

Caractérisation de l'effet de stimulateurs de défense des plantes (SDP) en fonction du stade de développement et de l'apport en azote

Camille Verly

► To cite this version:

Camille Verly. Caractérisation de l'effet de stimulateurs de défense des plantes (SDP) en fonction du stade de développement et de l'apport en azote. Phytopathologie et phytopharmacie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLS143. tel-04518596

HAL Id: tel-04518596 https://theses.hal.science/tel-04518596

Submitted on 24 Mar 2024

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.





Caractérisation de l'effet de stimulateurs de défense des plantes (SDP) en fonction du stade de développement et de l'apport en azote.

> Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à l'Université Paris-Sud Institut Jean-Pierre Bourgin (INRA Versailles)

École doctorale n°567 Sciences du végétal : du gène à l'écosystème (SDV) Spécialité de doctorat: Sciences agronomiques

Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 25/06/2019, par

Camille Verly

Composition du Jury :

Marie DufresnePrésidenteProfesseur, Université Paris-Saclay (Institut de Sciences des Plantes de Paris-
Saclay, UMR 9213, UMR 1403)

Bernard Dumas Rapporteur Directeur de Recherche, CNRS (Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR 5546)

Charles DesprèsRapporteurProfesseur, Brock University (Department of Biological Sciences) Canada

Alexandre Degrave Examinateur Maitre de Conférence, Agrocampus Ouest (Institut de Recherche en Horticulture et Semence, UMR 1345)

Elsa Ballini Examinatrice Maitre de Conférence, Montpellier SupAgro (Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, UMR 0385)

Alia Dellagi Directrice de thèse Professeur, AgroParisTech (Institut Jean-Pierre Bourdin UMR 1318)

Marie Emmanuelle Saint Macary Docteur, Staphyt (Bioteam) Co-Directrice de thèse invité

Loïc Rajjou Co-Directeur de thèse invité Professeur, AgroParisTech (Institut Jean-Pierre Bourgin UMR 1318)

Frédéric Giraud Docteur, Staphyt (Service L&G, Bioteam) Co-Directeur de thèse invité

NRA AgroParisTech 20



Thèse de doctorat



UNIVERSITE PARIS-SACLAY

Titre : Caractérisation de l'effet de stimulateurs de défense des plantes (SDP) en fonction du stade de développement et de l'apport en azote.

Mots clés : plantes, SDP, défenses, fertilisation azotée, stade de développement, bio protection, tests

Résumé : Les Stimulateurs de Défense des Plantes (SDP), utilisés dans le cadre de la protection des cultures, constituent une option intéressante pour réduire l'utilisation de produits phytosanitaires « conventionnels » et optimiser les stratégies de biocontrôle. Ces produits sont capables d'activer les défenses de la plante et limiter ainsi l'infection par les agents pathogènes.

Cependant, l'efficacité de ces SDP reste erratique et est potentiellement dépendante de nombreux paramètres agronomiques et environnementaux encore méconnus ou mal maîtrisés. Des méthodes de diagnostic de l'activation de défense sont requises pour optimiser l'usage des SDP.

Le stade de développement de la plante ainsi que la nutrition minérale, et essentiellement la nutrition azotée, jouent un rôle majeur dans la mise en place des défenses en présence d'agents pathogènes ou d'éliciteurs.

Durant cette thèse, une étude de l'impact du

stade de développement de la plante et de sa nutrition azotée sur les réponses à des éliciteurs a été menée. Une nutrition optimale s'est avérée nécessaire pour une mise en place des défenses et une protection efficaces. Dans le but d'améliorer les méthodes de criblage des produits ayant potentiellement des activités SDP, deux tests diagnostiques ont été développés durant cette thèse : 1) un test de laboratoire appelé «GUSTAVE» basé sur l'utilisation de plantes d'Arabidopsis exprimant des fusions GUS sous le contrôle de promoteurs de gènes de défense et 2) un test immunologique appelé « ELICITEST » basé sur des anticorps mis au point durant cette thèse dont l'utilisation fait l'objet d'un dépôt de brevet. Nos résultats indiquent que l'efficacité des SDP est fortement affectée par la nutrition azotée et dépend du pathosystème considéré. Nous avons développé pour la profession de outils simples qui permettront d'améliorer la mise au point des conditions d'utilisation de ces produits.

Title: Characterization of the effect of plant natural defense stimulators (NDS) according to the stage of development and nitrogen intake.

Keywords: plants, elicitors, defenses, nitrogen fertilization, developmental stage, bio protection, test

Abstract: Plant Defense Elicitors (PDE), used in crop protection, is an attractive option to reduce the use of "conventional" crop protection products and optimize biocontrol strategies. These products are able to activate plant defenses and thus limit infection by pathogens. However, the effectiveness of these SDP remains erratic and is potentially dependent on many agronomic and environmental parameters still unknown or poorly controlled. Diagnostic methods for defense activation are required to optimize the use of SDP. The stage of development of the plant as well as mineral nutrition, and essentially nitrogen nutrition, play a major role in the establishment of defenses in the presence of pathogens or elicitors.

During this PhD, a study of the impact of the plant developmental stage and of nitrogen

nutrition on the responses to elicitors was conducted. Optimal nutrition is needed for effective defense activation and protection. In order to improve the screening methods of products with potentially PDE activities, two diagnostic tests were developed during this thesis: 1) a laboratory test called "GUSTAVE" based on the use of Arabidopsis plants expressing GUS fusions under the control of defense gene promoters and 2) an immunoassay "ELICITEST" based on antibodies called developed during this thesis whose use is the subject of a patent application. Our results indicate that the efficacy of SDP is strongly affected by nitrogen nutrition and depends on the pathosystem considered. We have developed simple tools for professionals that will allow improving the conditions of PDE use.

Remerciements

En premier lieu je remercie les membres de mon jury : Pr Charles Desprès, Dr Bernard Dumas, Pr Marie Dufresne, Dr Alexandre Degrave et Dr Elsa Ballini, d'avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai effectué durant cette thèse.

Je remercie aussi chaleureusement les membres de mon comité de thèse, Dr. Marie Garmier, Pr. Michel Ponchet, Pr. Sylvain Jeandroz, et mes référents d'exposé de début et de fin de thèse à l'IJPB, Dr. Thomas Girin et Dr. Jean-Luc Cacas. Leur regard extérieur m'a été très utile et m'a permis de me poser les bonnes questions sur l'avancement de mon sujet et de réorienter mes recherches en fonction de ces questions.

