr7g016720.1 | greenyellow | 2,25 | 0,75 | false | true |
| IMGA Medtr7g016700.1 | greenyellow | 2,74 | 0,86 | true | true |
| IMGA Medtr7g011990.1 | greenyellow | -1,36 | 0,48 | false | true |
| IMGA Medtr7g010580.1 | greenyellow | -1,53 | 0,42 | false | true |
| IMGA Medtr6g092620.1 | greenyellow | 1,91 | 1,03 | false | true |
| IMGA Medtr6g091680.1 | greenyellow | 1,70 | 0,99 | false | true |
| IMGA Medtr6g018270.1 | greenyellow | 2,63 | 0,90 | false | true |
| IMGA Medtr5g098800.1 | greenyellow | 1,73 | 0,63 | false | true |
| IMGA Medtr5g098720.1 | greenyellow | 1,42 | 0,56 | false | true |
| IMGA Medtr5g097420.1 | greenyellow | -2,03 | 0,42 | false | true |
| IMGA Medtr5g097280.1 | greenyellow | -1,19 | 0,58 | false | true |
| IMGA Medtr5g089580.1 | greenyellow | -3,06 | 0,52 | true | true |
| IMGA Medtr5g083860.1 | greenyellow | 1,47 | 0,53 | false | true |
| IMGA Medtr5g079890.1 | greenyellow | 1,76 | 0,94 | false | true |
| IMGA Medtr5g073210.1 | greenyellow | -1,18 | 0,44 | false | true |
| IMGA Medtr5g066760.1 | greenyellow | -2,45 | 0,56 | false | true |
| IMGA Medtr5g062190.1 | greenyellow | 1,95 | 0,68 | false | true |
| IMGA Medtr5g046110.1 | greenyellow | 1,52 | 0,42 | false | true |
| IMGA Medtr5g036410.1 | greenyellow | 1,97 | 1,02 | false | true |
| IMGA Medtr5g036360.1 | greenyellow | 1,83 | 0,70 | false | true |
| IMGA Medtr5g034320.1 | greenyellow | 1,28 | 0,46 | false | true |
| IMGA Medtr5g027810.1 | greenyellow | 1,43 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr5g026090.1 | greenyellow | -1,42 | 0,43 | false | true |
| IMGA Medtr5g022390.1 | greenyellow | 4,68 | 1,69 | true | true |

| | | | | | |
|-------------------------------|-------------|-------|------|-------|------|
| IMGA Medtr5g022380.1 | greenyellow | 2,46 | 1,02 | true | true |
| IMGA Medtr5g021390.1 | greenyellow | 1,71 | 0,56 | false | true |
| IMGA Medtr5g018610.1 | greenyellow | -2,19 | 0,41 | false | true |
| IMGA Medtr5g018540.1 | greenyellow | 3,48 | 1,20 | false | true |
| IMGA Medtr5g016450.1 | greenyellow | 1,24 | 0,47 | false | true |
| IMGA Medtr5g015880.1 | greenyellow | 1,00 | 0,46 | false | true |
| IMGA Medtr5g015190.1 | greenyellow | 1,95 | 0,45 | false | true |
| IMGA Medtr5g013260.1 | greenyellow | 1,94 | 0,44 | false | true |
| IMGA Medtr5g013030.1 | greenyellow | 1,44 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr5g007730.1 | greenyellow | 2,46 | 0,87 | false | true |
| IMGA Medtr5g007640.1 | greenyellow | 1,61 | 0,42 | false | true |
| IMGA Medtr5g007450.1 | greenyellow | -1,20 | 0,45 | false | true |
| IMGA Medtr5g006070.1 | greenyellow | 2,41 | 0,81 | false | true |
| IMGA Medtr4g127870.1 | greenyellow | 1,52 | 0,80 | false | true |
| IMGA Medtr4g121860.1 | greenyellow | 1,58 | 0,47 | false | true |
| IMGA Medtr4g120830.1 | greenyellow | 1,72 | 0,49 | false | true |
| IMGA Medtr4g114690.1 | greenyellow | 1,90 | 0,68 | false | true |
| IMGA Medtr4g114640.1 | greenyellow | 1,74 | 0,67 | false | true |
| IMGA Medtr4g113820.1 | greenyellow | 3,05 | 1,16 | false | true |
| IMGA Medtr4g101280.1 | greenyellow | 1,32 | 0,44 | false | true |
| IMGA Medtr4g094010.1 | greenyellow | 1,92 | 0,69 | false | true |
| IMGA Medtr4g085890.1 | greenyellow | -1,55 | 0,41 | false | true |
| IMGA Medtr4g085880.1 | greenyellow | 1,56 | 0,44 | false | true |
| IMGA Medtr4g076430.1 | greenyellow | 1,29 | 0,57 | false | true |
| IMGA Medtr4g075980.1 | greenyellow | 1,09 | 0,47 | false | true |
| IMGA Medtr4g060480.1 | greenyellow | -2,30 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr4g018880.1 | greenyellow | 1,85 | 0,63 | false | true |
| IMGA Medtr4g016920.1 | greenyellow | 1,41 | 0,80 | false | true |
| IMGA Medtr4g013930.1 | greenyellow | 1,39 | 0,64 | false | true |
| IMGA Medtr4g006940.1 | greenyellow | 1,47 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr3g111290.1 | greenyellow | 1,66 | 0,79 | false | true |
| IMGA Medtr3g109320.1 | greenyellow | -2,71 | 0,50 | false | true |
| IMGA Medtr3g109120.1 | greenyellow | -1,97 | 0,49 | false | true |
| IMGA Medtr3g106430.1 | greenyellow | 1,43 | 0,70 | false | true |
| IMGA Medtr3g101260.1 | greenyellow | 2,92 | 1,04 | false | true |