Merci à l'entreprise Staphyt, au LabEx SPS, à l'INRA et à l'ANRT pour les financements qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Merci de même, à l'université Paris Saclay et à l'école doctorale Sciences du Végétal pour m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier le Pr. Martine Thomas, qui a été mon mentor durant toutes mes années de fac et qui m'a donné le goût et la passion de la biologie moléculaire des plantes. Comment ne pas penser ensuite à tous mes différents maîtres de stage qui m'ont suivi, encouragé et m'ont apporté toutes les connaissances et compétences nécessaires à la réalisation de cette thèse. Dans l'ordre : Dr. Stéphanie Ouvrard chez qui j'ai touché la première fois à des plantes dans le cadre de la recherche et chez qui je me suis rendu compte que la partie moléculaire de la biologie des plantes était importante pour moi ; Pr Martine Thomas et Dr Pierre Crozet, qui m'ont permis de toucher à un grand panel de technique de biomol (que je ne citerai pas, y'en a trop...) et de travailler pour la première fois sur Arabidopsis ; Dr. Nalini Rama-Rao qui m'a permis d'apprendre à être indépendant au laboratoire et à approfondir mes techniques en bactério sur *E. coli* et *B.cereus/thuringiensis*; Dr Peter Mergaert et Dr Benoit Alunni, chez qui j'ai pu prouver mon indépendance, qui m'ont permis d'avoir mes premières publications et de travailler pour la première fois sur des couples plante/microorganisme.

Je tiens ensuite à exprimer un grand MERCI à mes encadrants de thèse, qui m'ont suivi et soutenu depuis le début du projet jusqu'à maintenant malgré les hauts et les bas inhérents à toute thèse, (5 ans c'est quand même pas rien dans une vie...): Pr Alia Dellagi qui a chapeauté le projet et m'a accompagné sur toute la partie microbio, azote et plante /pathogène ; Dr Marie Emmanuelle Saint Macary, à l'origine du projet collaboratif du côté de Staphyt, pour ses discussions téléphoniques hebdomadaires parfois interminables ; Pr Loïc Rajjou, lui aussi à l'origine du projet et Dr Frédéric Giraud, pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire de Staphyt, à Bordeaux, le soutien du projet au sein de cette entreprise et pour toutes les bandes dessinées qu'il m'a fait découvrir.

Après les chefs, comment ne pas penser aux collègues ? Je remercie donc toutes les personnes avec qui j'ai travaillé, discuté, et passé du bon temps durant toute la durée de ce projet :

Tout d'abord, les collègues de l'INRA de Versailles impliqués dans cette aventure : Gwendal pour toute ton aide sur la plateforme de Biochimie et nos discussions musicales, politiques et sur bien d'autres sujets; Martine pour toute ton aide sur la partie microbio, qPCR, pathogène, ta bonne humeur et ton soutien indéfectible; Mathilde, Marie-Christine, Dominique et Sylvie pour votre accueil dans l'équipe NPI et toutes ces discussions en réunions d'équipe ou ailleurs ; l'équipe GAPV pour m'avoir accueilli sur la fin de ma thèse ; Martine et Boris pour votre accueil au sein de la plateforme de biochimie et pour avoir été là dès que je cherchais un produit ou à améliorer une technique. Martine merci aussi pour ta casquette que je porte régulièrement et Boris pour les bonnes rigolades lors de nos pauses clope/café. Ensuite les collègues de l'INRA de Versailles qui m'ont accueilli à bras ouverts durant toutes ces années sur ce magnifique centre sur le domaine du château : tous les collègues du bâtiment 3, et plus particulièrement l'équipe café du midi Lénaïg, Isabelle, Marien et Fabienne pour tous ces moments agréables accompagnés de chocolat ainsi que l'équipe bière du soir : Christian, Thomas, Patrick, Fabien et Anne; la Belgique ça a quelque chose de magique... Et bien entendu tous les autres du bâtiment 3 que je ne citerai pas individuellement par manque de place et par ce que j'ai peur d'en oublier ; merci pour ces noëls, ces barbecues, cette joie et cette bonne humeur dans une ambiance familiale (merci Bertrand pour tes blagues qui à défaut d'être toujours bonnes ont le mérite de détendre l'atmosphère). Merci aussi à toutes les autres personnes du centre que j'ai pu côtoyer avec une dédicace spéciale à Jérôme et Sébastien du magasin que l'on a souvent embêté avec Isabelle ma collègue de l'équipe plastique (Le plastique c'est fantastique...). En parlant d'Isabelle, pleins de grands merci à toi. Oui je ne t'ai pas incluse dans le bâtiment 3 car tu mérites un Big-up spécialement pour toi. Ta bonne humeur et les rigolades que l'on a eves en faisant les stocks du bâtiment résonneront encore longtemps dans mes oreilles et merci à toi et ton mari pour les petits plaisirs gustatifs réguliers, galette des rois, crêpes... Merci aussi à toute l'équipe des serristes et particulièrement à Hervé, Joël et Philippe de vous être occupés de mes plantes et m'avoir trouvé de la place pour faire mes cultures en jours longs. Et pour terminer à propos de l'IJPB, je remercie du fond du cœur tous les doctorants, stagiaires et CDD avec qui j'ai passé de bons moments : Alban, Aude, Laure, Camille C., Mickael, Julien D., Mahsa, Camille S., German, Marlène, Amélie, Julia, Servane Emilie, Sahar, Mickäel, Mathilde, Gustavo, Kévan, Houda, Corentin, Agathe, Baptiste, Victor, Olivier, Julien S., Stéphane, Fatima, Elie, Léo, Jing, Nicolas, Chouaib, Eve, Adrian, Aurélien, Chuande, Noémie, Noelia, Edith, Isabelle, Frédéric, Tian, Julien L., Fan, Ying, Marjolaine et bien sûr Fadi. J'espère n'avoir oublié personne et ne vais pas faire de commentaires personnels car j'aurais trop de choses à dire sur vous tous. Merci aussi à Roméo, qui a travaillé avec moi dans le cadre de son stage de master1.

Ensuite les collègues de Staphyt et plus particulièrement de la station de Martillac (ex Biorizon). Merci à vous tous pour l'accueil, la bonne humeur et les bons moments passés ensemble avec une pensée particulière à l'équipe originale (les « nouveaux » je pense aussi à vous ne vous inquiétez pas) : Les filles, Mimi, Elo et Isa, en souvenir du jour où je suis arrivé et ou vous m'avez laissé manger tout seul... (Ça va je ne vous en tiens pas rigueur) ; Vincent, en souvenir des deux serres tunnel que l'on a construites ensemble ; Anne pour toutes nos discussions scientifiques et les études GUSTAVE que tu as supervisées pour moi à distance ; Thomas, mon binôme, en se souvenant ou pas trop d'un Maï-taï un jour de séminaire et Antoine, en espérant que tu as appris à chanter avec ton masque... Merci aussi à Mireille P. pour tous ces séminaires durant lesquels tu as eu la joie de me soutenir et pour finir un grand merci à Chloé qui a réalisé les essais champs présentés dans cette thèse.

D'un côté plus personnel, j'aimerais remercier mes amis qui m'ont soutenu durant cette thèse et tout particulièrement les membres de mon groupe de musique « Le rat sur la corde » : Ludou, Djouls, Bob, Gislou et Rémi. Merci à vous pour les répétitions du lundi soir et pour les concerts que l'on a réalisés qui m'ont permis de m'évader le temps d'une soirée. Merci à Ludo Santerne aussi pour nous avoir accompagnés lors de nos concerts, m'avoir écrit une chanson et pour les cours de tennis durant lesquels tu as pris un malin plaisir à me faire courir. Petit retour à l'INRA, merci à notre plus grand fan Jean-Marc qui a été présent à tous nos concerts en région parisienne. Merci aussi à tout le groupe des bucois qui m'ont supporté quand je partais dans d'infinis monologues sur l'agriculture chimique/ agriculture biologique ou sur l'intérêt des OGM (je sais que je peux devenir lourd quand je pars sur ces sujets) : Yan et Lolo, Yohan, Minou, Fayçal, Flo, Fred, Marie, Thibeault et Ama Pap, les frères Fouf et bien d'autres encore. Merci aussi à tous les amis de l'association « La Kfet chez Yvette » que je ne citerai pas car il y en a trop et merci aussi à « Les Badauds » de m'avoir laissé squatter une table à moi tout seul en ne consommant qu'une ou deux bières entre 19h et minuit, mon brevet a été rédigé quasiment intégralement chez vous ainsi qu'une partie de ce manuscrit.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille, ma mère et mon père qui ont toujours été présents et m'ont toujours soutenu dans mes choix. Mes frères Adrien et Albin et ma sœur Chloé qui font partie intégrante de ma vie ainsi que leurs conjoints : Emma, merci de m'avoir corrigé mon CV avec lequel j'ai obtenu mon premier poste dans le cadre de ce projet, Lola, merci pour mes légumes du dimanche, et David, merci de t'occuper de ma sœur, moi je ne pourrais pas. Je remercie aussi mes grands-parents et oncles et tantes bien entendu, et pour finir merci encore à Adrien et Emma de m'avoir donné le bonheur d'être tonton de la petite Agathe au début de cette thèse.

Je dédie cette thèse à André Verly, mon grand-père qui, à ce qu'il parait, a toujours voulu avoir un chercheur dans sa famille.

Table des matières

Table des matières

Partie 1. Introduction
Préambule13
Chapitre 1. Etat de l'art 15
1.1 Les plantes et leurs interactions complexes avec l'environnement
1.2 Les plantes face aux agents pathogènes, mécanismes de reconnaissance et mise en place
des défenses16
1.3 NPR1 une protéine clé dans la signalisation des défenses
1.4 L'élicitation par les SDP et leur utilisation en protection des cultures
1.5 Effet de la fertilisation azotée sur le développement des maladies
1.6 Effet du stade de développement de la plante sur le développement des maladies 60
1.7 Objectifs de la thèse
Partie 2. Résultats 65
Chapitre 2. ELICITEST 65
2.1 Stratégie de conception des anticorps65
2.2 Conception des antipeptides anti NPR167
2.3 Tests de spécificité et de validité de l'anticorps68
2.4 Discussion
Chapitre 3. GUSTAVE
3.1 Principe du test
3.2 Validation de la réponse des plantes exprimant les constructions
3.3 Mise au point de la cinétique d'activation93
3.4 Spécificité de l'élicitation
3.5 Réponse à différents SDP et éliciteurs
3.6 Test de l'activité de potentialisation de différents SDP et éliciteurs
3.7 Test de cumulation des traitements SDP ou éliciteurs
3.8 Transfert de la technologie vers Staphyt101
3.9 Application à un cas concret102
3.10 Discussion
Chapitre 4. Impact de la nutrition azotée et du stade de développement des plantes sur
la réponse aux éliciteurs107
4.1 Impact physiologique de la nutrition azotée et du stade de développement des plantes en conditions contrôlées

4.2 Influence de la fertilisation en nitrates et des stades de développement sur la capacité des éliciteurs à induire l'expression des gènes de défense en conditions contrôlées
4.3 Influence de la fertilisation en nitrates et des stades de développement sur la capacité des éliciteurs à induire l'accumulation d'une protéine de défense en conditions contrôlées
4.4 Influence de l'apport en nitrate sur l'efficacité de protection des SDP en conditions contrôlées
4.5 Implication de la protéine clef NPR1 dans l'activité des éliciteurs en conditions contrôlées117
4.6 Influence de l'apport en nitrate sur l'efficacité de protection des SDP au champ
4.7 DISCUSSION
Partie 3. Matériel et méthodes 127
Chapitre 5. Matériel et méthodes pour mise au point de test immunologique127
5.1 Matériel végétal et conditions de culture127
5.2 Anticorps utilisés
5.3 Production des antipeptides129
5.4 Purification et concentration des antipeptides130
5.5 Extraction des protéines de plante130
5.6 Production de protéines recombinantes131
5.7 Immunoprécipitation (IP)133
5.8 Western blot (WB)134
Chapitre 6. Matériel et méthodes pour le test GUSTAVE135
6.1 Matériel végétal et conditions de culture135
6.2 Traitement des plantes135
6.3 Test d'activité GUS136
Chapitre 7. Matériel et méthodes pour l'étude de l'impact de développement et de la
fertilisation sur l'activation des défenses137
7.1 Matériel végétal et conditions de culture137
7.2 Dosage de l'azote et des acides aminés sur <i>A. thaliana</i>
7.3 Traitements d'A. thaliana avec des éliciteurs en conditions contrôlées
7.4 Traitements de blé et vigne par des éliciteurs en plein champ
7.5 Tests de sensibilité aux agents pathogènes139
7.6 Analyse de l'expression des gènes par q-RT-PCR141
Partie 4. Conclusion générales et perspectives143
Partie 5. Bibliographie149
Partie 6. Annexe