| IMGA Medtr3g100470.1 | greenyellow | 1,71 | 0,49 | false | true |
| IMGA Medtr3g096390.1 | greenyellow | -2,00 | 0,46 | false | true |
| IMGA Medtr3g092890.1 | greenyellow | 1,30 | 0,68 | false | true |
| IMGA Medtr3g089970.1 | greenyellow | 3,92 | 1,56 | true | true |
| IMGA Medtr3g082700.1 | greenyellow | 1,99 | 0,56 | false | true |
| IMGA Medtr3g082100.1 | greenyellow | 1,43 | 0,53 | false | true |
| IMGA Medtr3g080860.1 | greenyellow | 2,85 | 1,00 | false | true |
| IMGA Medtr3g077870.1 | greenyellow | 3,44 | 1,52 | false | true |
| IMGA Medtr3g077670.1 | greenyellow | 1,46 | 0,52 | false | true |
| IMGA Medtr3g072500.1 | greenyellow | -1,48 | 0,47 | false | true |
| IMGA Medtr3g072170.1 | greenyellow | 5,67 | 1,85 | false | true |
| IMGA Medtr3g029510.1 | greenyellow | 1,38 | 0,42 | false | true |
| IMGA Medtr3g016290.1 | greenyellow | 1,00 | 0,82 | false | true |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------------|-------|------|-------|------|
| IMGA Medtr3g016270.1 | greenyellow | 1,68 | 0,85 | false | true |
| IMGA Medtr3g016250.1 | greenyellow | 1,78 | 1,08 | false | true |
| IMGA Medtr3g016200.1 | greenyellow | 1,55 | 1,39 | false | true |
| IMGA Medtr3g009050.1 | greenyellow | 1,63 | 0,57 | false | true |
| IMGA Medtr2g100880.1 | greenyellow | 2,00 | 0,77 | false | true |
| IMGA Medtr2g099470.1 | greenyellow | 2,54 | 0,92 | true | true |
| IMGA Medtr2g098070.1 | greenyellow | 2,92 | 1,31 | false | true |
| IMGA Medtr2g097580.1 | greenyellow | 1,63 | 0,50 | false | true |
| IMGA Medtr2g089120.1 | greenyellow | 1,87 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr2g064930.1 | greenyellow | 1,80 | 0,55 | false | true |
| IMGA Medtr2g045280.1 | greenyellow | -2,47 | 0,54 | false | true |
| IMGA Medtr2g041960.1 | greenyellow | 1,39 | 0,41 | false | true |
| IMGA Medtr2g035440.1 | greenyellow | 4,41 | 1,48 | true | true |
| IMGA Medtr2g035190.1 | greenyellow | 2,18 | 0,79 | false | true |
| IMGA Medtr2g035150.1 | greenyellow | 2,52 | 0,88 | false | true |
| IMGA Medtr2g033630.1 | greenyellow | 2,31 | 1,39 | false | true |
| IMGA Medtr2g033380.1 | greenyellow | 1,15 | 0,41 | false | true |
| IMGA Medtr2g030400.1 | greenyellow | -1,71 | 0,48 | false | true |
| IMGA Medtr2g026040.1 | greenyellow | 1,55 | 0,44 | false | true |
| IMGA Medtr2g019250.1 | greenyellow | 1,28 | 0,74 | false | true |
| IMGA Medtr2g019190.1 | greenyellow | 1,84 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr2g015560.1 | greenyellow | 2,76 | 0,82 | false | true |
| IMGA Medtr2g009770.1 | greenyellow | 1,66 | 0,42 | false | true |
| IMGA Medtr2g008030.1 | greenyellow | -1,55 | 0,60 | false | true |
| IMGA Medtr1g116580.1 | greenyellow | 1,39 | 0,47 | false | true |
| IMGA Medtr1g113960.1 | greenyellow | -1,51 | 0,54 | false | true |
| IMGA Medtr1g102240.1 | greenyellow | 1,94 | 0,62 | false | true |
| IMGA Medtr1g098900.1 | greenyellow | 1,37 | 0,51 | false | true |
| IMGA Medtr1g098140.1 | greenyellow | 3,71 | 1,02 | true | true |
| IMGA Medtr1g097910.1 | greenyellow | 4,25 | 1,17 | true | true |
| IMGA Medtr1g093600.1 | greenyellow | 2,17 | 0,62 | false | true |
| IMGA Medtr1g088620.1 | greenyellow | 2,97 | 1,00 | false | true |
| IMGA Medtr1g087920.1 | greenyellow | 2,01 | 0,76 | false | true |
| IMGA Medtr1g083950.1 | greenyellow | 3,55 | 1,28 | true | true |
| IMGA Medtr1g083420.1 | greenyellow | 1,43 | 0,45 | false | true |
| IMGA Medtr1g061640.1 | greenyellow | 2,08 | 0,96 | false | true |
| IMGA Medtr1g045140.1 | greenyellow | -1,07 | 0,62 | false | true |
| IMGA Medtr1g044470.1 | greenyellow | 3,95 | 1,07 | false | true |
| IMGA Medtr1g026020.1 | greenyellow | -2,29 | 0,59 | false | true |
| IMGA Medtr1g025340.1 | greenyellow | 1,80 | 0,52 | false | true |
| IMGA Medtr1g014320.1 | greenyellow | 4,83 | 1,58 | true | true |
| IMGA Medtr1g013700.1 | greenyellow | 1,80 | 0,65 | false | true |
| IMGA Medtr1g008700.1 | greenyellow | 1,59 | 0,62 | false | true |
| IMGA Medtr1g007920.1 | greenyellow | 2,42 | 0,75 | true | true |
| IMGA contig_99115_1.1 | greenyellow | 1,40 | 0,51 | false | true |
| IMGA contig_88317_1.1 | greenyellow | 1,49 | 1,00 | false | true |