Annexe 1. Identification de NPR117	3
Annexe 2 Protocole GUSTAVE au format interne de Staphyt17	′5
Annexe 3 Tableau dynamique permettant de calculer le coût facturé de GUSTAVE en fonction du nombre de conditions	:2
Annexe 4 Devis type GUSTAVE au format interne de Staphyt	3
Annexe 5 Plan d'étude GUSTAVE au format interne de Staphyt18	;7
Annexe 6 Résultat d'étude GUSTAVE au format interne de Staphyt	0
Annexe 7 Envellope Soleau21	.5
Annexe 8 Brevet en cours de dépôt : Anticorps dirige contre la forme active de NPR1 et ses applications dans le cadre du developpement et de l'utilisation des stimulateurs de defense des plantes	21
Annexe 9 Publication en cours de préparation25	4

Partie 1. Introduction

Préambule

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif développé entre un partenaire industriel, l'entreprise Staphyt et un partenaire académique l'IJPB (UMR1318 INRA-AgroParisTech). Ce projet a été initié en février 2014 à l'aide d'un financement délivré par le LabEx SPS (Sciences des Plantes de Saclay) dans le cadre de la campagne SPS'Innov. Ces financements étaient alloués à des projets innovant, à risque, impliquant un partenaire académique et un partenaire privé.

Créé en 1989, le groupe Staphyt est leader de la prestation de services en Agrosciences en Europe. Cette entreprise, accompagne les professionnels de l'agrochimie et de l'amélioration des plantes dans la recherche, le développement et la mise sur le de marché de produits adaptés aux exigences de l'agriculture d'aujourd'hui et de demain. Staphyt est donc un spécialiste dans l'évaluation des produits de l'agrofourniture. La société était intéressée par la mise au point de méthodes d'évaluation de l'élicitation des mécanismes de défense des plantes pour la validation de l'efficacité de produits « Stimulateurs des Défenses naturelles des Plantes » (SDP).

Staphyt s'est donc tourné vers l'IJPB afin de monter ce projet collaboratif destiné à mettre au point ces tests. Le projet a impliqué deux équipes de l'IJPB, une équipe spécialisée dans les interactions plante / agent pathogène (équipe NPI) ; et la plateforme de Biochimie de l'observatoire du végétal (OV-Biochimie). Une des missions du LabEx SPS et de l'IJPB est de développer de la recherche translationnelle, ce projet rentrait en adéquation avec cette mission. Dans le cadre de cette thèse, des connaissances fondamentales sur les interactions plantes / microorganismes pathogènes ont pu être utilisées pour la mise au point d'outils de diagnostic terrain à destination des professionnels de l'agro-industrie.

J'ai donc été recruté, en tant qu'ingénieur d'étude, pendant un an sur le projet intitulé ELICITEST (SPS'Innov). Ce projet avait pour but de tester la faisabilité d'un test basé sur l'utilisation d'anticorps et qui permettrait de montrer l'activation des défenses naturelles des plantes par des Stimulateurs de Défense des Plantes (SDP) au niveau protéique. Le détail de la stratégie de ce test sera développé dans le chapitre 2 de cette thèse. Cette première année de contrat m'a permis d'amorcer le sujet et d'obtenir des résultats préliminaires suggérant que la stratégie d'obtention des anticorps conçue dans ce projet permettait de montrer l'activation des défenses naturelles au moins chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons donc décidé de poursuivre la collaboration entre Staphyt, l'IJPB et moi-même en soumettant un projet de thèse CIFRE. Nous avons alors décidé d'élargir le champ du

sujet de thèse en y rajoutant le développement d'un test *in-vitro* permettant de montrer l'activation des défenses par les SDP mais cette fois au niveau transcriptionnel (test GUSTAVE, développé dans le chapitre 3) et en y incluant l'étude de l'impact du stade de la plante et de la fertilisation azotée sur l'efficacité des SDP (chapitre 4).

Ce projet de thèse a été accepté et validé par l'ANRT (Agence Nationale de Recherche et Technologie) en octobre 2015 et j'ai donc commencé cette thèse en novembre 2015.

Chapitre 1. Etat de l'art

1.1 Les plantes et leurs interactions complexes avec l'environnement

Dans leur milieu naturel, les plantes sont impliquées dans un certain nombre d'interactions avec d'autres êtres vivants (interactions biotiques) ou avec leur environnement abiotique. Dans le cadre des interactions biotiques, les plantes peuvent établir des relations bénéfiques (telles que les symbioses mutualistes) ou délétères (telles que le parasitisme, la compétition) avec d'autres organismes. Ces autres organismes peuvent être des champignons, des bactéries, des virus, des nématodes, des insectes, des oiseaux, des mammifères ou d'autres plantes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons aux interactions biotiques avec les agents pathogènes microbiens et aux interactions abiotiques en focalisant sur la nutrition azotée.

Les microorganismes pathogènes (bactéries et champignons) peuvent se nourrir et se développer en utilisant différentes stratégies infectieuses. L'infection par un agent pathogène affaiblit la plante ce qui diminue la production de biomasse et impacte donc de manière négative le rendement.

Les agents pathogènes biotrophes infectent des tissus vivants et se nourrissent des composés présents dans la cellule. Les agents pathogènes biotrophes sont des parasites obligatoires, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas cultivables sur milieu artificiel et nécessitent leur plante hôte pour se développer et se multiplier. Ces microorganismes ont souvent un spectre d'hôte réduit à quelques espèces de plantes hôtes. Pour exemple, les rouilles et l'oïdium sont des champignons biotrophes (Dracatos et al., 2018).

Les agents pathogènes nécrotrophes, quant à eux, sont des microorganismes qui ont besoin de tissus morts pour mettre en place leur processus infectieux et se nourrissent de ces tissus morts. Ces agents pathogènes vont d'abord provoquer la mort des tissus au niveau du site d'infection à l'aide de toxines ou d'enzyme de dégradation des parois avant de les coloniser. Une fois dans la plante, l'agent pathogène nécrotrophe se développe en provoquant la mort des cellules adjacentes avant de les coloniser. Les organismes nécrotrophes possèdent souvent un large spectre d'hôtes. Les symptômes qu'ils induisent peuvent être du type nécrose ou macération (pourriture molle). Le champignon responsable de la pourriture grise, *Botrytis cinerea* (Williamson et al., 2007) et la bactérie responsable de la pourriture molle *Dickeya dadantii* sont des agents pathogènes nécrotrophes (Kieu et al., 2012; Reverchon and Nasser, 2013).

Les agents pathogènes hémibiotrophes adoptent un processus infectieux intermédiaire. Ils infectent des tissus vivants en commençant avec une phase biotrophe, puis ils modifient leur stratégie de colonisation en passant à une phase nécrotrophe et provoquent la mort des cellules adjacentes au

site d'infection avant de les coloniser. Les champignons *Colletotrichum graminicola* et *Zymoseptoria tritici* sont des agents pathogènes hémibiotrophes (Denancé et al., 2013; Münch et al., 2008).

Les insectes piqueurs parasitent les plantes en les piquants dans leur système vasculaire et prélèvent la sève élaborée pour se nourrir. Cela provoque un déficit énergétique pour la plante qui est alors affaiblie et son développement ralenti, ce qui impacte sa productivité. Les insectes piqueurs peuvent aussi être des vecteurs transportant des bactéries ou des virus. Dans ce cas, la piqûre induit une infection de la plante par la bactérie ou le virus, ce qui augmente l'impact négatif sur le développement de la plante. De plus, même si aucun agent pathogène n'est transporté par l'insecte, la piqûre résultant de l'attaque est une porte ouverte pour l'infection par des microorganismes pathogènes.

Entre les plantes et leurs agents pathogènes deux types d'interactions peuvent s'établir ; les interactions compatibles ou les interactions incompatibles. Les interactions compatibles sont des interactions où l'agent pathogène est capable d'infecter une plante. A l'inverse, une interaction incompatible est une interaction où l'agent pathogène n'est pas capable d'infecter la plante. Ceci peut être dû à une incompatibilité de type résistance non hôte. Dans ce cas, tous les génotypes d'une espèce sont résistants à tous les génotypes de l'agent pathogène. L'autre type d'incompatibilité peut être dû à une reconnaissance race spécifique. Dans ce cas, certains génotypes de plante peuvent reconnaître spécifiquement certains génotypes de l'agent pathogène. Cette reconnaissance est basée sur la présence d'un gène de résistance chez l'hôte qui perçoit des protéines appelées « effecteurs » chez le génotype de l'agent pathogène considéré. En l'absence de ce gène de résistance particulier, ou de l'effecteur spécifique, la maladie se développe.

1.2 Les plantes face aux agents pathogènes, mécanismes de reconnaissance et mise en place des défenses

Les processus de défense incluent 3 grandes étapes : 1) reconnaissance, 2) signalisation, 3) exécution.

Après la perception d'un stress, le système de défense végétal déclenche un large éventail de mécanismes pour orchestrer la reprogrammation transcriptionnelle nécessaire à l'adaptation et à la survie de la plante. La reconnaissance et la signalisation seront décrites dans les paragraphes cidessous. Les processus de défense liés à l'exécution consistent en la mise en place de barrières physiques et chimiques agissant directement sur le processus infectieux. Elles incluent l'accumulation de composés antimicrobiens. Les phytoalexines sont des métabolites secondaires à activité antimicrobienne. Ces composés peuvent être présents de manière constitutive ; dans ce cas on les appelle phytoanticipines. Les protéines appelées « Pathogenesis Related » (PR) protéines sont des protéines à activité antimicrobienne ubiquitaires chez les plantes. Elles sont accumulées suite à la perception d'un stress biotique. Leur expression est contrôlée par les hormones de défense (voir cidessous). De plus les plantes accumulent des espèces réactives de l'oxygène ou Reactive Oxygen Species (ROS). Chez *A. thaliana* cette production de ROS implique essentiellement l'expression du gène *AtRbohD*. Suite à un stress biotique, plusieurs barrières physiques sont mises en place dont l'accumulation de callose et le renforcement de la paroi par la formation de ponts entre les protéines riches en hydroxyproline. Tous ces processus sont activés d'autant plus rapidement que le système de perception et de signalisation de la plante est efficace (Jones and Dangl, 2006).

1.2.1 Les acteurs de la reconnaissance des agents pathogènes

1.2.1.1 La notion d'éliciteurs

Les organismes eucaryotes pluricellulaires ont mis en place des mécanismes permettant de détecter diverses formes de danger, notamment l'attaque d'agents pathogènes microbiens et de divers organismes nuisibles (perception du « non-soi »), mais aussi les dommages causés aux tissus et aux cellules par les stress environnementaux (perception du « soi »). Cette reconnaissance du danger se fait par l'intermédiaire des composés libérés à partir de la plante hôte ou d'organismes exogènes, au niveau du site d'infection. Ces composés appelés éliciteurs sont reconnus par la plante pour stimuler la mise en place de mécanismes de défense de manière locale ou systémique (Henry et al., 2012).

On appelle éliciteur tout composé capable d'induire des réactions de défense chez la plante conduisant à une protection face à un stress biotique ou abiotique (Benhamou and Rey, 2012) (Figure 1).

Les composés éliciteurs peuvent être d'origine biologique, dérivés de la plante ou d'un microbe, ou alors obtenus par synthèse chimique. A ce jour, peu d'éliciteurs de synthèse sont reportés mis à part les analogues synthétiques de molécules de signalisation hormonale ou de défense connues telles que Bion[®], l'acibenzolar-S-méthyle (ASM), l'acide bêta-aminobutyrique (BABA) et la cis-jasmone. La plupart des éliciteurs décrits sont d'origine biologique et proviennent soit de l'hôte soit de l'agent pathogène. Des composants de la paroi cellulaire végétale tels que les oligogalacturonides (Ferrari, 2013), des composants de l'enveloppe bactérienne tels que les lipopolysaccharides (Erbs and Newman, 2012), des protéines d'origine microbienne telles que la flagelline bactérienne (Gomez-Gomez et Boller, 2002) ou l'élicitine dérivée d'un oomycète (Hein et al., 2009) sont des éliciteurs.



Figure 1 : Différentes familles d'éliciteurs (Benhamou and Rey, 2012). Il existe différentes familles d'éliciteurs : les éliciteurs biotiques et les éliciteurs abiotiques le éliciteurs abiotiques sont capables d'induire une réponse aux stress abiotiques alors que les éliciteurs biotiques vont induire une réponse aux stress biotiques. Dans les éliciteurs biotiques on inclue des éliciteurs exogènes correspondant aux MAMPs et des éliciteurs exogènes correspondant aux DAMPs.