| IMGA contig_83669_2.1 | greenyellow | 1,68 | 0,74 | false | true |
| IMGA contig_83313_1.1 | greenyellow | -1,14 | 0,54 | false | true |

| | | | | | |
|-------------------------------|-------------|-------|------|-------|------|
| IMGA contig_81350_1.1 | greenyellow | 1,52 | 0,77 | false | true |
| IMGA contig_81139_1.1 | greenyellow | -1,63 | 0,42 | false | true |
| IMGA contig_7959_1.1 | greenyellow | 1,89 | 0,53 | false | true |
| IMGA contig_79503_1.1 | greenyellow | -2,10 | 0,60 | false | true |
| IMGA contig_76956_1.1 | greenyellow | 1,32 | 0,50 | false | true |
| IMGA contig_76909_1.1 | greenyellow | 1,98 | 0,60 | false | true |
| IMGA contig_75352_2.1 | greenyellow | 1,14 | 0,47 | false | true |
| IMGA contig_66856_2.1 | greenyellow | -1,77 | 0,46 | false | true |
| IMGA contig_65790_2.1 | greenyellow | -1,28 | 0,58 | false | true |
| IMGA contig_64922_1.1 | greenyellow | -1,47 | 0,46 | false | true |
| IMGA contig_64564_1.1 | greenyellow | 7,30 | 1,88 | true | true |
| IMGA contig_63207_1.1 | greenyellow | -1,46 | 0,76 | false | true |
| IMGA contig_61605_1.1 | greenyellow | 1,97 | 0,68 | false | true |
| IMGA contig_61241_1.1 | greenyellow | 2,59 | 1,25 | false | true |
| IMGA contig_57979_3.1 | greenyellow | 1,90 | 0,66 | false | true |
| IMGA contig_57575_1.1 | greenyellow | 2,31 | 0,43 | false | true |
| IMGA contig_57172_2.1 | greenyellow | 1,13 | 0,50 | false | true |
| IMGA contig_57117_1.1 | greenyellow | 1,09 | 0,62 | false | true |
| IMGA contig_56859_1.1 | greenyellow | -1,21 | 0,99 | false | true |
| IMGA contig_56085_2.1 | greenyellow | 1,59 | 0,53 | false | true |
| IMGA contig_54737_1.1 | greenyellow | 1,50 | 0,55 | false | true |
| IMGA contig_54404_1.1 | greenyellow | 1,35 | 0,55 | false | true |
| IMGA contig_53523_1.1 | greenyellow | 2,13 | 1,02 | false | true |
| IMGA contig_52746_2.1 | greenyellow | -1,41 | 0,47 | false | true |
| IMGA contig_50874_2.1 | greenyellow | 1,63 | 0,53 | false | true |
| IMGA contig_247127_1.1 | greenyellow | 2,55 | 1,02 | false | true |
| IMGA contig_240964_1.1 | greenyellow | 3,85 | 1,36 | true | true |
| IMGA contig_239949_1.1 | greenyellow | 1,67 | 0,57 | false | true |
| IMGA contig_239145_1.1 | greenyellow | 1,78 | 0,58 | false | true |
| IMGA contig_237505_2.1 | greenyellow | 1,35 | 0,40 | false | true |
| IMGA contig_21138_1.1 | greenyellow | 1,13 | 0,43 | false | true |
| IMGA contig_17822_1.1 | greenyellow | 2,83 | 0,60 | false | true |
| IMGA contig_176089_1.1 | greenyellow | 1,56 | 0,53 | false | true |
| IMGA contig_172637_1.1 | greenyellow | -1,07 | 0,63 | false | true |
| IMGA contig_167649_1.1 | greenyellow | -2,74 | 0,59 | true | true |
| IMGA contig_16485_1.1 | greenyellow | 1,86 | 0,98 | false | true |
| IMGA contig_164570_1.1 | greenyellow | 1,47 | 0,47 | false | true |
| IMGA contig_12851_1.1 | greenyellow | 3,05 | 1,43 | false | true |
| IMGA contig_123650_12.1 | greenyellow | 1,21 | 0,48 | false | true |
| IMGA contig_123020_1.1 | greenyellow | -1,47 | 0,45 | false | true |
| IMGA contig_120264_2.1 | greenyellow | 1,67 | 0,60 | false | true |
| IMGA contig_116016_1.1 | greenyellow | 1,70 | 0,72 | false | true |
| IMGA contig_115135_1.1 | greenyellow | 1,71 | 0,80 | false | true |
| IMGA contig_11232_1.1 | greenyellow | 1,01 | 0,41 | false | true |
| IMGA contig_111244_1.1 | greenyellow | 1,51 | 0,51 | false | true |
| IMGA contig_10798_1.1 | greenyellow | 1,72 | 0,91 | false | true |
| IMGA contig_104207_1.1 | greenyellow | 2,71 | 1,05 | true | true |
| IMGA contig_102045_1.1 | greenyellow | 1,02 | 0,49 | false | true |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|-------|------|-------|------|
| IMGA contig_100652_1.1 | greenyellow | 1,01 | 0,48 | false | true |
| IMGA AC235668_11.1 | greenyellow | -1,62 | 0,50 | false | true |
| IMGA AC233657_24.1 | greenyellow | 1,45 | 0,45 | false | true |
| IMGA AC225474_18.1 | greenyellow | 1,24 | 0,43 | false | true |
| IMGA AC174330_5.1 | greenyellow | 2,13 | 0,86 | false | true |
| gi 4584689embAJ131943.1 | greenyellow | 2,36 | 0,63 | false | true |
| gi 388523126 gb BT149831.1 | greenyellow | -1,51 | 0,44 | false | true |
| gi 388522022 gb BT149279.1 | greenyellow | 3,15 | 1,17 | false | true |