A la différence des vertébrés supérieurs déclenchant *in fine* une réponse immunitaire adaptative, les plantes s'appuient uniquement sur le système immunitaire inné pour limiter la pénétration et la prolifération des agents pathogènes. La reconnaissance d'une menace potentiellement pathogène est essentielle pour la mise en place de réponses immunitaires efficaces.

1.2.1.1 Les éliciteurs conservés de défenses des plantes

Les plantes sont capables de détecter la présence d'un agent pathogène par l'intermédiaire de motifs moléculaires microbiens conservés appelés Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMP) (Medzhitov and Janeway, 1997).

Autrefois décrits comme des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMPs), le terme de Motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs) s'est révélé plus approprié puisqu'il s'agit de motifs hautement conservés chez les microbes et ne sont pas exclusivement limités aux agents pathogènes car également présents chez les microorganismes mutualistes (Boller and Felix, 2009). Plus récemment, des motifs associés aux dommages d'herbivores (Herbivory-Associated Molecular Patterns, HAMPs) ou de nématodes (Nematode-Associated Molecular Patterns, NAMPs) ont été rapportés (Manosalva et al., 2015; Mithofer and Boland, 2008). Les plantes portent des récepteurs appelés Pattern Recognition Receptors (PRR) capables de reconnaître ces molécules (Zipfel, 2008; Zipfel and Felix, 2005). Les PRR sont situés au niveau de la membrane plasmique. Les PRR activent une ou plusieurs voies de signalisation, souvent à l'aide de corécepteurs, pour induire des réponses de défense en aval. Différents PRR sont capables de reconnaître des motifs précis retrouvés dans différents MAMPs (Figure 2). Toutes ces molécules MAMP, HAMP et NAMP induisent un niveau de défense basale à large spectre appelé Pattern Triggerd Immunity (PTI) chez un grand nombre de plantes (Chisholm et al., 2006; Nurnberger et al., 2004). Ce type de défense sera développé plus en détail dans le paragraphe 1.2.2. Différents exemples de DAMP, MAMP, HAMP et NAMP sont décrit plus en détails dans les paragraphes ci-dessous.



Figure 2 : Représentation schématique de différents PRR de plantes et des MAMP qu'ils reconnaissent (Zipfel, 2008). Les flagelines bactériennes (flg22) et EF-Tu (elf18) sont reconnues respectivement par les LRR-RLKs FLS2 et EFR. Les orthologues de FLS2 ont été clonés et caractérisés chez la tomate et *N. benthamiana*. Dans la tomate, la xylanase est reconnue par les RLP LeEIX1 et LeEIX2. Le site de forte affinité de la chitine dans le riz correspond à CEBiP, une protéine transmembranaire avec deux domaines LysM extracellulaires. Chez les légumineuses, la protéine de liaison au glucane soluble (GBP) lie directement l' Heptaglucane d'oomycètes.

Damage Associated Molecular Patterns

Des défenses végétales peuvent être activées par la perception de molécules issues de la plante hôte lorsque les cellules sont endommagées, véritable signaux de danger endogènes. Il s'agit de motifs moléculaires associés aux dommages (Damaged-associated Molecular Patterns, DAMPs) (Matzinger, 2007). Ces DAMPs permettent une reconnaissance de perturbations tissulaires ou de blessures afin d'initier les processus visant la régulation des défenses, de l'homéostasie cellulaire ou

de la restauration des parois (Gust et al., 2017). Parmi les produits de dégradation de la paroi pectocellulosique, les fragments de pectine appelés oligogalacturonides peuvent activer les défenses de la plante (Ferrari, 2013). Des protéines appelées AtPEP chez *A. thaliana* sont maturées par protéolyse suite à une infection et les produits de clivage de ces peptides constituent des DAMPs qui sont reconnus par des récepteur PRR spécifiques (Flury et al., 2013).

Microbe Associated Molecular Patterns bactériens

La flagelline bactérienne est un des motifs MAMPs les plus étudiés (Felix et al., 1999). Ce MAMP est également reconnu par les systèmes immunitaires des animaux (Gómez-Gómez and Boller, 2002). Constituant du flagelle bactérien, la flagelline est une protéine essentielle pour les bactéries mobiles (Naito et al., 2008) dont les parties N- et C-terminales sont hautement conservées. Une séquence conservée de 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la flagelline de *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst DC3000) s'est avérée suffisante pour déclencher une PTI chez les plantes (Felix et al., 1999; Smith et al., 2003). Cet épitope appelé flg22 est perçu par la plupart des espèces de plantes par le biais du récepteur PRR spécifique nommé FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) (Chinchilla et al., 2007; Gómez-Gómez et al., 1999). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'application de flg22 conduit à un effet de mise en alerte de la plante en la rendant plus résistante aux infections ultérieures par Pst DC3000 (Zipfel et al., 2006).

Parmi les protéines MAMPs, le facteur d'élongation thermo instable (EF-Tu) est une molécule abondante, essentielle et très conservée avec 90% d'homologie de séquence entre des centaines d'espèces bactériennes (Jeppesen et al., 2005). EF-Tu présente un épitope hautement conservé elf18, contenant les 18 premiers acides aminés de la protéine, reconnu chez les Brassicacées via le PRR EF-Tu RECEPTOR (EFR) (Kunze, 2004; Zipfel et al., 2006). Pour la reconnaissance de la flagelline comme de l'EF-Tu, la liaison du ligand au récepteur conduit à une hétérodimérisation avec la protéine BRI1-Associated receptor Kinase 1 BAK1, nécessaire pour la signalisation de défense en aval (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007; Segonzac and Zipfel, 2011).

D'autres motifs MAMPs non protéiniques tels que le peptidoglycane (PGN), les β-glucanes et les lipopolysaccharides (LPS) ont été identifiés comme des éliciteurs de l'immunité (PTI) dans diverses études (Erbs et al., 2008, 201; Gust et al., 2017; Zipfel, 2014).

Les peptidoglycanes sont des éléments constitutifs de la paroi cellulaire bactérienne et apportent une rigidité à la cellule. Le traitement de plantes avec des peptidoglycanes (PGN), qui

partagent des similitudes structurelles avec la chitine des champignons, entraîne l'activation des réponses de défense (Erbs et al., 2008).

MAMPs fongiques

De la même façon que pour les MAMPs bactériens, les plantes portent des PRR qui détectent des structures conservées spécifiques des champignons. Les éliciteurs fongiques les plus connus sont la chitine (et son dérivé le chitosan), et l'ergostérol, composants de la paroi cellulaire et de la membrane, qui constituent des éléments structurels importants des champignons (Granado et al., 1995; Klemptner et al., 2014). Parmi les MAMPs fongiques se retrouvent également les enzymes comme les endo-polygalacturonases et les pectinases, sécrétées par de nombreux champignons et capables de détruire la paroi cellulaire de la plante, (Zhang et al., 2014).

La chitine est l'un des MAMPs fongiques les mieux étudiés. La chitine est un polymère de Nacétylglucosamine (GlcNAc ou GNA) qui est reconnu à la fois par le système immunitaire des plantes et celui des animaux (Nurnberger et al., 2004). Les cellules végétales perçoivent les fragments de chitine (chito-oligosaccharides) de différents niveaux de polymérisation via des récepteurs spécifiques à motifs de lysine (LysM) tels que le récepteur CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1) (Miya et al., 2007) ou CEBiP (Chitin oligosaccharide Elicitor Binding Protein) (Kaku et al., 2006).

Le chitosan, un dérivé de la chitine désacétylée, se comporte comme un éliciteur. Les polymères de chitine et leur forme modifiée, le chitosan, induisent des réponses de défense de l'hôte chez les monocotylédones et les dicotylédones (Shibuya and Minami, 2001). La réponse des plantes à la chitine, au chitosan et aux oligosaccharides dérivés dépend du degré d'acétylation de ces composés (Pusztahelyi, 2018).

Herbivory Associated Molecular Patterns

Les herbivores ne sont pas classés comme des microbes et leurs motifs moléculaires de reconnaissance sont appelés motifs moléculaires associés aux herbivores (HAMP). Outre leurs dommages directs engendrés pour s'alimenter, les herbivores sont souvent des vecteurs permettant la propagation de virus entre les plantes. Ainsi, la perception des herbivores se fait à deux niveaux soit par les HAMPs présents dans les sécrétions orales, la salive et les liquides de ponte de l'herbivore, et/ou par la perception des dommages causés par l'herbivore via la perception de lésions spécifiques associées aux dommages.

Certains HAMPs associés à des dommages provenant d'insectes ont été identifiés dont les principaux sont des conjugués d'acides gras (par exemple, la volicitine qui est un molécule de

glutamine conjuguée à un dérivé hydroxylé de l'acide linoléique), des caéliférines, des bruchines, les peptides dérivés de plantes nommés inceptines (produits de dégradation) et des enzymes salivaires telles que la β-glucosidase, glucose oxydase (GOX) et diverses ATPases (Acevedo et al., 2015; Schmelz, 2015).

Nematode Associated Molecular Patterns

Plusieurs études indiquaient que les plantes pouvaient percevoir une infection par les nématodes via des récepteurs PRR (Lozano-Torres et al., 2012), mais ce n'est que récemment que le premier éliciteur spécifique aux nématodes (NAMP), un ascaroside (glycolipide) majeur chez les nématodes phytoparasites à cystes et à galles, a été décrit comme un puissant éliciteur chez plusieurs espèces végétales (Manosalva et al., 2015). Les ascarosides sont une famille de phéromones de nématodes à conservation évolutive dont l'ascaroside Ascr#18 identifié comme NAMP induit une réponse immunitaire ainsi qu'une résistance accrue aux agents pathogènes viraux, bactériens, fongiques, oomycètes et aux nématodes à galles chez plusieurs espèces de plantes dicotylédones et monocotylédones (Choi and Klessig, 2016).

1.2.1.2 Des éliciteurs spécifiques : les effecteurs microbiens

Les agents pathogènes efficaces peuvent éviter ou bloquer la reconnaissance de l'hôte en sécrétant des protéines appelées « effecteurs » capables de «masquer» les motifs microbiens ou d'inhiber la signalisation induite par les récepteurs PRR. Les plantes hôtes ont développé des récepteurs capables de détecter ces effecteurs et d'induire un niveau de résistance spécifique vis-à-vis de l'agent pathogène impliqué appelé Effector Triggered Immunity (ETI) (Garcia-Brugger et al., 2006) (Figure 3). Les effecteurs sont le plus souvent des protéines secrétées par les microorganismes pathogènes. Ils sont injectés dans le cytoplasme de la cellule végétale ou bien libérés dans l'apoplasme au cours de l'infection. Ils favorisent le processus infectieux entre autre en supprimant la reconnaissance des MAMP. Les structures protéiques et les fonctions biochimiques des effecteurs sont extrêmement diversifiées. Certains effecteurs inhibent la phosphorylation de PRR. Ainsi, l'effecteur AvrPtoB secrété par la bactérie pathogène FLS2 (Göhre et al., 2008). D'autres effecteurs inhibent des fonctions de défense. Ainsi, l'effecteur Avr2 secrété par le champignon *Cladosporium fulvum* inhibe l'activité d'une protéase située dans l'apoplasme des tomates (Shabab et al., 2008).



Figure 3: *Les éliciteurs peuvent être classés en deux catégories* (Henry et al., 2012). A : Les éliciteurs généraux (peu spécifiques) agissent de manière différente selon les cultivars au sein d'une espèce de plante et sont impliqués dans l'immunité innée primaire. Ils comprennent les produits phytopharmaceutiques, les profils moléculaires associés aux microbes (MAMPs) issus de micro-organismes, les profils moléculaires associés aux dommages (DAMPs) issus des surfaces de plante suite à l'action de l'envahisseur et les profils moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) issus de micro-organismes pathogènes. Même si la perception des éliciteurs est généralement récepteur-dépendante, très peu de sites de liaison ont été caractérisés à ce jour; B : Les éliciteurs spécifiques (ou effecteurs) sont produits par des agents pathogènes spécialisés et agissent uniquement chez les cultivars de plantes possédant le gène de résistance à la maladie correspondant. Les effecteurs conduisent typiquement à l'immunité innée secondaire après une perception via une protéine de résistance.

Les effecteurs sont, en contraste avec la plupart des MAMP, non essentiels à la survie microbienne et peuvent présenter des formes variées permettant à l'agent pathogène d'échapper à l'ETI ou de supprimer plus efficacement la PTI (Hein et al., 2009; Jones and Dangl, 2006).