| gi 388521428 gb BT148982.1 | greenyellow | 1,76 | 0,83 | false | true |
| gi 388521146 gb BT148841.1 | greenyellow | 2,08 | 0,43 | false | true |
| gi 388517908 gb BT147222.1 | greenyellow | -1,48 | 0,70 | false | true |
| gi 388517796 gb BT147166.1 | greenyellow | 3,21 | 1,22 | true | true |
| gi 388516584 gb BT146560.1 | greenyellow | 1,42 | 0,81 | false | true |
| gi 388512696 gb BT144616.1 | greenyellow | 2,01 | 0,61 | false | true |
| gi 388512182 gb BT144359.1 | greenyellow | 1,72 | 0,58 | false | true |
| gi 388511684 gb BT144110.1 | greenyellow | 1,85 | 0,80 | false | true |
| gi 388511662 gb BT144099.1 | greenyellow | 2,84 | 0,95 | false | true |
| gi 388510923 gb BT143734.1 | greenyellow | 2,05 | 0,66 | false | true |
| gi 388509765 gb BT143155.1 | greenyellow | 2,09 | 0,70 | false | true |
| gi 388507841 gb BT142193.1 | greenyellow | 2,07 | 0,77 | false | true |
| gi 388505447 gb BT140996.1 | greenyellow | -2,31 | 0,81 | false | true |
| gi 388505343 gb BT140943.1 | greenyellow | 1,38 | 0,43 | false | true |
| gi 388502923 gb BT139733.1 | greenyellow | 1,42 | 0,51 | false | true |
| gi 388499945 gb BT138244.1 | greenyellow | 1,51 | 0,43 | false | true |
| gi 388498847 gb BT137695.1 | greenyellow | -1,25 | 0,44 | false | true |
| gi 388498049 gb BT137296.1 | greenyellow | -1,85 | 0,44 | false | true |
| gi 388496725 gb BT136634.1 | greenyellow | -1,58 | 0,43 | false | true |
| gi 388496179 gb BT136361.1 | greenyellow | 1,02 | 0,56 | false | true |
| gi 388491839 gb BT134191.1 | greenyellow | 1,19 | 0,52 | false | true |
| gi 335980983 gb JL892187.1 | greenyellow | 4,07 | 1,40 | false | true |
| gi 335979447 gb JL890651.1 | greenyellow | 1,92 | 0,47 | false | true |
| gi 335978782 gb JL889986.1 | greenyellow | 2,12 | 0,61 | false | true |
| gi 335973567 gb JL884771.1 | greenyellow | 1,91 | 0,64 | false | true |
| gi 2598598embY15372.1 | greenyellow | 1,48 | 0,57 | false | true |
| gi 226815613embFM886833.1 | greenyellow | 1,32 | 0,43 | false | true |
| gi 217074765 gb BT053082.1 | greenyellow | 1,31 | 0,80 | false | true |
| gi 217073633 gb BT052510.1 | greenyellow | 2,05 | 0,70 | false | true |
| gi 1616608embY08641.1 | greenyellow | 2,10 | 0,56 | false | true |
| EY475279 | greenyellow | 1,77 | 0,87 | false | true |
| EX532597 | greenyellow | 2,14 | 0,91 | false | true |
| EX531804 | greenyellow | -1,27 | 0,43 | false | true |
| EV262548 | greenyellow | 1,88 | 0,48 | false | true |
| DY632698 | greenyellow | 1,48 | 1,39 | false | true |
| contig_8503 | greenyellow | 1,02 | 0,44 | false | true |
| contig_7969 | greenyellow | 2,12 | 0,72 | false | true |
| contig_7825 | greenyellow | 2,42 | 0,98 | true | true |
| contig_71947 | greenyellow | 1,44 | 0,49 | false | true |
| contig_71051 | greenyellow | 1,48 | 0,44 | false | true |

| | | | | | |
|----------------------|---------------|--------|------|-------|-------|
| contig_70973 | greenyellow | 1,48 | 0,77 | false | true |
| contig_69778 | greenyellow | 1,27 | 0,48 | false | true |
| contig_66662 | greenyellow | 1,91 | 0,53 | false | true |
| contig_62734 | greenyellow | 1,56 | 0,45 | false | true |
| contig_53796 | greenyellow | 3,48 | 0,99 | false | true |
| contig_53523 | greenyellow | 2,34 | 1,20 | false | true |
| contig_53088 | greenyellow | 1,72 | 0,70 | false | true |
| contig_48970 | greenyellow | -1,31 | 0,97 | false | true |
| contig_28935 | greenyellow | 1,51 | 0,61 | false | true |
| contig_24502 | greenyellow | 1,66 | 0,57 | false | true |
| contig_240314 | greenyellow | 2,13 | 0,68 | false | true |
| contig_238937 | greenyellow | 1,94 | 0,70 | false | true |
| contig_176089 | greenyellow | 1,59 | 0,45 | false | true |
| contig_128832 | greenyellow | 1,66 | 0,69 | false | true |
| contig_126470 | greenyellow | 5,54 | 1,68 | true | true |
| contig_116016 | greenyellow | 2,03 | 0,79 | false | true |
| BQ152482 | greenyellow | -1,28 | 0,44 | false | true |
| BM780197 | greenyellow | -1,45 | 0,57 | false | true |
| BG588493 | greenyellow | 1,60 | 0,41 | false | true |
| BG582521 | greenyellow | 1,47 | 0,42 | false | true |
| BE998611 | greenyellow | 1,36 | 0,40 | false | true |
| BE997993 | greenyellow | 1,96 | 0,56 | false | true |
| BE941277 | greenyellow | 2,58 | 1,14 | false | true |
| BE323045 | greenyellow | 2,37 | 0,81 | false | true |
| AW694931 | greenyellow | 1,63 | 0,82 | false | true |
| AL376380 | greenyellow | 1,79 | 0,77 | false | true |
| ABPE01003735 | greenyellow | 656,93 | 1,56 | true | true |
| ABPE01003149 | greenyellow | 153,95 | 1,64 | true | true |
| ABPE01002781 | greenyellow | 304,65 | 1,57 | true | true |
| ABPE01002352 | greenyellow | 125,69 | 1,57 | true | true |
| ABPE01000696 | greenyellow | 205,84 | 1,62 | true | true |
| ABPE01000318 | greenyellow | 613,66 | 1,59 | true | true |
| ABPE01000172 | greenyellow | 389,39 | 1,62 | true | true |
| TC202037 | mediumpurple3 | 1,10 | 0,48 | false | false |
| TC195731 | mediumpurple3 | 2,05 | 0,41 | false | false |
| TC193257 | mediumpurple3 | -1,64 | 0,48 | false | false |
| TC193055 | mediumpurple3 | 1,56 | 0,41 | false | false |
| TC191970 | mediumpurple3 | 1,20 | 0,45 | false | false |
| TC188546 | mediumpurple3 | 1,09 | 0,42 | false | false |
| TC183871 | mediumpurple3 | 2,68 | 0,60 | false | false |
| TC182348 | mediumpurple3 | -1,81 | 0,70 | false | false |
| TC179395 | mediumpurple3 | 1,67 | 0,46 | false | false |
| TC178239 | mediumpurple3 | 1,07 | 0,75 | false | false |
| TC177122 | mediumpurple3 | -1,31 | 0,42 | false | false |
| TC174675 | mediumpurple3 | -1,20 | 0,48 | false | false |
| TC173534 | mediumpurple3 | 1,13 | 0,50 | false | false |
| IMGA Medtr8g083290.1 | mediumpurple3 | -1,61 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr8g079330.1 | mediumpurple3 | -1,06 | 0,40 | false | false |

| | | | | | |
|------------------------------|---------------|-------|------|-------|-------|
| IMGA Medtr8g032000.1 | mediumpurple3 | -1,18 | 0,55 | false | false |
| IMGA Medtr7g088990.2 | mediumpurple3 | -1,06 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr7g070740.1 | mediumpurple3 | 1,23 | 0,58 | false | false |
| IMGA Medtr7g065590.1 | mediumpurple3 | -1,40 | 0,43 | false | false |
| IMGA Medtr7g027680.1 | mediumpurple3 | 1,67 | 0,44 | false | false |
| IMGA Medtr7g011010.1 | mediumpurple3 | 1,02 | 0,56 | false | false |
| IMGA Medtr6g075950.1 | mediumpurple3 | 1,08 | 0,55 | false | false |
| IMGA Medtr6g044810.1 | mediumpurple3 | 1,80 | 0,98 | false | false |
| IMGA Medtr5g095220.1 | mediumpurple3 | -1,29 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr5g084570.1 | mediumpurple3 | -1,83 | 0,58 | false | false |
| IMGA Medtr5g076960.1 | mediumpurple3 | 1,17 | 0,53 | false | false |
| IMGA Medtr5g069990.1 | mediumpurple3 | 1,24 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr5g027530.1 | mediumpurple3 | -1,30 | 0,57 | false | false |
| IMGA Medtr5g024020.1 | mediumpurple3 | 1,03 | 0,69 | false | false |
| IMGA Medtr4g079160.1 | mediumpurple3 | 1,47 | 0,57 | false | false |
| IMGA Medtr4g019150.1 | mediumpurple3 | 1,00 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr4g015460.1 | mediumpurple3 | 1,34 | 0,62 | false | false |
| IMGA Medtr3g084520.1 | mediumpurple3 | 1,28 | 0,80 | false | false |
| IMGA Medtr3g057010.1 | mediumpurple3 | -1,10 | 0,45 | false | false |
| IMGA Medtr2g088190.1 | mediumpurple3 | 1,35 | 0,45 | false | false |
| IMGA Medtr2g038200.1 | mediumpurple3 | -1,09 | 0,40 | false | false |
| IMGA Medtr2g030300.1 | mediumpurple3 | 1,57 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr2g026760.1 | mediumpurple3 | -1,17 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr1g099480.1 | mediumpurple3 | 1,49 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr1g012620.1 | mediumpurple3 | -1,09 | 0,49 | false | false |
| IMGA contig_9906_1.1 | mediumpurple3 | 1,33 | 0,50 | false | false |
| IMGA contig_77378_1.1 | mediumpurple3 | 1,52 | 0,53 | false | false |
| IMGA contig_74347_1.1 | mediumpurple3 | 1,34 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_74144_1.1 | mediumpurple3 | -1,41 | 0,56 | false | false |
| IMGA contig_70372_1.1 | mediumpurple3 | -5,42 | 0,72 | true | false |
| IMGA contig_62167_1.1 | mediumpurple3 | 1,47 | 0,53 | false | false |
| IMGA contig_58642_2.1 | mediumpurple3 | 1,02 | 0,48 | false | false |
| IMGA contig_55941_1.1 | mediumpurple3 | 1,60 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_54682_1.1 | mediumpurple3 | 1,16 | 0,42 | false | false |
| IMGA contig_52426_1.1 | mediumpurple3 | 1,05 | 0,45 | false | false |
| IMGA contig_239404_1.1 | mediumpurple3 | -1,04 | 0,57 | false | false |
| IMGA contig_164155_1.1 | mediumpurple3 | 1,04 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_126928_1.1 | mediumpurple3 | 1,62 | 0,47 | false | false |
| IMGA contig_10853_1.1 | mediumpurple3 | -1,46 | 0,48 | false | false |
| IMGA contig_106542_1.1 | mediumpurple3 | 3,77 | 1,10 | false | false |
| IMGA contig_103961_1.1 | mediumpurple3 | 1,25 | 0,41 | false | false |
| IMGA AC233109_35.1 | mediumpurple3 | 1,03 | 0,64 | false | false |
| gi 388514234 gb BT145385.1 | mediumpurple3 | 1,02 | 0,46 | false | false |
| gi 388497641 gb BT137092.1 | mediumpurple3 | -1,77 | 0,51 | false | false |
| gi 388493655 gb BT135099.1 | mediumpurple3 | 1,57 | 0,48 | false | false |
| gi 388492945 gb BT134744.1 | mediumpurple3 | 1,29 | 0,50 | false | false |
| contig_59872 | mediumpurple3 | 1,91 | 0,50 | false | false |
| contig_21779 | mediumpurple3 | 1,22 | 0,49 | false | false |

| | | | | | |
|----------------------------|---------------|-------|------|-------|-------|
| contig_20569 | mediumpurple3 | 1,45 | 0,42 | false | false |
| contig_177753 | mediumpurple3 | -1,26 | 0,42 | false | false |
| TC189892 | sienna3 | 3,02 | 0,63 | false | false |
| TC188179 | sienna3 | 1,36 | 0,48 | false | false |
| TC187041 | sienna3 | 1,92 | 0,52 | false | false |
| TC185399 | sienna3 | 1,54 | 0,40 | false | false |
| TC181008 | sienna3 | 1,86 | 0,42 | false | false |
| TC179544 | sienna3 | 1,51 | 0,55 | false | false |
| TC177794 | sienna3 | 1,65 | 0,42 | false | false |
| TC175756 | sienna3 | 1,91 | 0,42 | false | false |
| TC175714 | sienna3 | 1,85 | 0,47 | false | false |
| TC173183 | sienna3 | -1,17 | 0,57 | false | false |
| IMGA Medtr8g075830.1 | sienna3 | -1,65 | 0,72 | false | false |
| IMGA Medtr8g022040.1 | sienna3 | 1,83 | 0,49 | false | false |
| IMGA Medtr8g011780.1 | sienna3 | 1,80 | 0,47 | false | false |
| IMGA Medtr7g085180.1 | sienna3 | -1,35 | 0,44 | false | false |
| IMGA Medtr6g077520.1 | sienna3 | 1,94 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr6g014270.1 | sienna3 | 1,39 | 0,42 | false | false |
| IMGA Medtr4g103650.1 | sienna3 | 1,70 | 0,53 | false | false |
| IMGA Medtr4g068220.1 | sienna3 | 1,33 | 0,55 | false | false |
| IMGA Medtr3g064780.1 | sienna3 | 1,28 | 0,72 | false | false |
| IMGA Medtr2g040130.1 | sienna3 | 1,83 | 0,57 | false | false |
| IMGA Medtr2g009910.1 | sienna3 | 2,43 | 0,66 | false | false |
| IMGA Medtr2g008226.1 | sienna3 | -1,32 | 0,43 | false | false |
| IMGA Medtr1g080510.1 | sienna3 | 2,08 | 0,87 | false | false |
| IMGA contig_96678_1.1 | sienna3 | -1,64 | 0,40 | false | false |
| IMGA contig_81154_1.1 | sienna3 | 1,49 | 0,41 | false | false |
| IMGA contig_75277_2.1 | sienna3 | 1,65 | 0,55 | false | false |
| IMGA contig_56386_1.1 | sienna3 | 2,98 | 0,84 | false | false |
| IMGA contig_55030_2.1 | sienna3 | 1,70 | 0,60 | false | false |
| IMGA contig_239984_1.1 | sienna3 | 1,16 | 0,72 | false | false |
| IMGA contig_168961_1.1 | sienna3 | 2,42 | 0,80 | false | false |
| IMGA contig_117034_1.1 | sienna3 | 1,31 | 0,66 | false | false |
| IMGA contig_103710_1.1 | sienna3 | 1,74 | 0,60 | false | false |
| gi 388510171 gb BT143358.1 | sienna3 | 1,52 | 0,40 | false | false |
| CA922330 | sienna3 | 1,69 | 0,41 | false | false |
| BG589023 | sienna3 | -1,46 | 0,40 | false | false |

Module, les modules sont identifiés par un code couleur ; Fold (coefficient de variation de l'expression du gène) ; CV, Coefficient de variabilité ; p-value, mesure statistique de la différence d'expression entre la condition inoculée et la condition contrôle ; DiffInoc, indique si le gène est différentiellement exprimé en réponse à l'inoculation ; sélectionné, les gènes qui sont dans le module de réponse à Va V31-2 (Greenyellow).

Les gènes qui sont en grisé sont ceux dont nous n'avons pas pu extraire les séquences nucléotidiques en raison d'un manque de précision sur leurs identifiants.

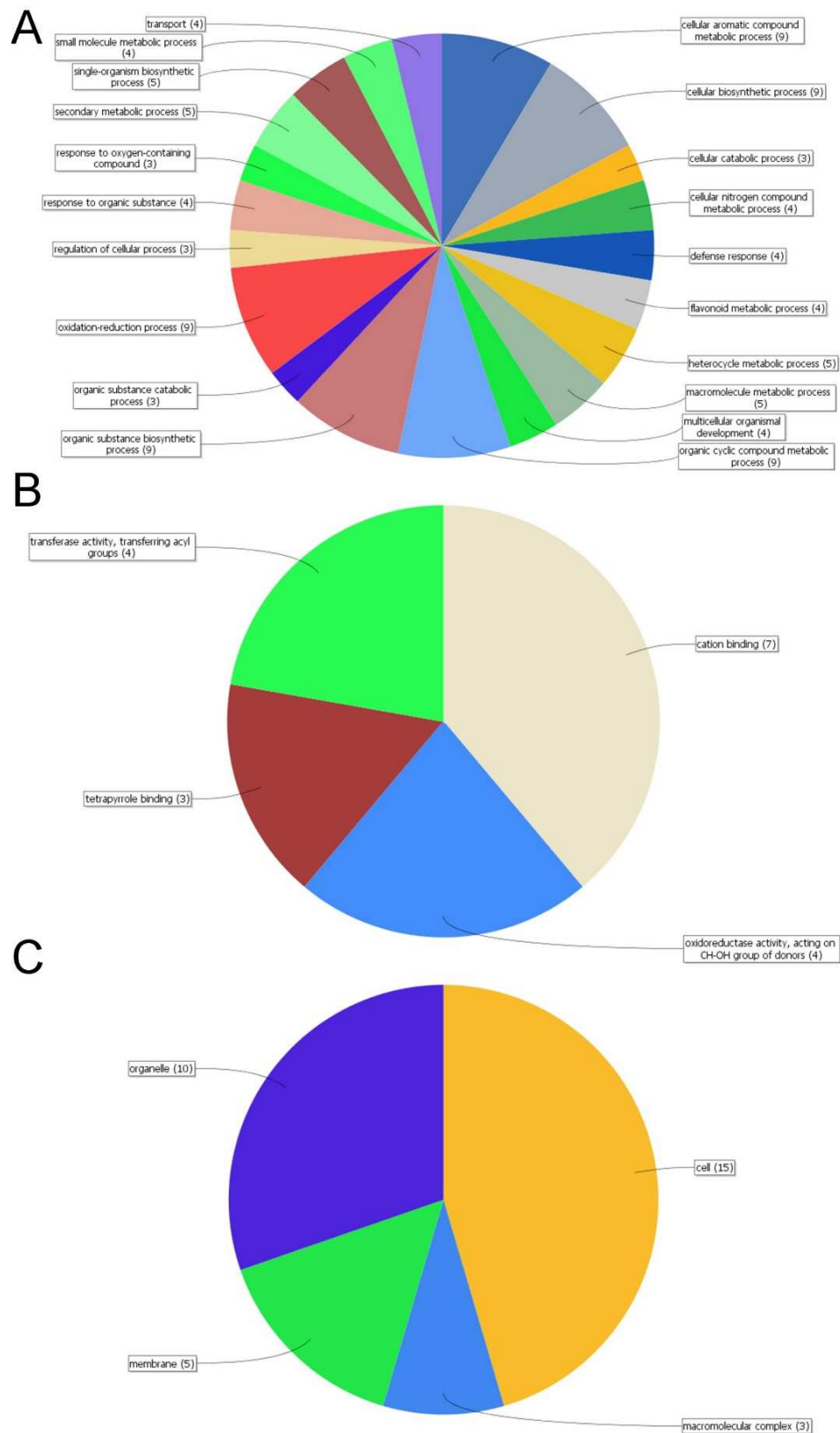


Figure S. 1 : Processus biologiques (A), moléculaires (B) et compartiments cellulaires (C) associés aux gènes qui s'expriment différemment en réponse à l'inoculation chez A17. Ici sont représentés les termes GO-slim (plantes) les plus représentés au sein des 44 gènes. Les chiffres entre parenthèses représentent le pourcentage associées au terme. A et B, Terme GO de niveau 4 ; C, terme GO de niveau 2.

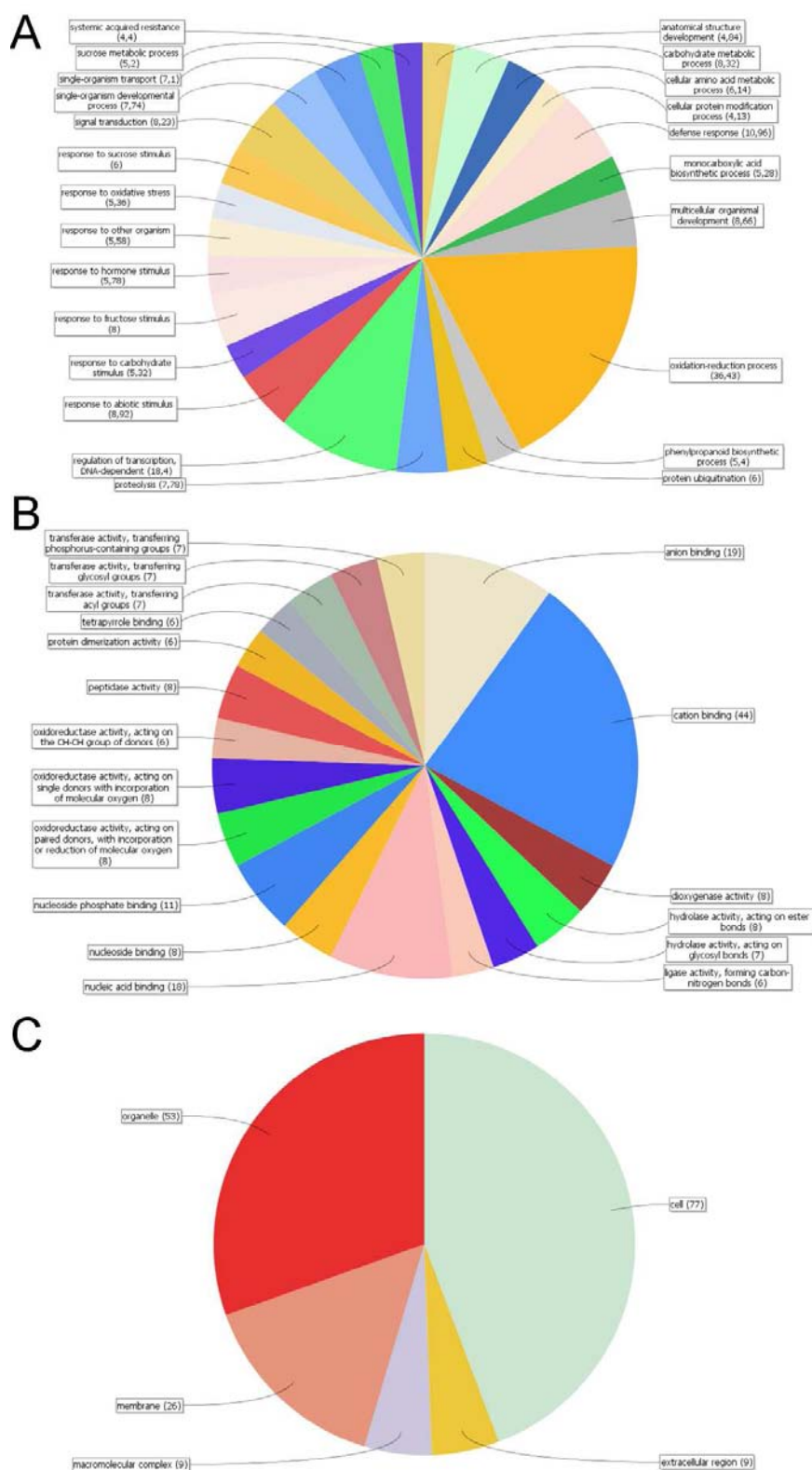


Figure S. 2 : Processus biologiques (A), moléculaires (B) et compartiments cellulaires (C) associés aux gènes qui s'expriment différemment en réponse à l'inoculation chez F83005.5. Ici sont représentés les termes GO-slim (plantes) les plus représentés dans les 282 gènes. Les chiffres entre parenthèses représentent le pourcentage de séquences associées au terme. A et B, Terme GO de niveau 4 ; C, terme GO de niveau 2.

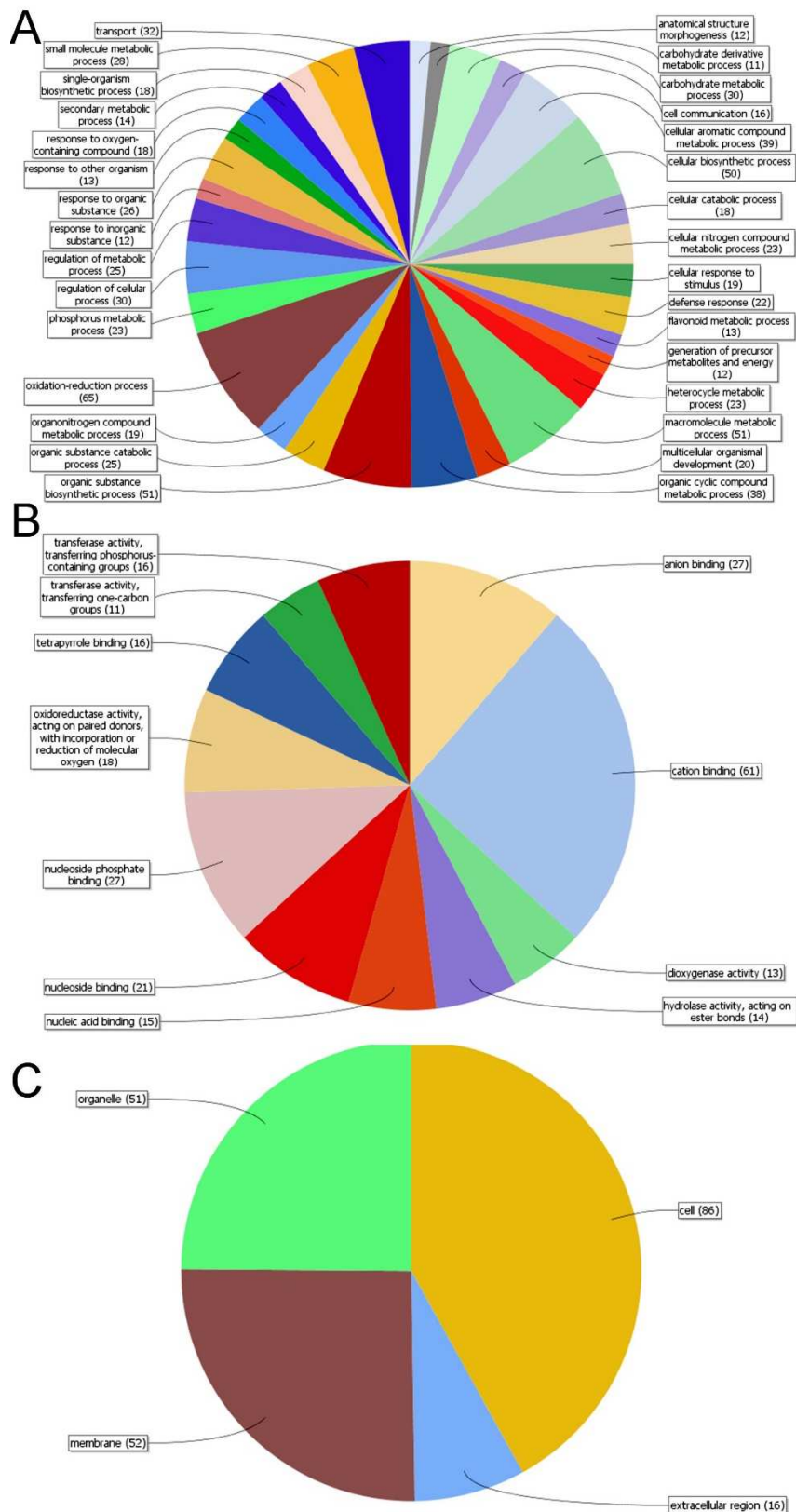


Figure S. 3 : Processus biologiques (A), moléculaires (B) et compartiments cellulaires (C) associés aux gènes du module de résistance (Greenyellow) contre *Va* V31-2. Ici sont représentés les termes GO-slim (plantes) les plus représentés dans les 282 gènes. Les chiffres entre parenthèses représentent le pourcentage des séquences associées au terme. A et B, Terme GO de niveau 4 ; C, terme GO de niveau 2.