1.2.1.4 Les récepteurs des éliciteurs

Au vu des nombreux signaux émis dans l'apoplaste ou à l'intérieur des cellules végétales, la caractérisation des récepteurs de ces différents ligands est cruciale afin de mieux appréhender la signalisation engendrée après la reconnaissance de ces dangers par leurs motifs moléculaires à l'aide des PRR. Les récepteurs PRR sont des composants clés de l'immunité innée des plantes mais régulent également la croissance et le développement des plantes, la symbiose ou encore la tolérance aux stress abiotiques (Araya et al., 2014; Breiden and Simon, 2016). Situés dans la membrane plasmique, ces récepteurs perçoivent la présence de MAMPs ou de DAMPs et génèrent des signaux intracellulaires (Macho and Zipfel, 2014; Zipfel, 2014). Les récepteurs PRR comportent des récepteurs de type protéine kinases (RLK, *Receptor-like kinases*) et des récepteurs de type protéique (RLP, *Receptor-like proteins*). Les RLKs contiennent un domaine extracellulaire (ectodomaine), un domaine d'ancrage membranaire

(transmembranaire), un domaine protéine kinase intracellulaire alors que les RLPs sont dépourvus du domaine cytoplasmique kinase (Greeff et al., 2012; Zipfel, 2014).

Les PRR peuvent être classés en différentes sous-familles selon leur domaine extracellulaire : les répétitions riches en leucine (LRR, *Leucine-Rich Repeat*), le motif lysine (LysM), le motif lectine et le motif de type facteur de croissance épidermique (EGF). Tous les PRRs connus contenant des LRR, y compris les LRR-RK et les LRR-RP, perçoivent des éliciteurs de nature peptidique (Couto and Zipfel, 2016). Les LRR-RLK forment le plus grand sous-groupe de RLKs chez *A. thaliana* et sont des récepteurs typiques des ligands peptidiques. Par exemple, les peptides MAMPs flg22 (flagelline) et elf18 (EF-Tu) mais aussi des peptides DAMPs comme les PEPs sont reconnus respectivement via les récepteurs LRR-RLK FLS2 (Chinchilla et al., 2007), EFR (Zipfel et al., 2006) et PEPRs (Yamaguchi et al., 2010; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

Chez A. thaliana, 610 RLK et 56 RLP ont été identifiés (Fritz-Laylin, 2005; Shiu and Bleecker, 2001). Un grand nombre de gènes codent pour les RLK et les RLP et leur expression est induite suite à un traitement par un MAMP, illustrant la grande diversité de tels systèmes de perception et suggérant leur rôle potentiel dans la défense (Zipfel et al., 2006).

Les RLPs sont dépourvus du domaine cytoplasmique kinase nécessitant donc l'assemblage avec un corécepteur pour induire le signal intracellulaire (Zipfel, 2014). Chez *A. thaliana*, il a été démontré que LRR-RLP23 se lie et reconnaît spécifiquement les protéines NLPs à partir d'un motif peptidique de 20 acides aminés (nlp20) conservé parmi divers groupes de microbes, y compris les bactéries, les champignons et les oomycètes (Albert et al., 2015).

Les récepteurs LysM-RLP et LysM-RLK représentent une classe majeure de récepteurs des glycanes microbiens contenant de la N-acétylglucosamine (NAG), y compris la chitine fongique et le peptidoglycane bactérien (PGN), pour activer les défenses mais également pour induire des symbioses par la reconnaissance des lipochitooligosaccharides (LCO) dérivés de champignons mycorhiziens ou de bactéries de la famille des Rhizobias (Gust et al., 2012).

Les récepteurs RLKs à domaine lectine sont particulièrement importants pour la résistance des plantes aux maladies des plantes avec des récepteurs impliqués dans la perception de DAMPs, comme la lectine RLK DORN1 qui détecte l'eATP (ATP extracellulaire) (Choi et al., 2014) ou de MAMPs comme la lectine RLK LORE qui détecte la partie lipidique des lipopolysaccharides (LPS) bactériens (Ranf et al., 2015).

Des avancées récentes ont permis de démontrer que d'une manière générale, les PRR s'associent à d'autres RLKs et agissent dans le cadre de complexes immuns multi-protéiques à la

surface des cellules. L'exemple le mieux caractérisé est le recrutement de BAK1 dans de multiples complexes impliquant des PRRs de la classe des LRR-RLK après liaison avec leurs ligands. BAK1 est un membre de la famille SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinases*) qui forme des complexes hétéromériques dépendants du ligand avec plusieurs récepteurs MAMPs et DAMPs, tels que FLS2, EFR, AtPEPR1 et AtPEPR2(Chinchilla et al., 2007; Roux et al., 2011; Yamada et al., 2016).

Certains génotypes de plantes hôtes sont capables de percevoir des effecteurs microbiens. Cette reconnaissance conduit généralement à un arrêt de l'infection qui peut être associé à une réponse hypersensible ou « hypersensitive response » (HR). La HR consiste en la mort des cellules en contact avec le bioagresseur. La perception des effecteurs requiert des systèmes très diversifiés reposant sur des gènes de résistance spécifiques codant des protéines de résistance spécifiques. Le processus de reconnaissance et de résistance déclenché en aval de la perception des effecteurs est appelé « Effector triggered immunity » (ETI). Plusieurs mécanismes moléculaires différents permettent de reconnaître les effecteurs. La reconnaissance peut avoir lieu par reconnaissance directe impliquant une interaction physique entre l'effecteur et la protéine de résistance ou alors une reconnaissance indirecte. La reconnaissance indirecte implique la perception par la protéine de résistance, de la modification par l'effecteur d'une protéine endogène appelée « cible ». La plupart des protéines de résistance identifiées à l'heure actuelle contiennent des domaines conservés : un domaine de fixation d'un nucléotide (Nucleotide binding site, NB) et un domaine de répétition de leucines LRR (Leucine rich repeat). Ces protéines sont regroupées sous le terme de NLR, (Nucleotide-binding/Leucine-rich-repeat Receptor). Les protéines RPM1 et RPS2 d'A. thaliana sont des protéines à domaine NB-LRR qui confèrent une résistance aux bactéries P. syringae pv. tomato secrétant les effecteurs AvrRpm1 et AvrRpt2 respectivement (Andersson et al., 2006). RPM1 perçoit la phosphorylation d'une protéine cible appelée RIN4 ; et RPS2 perçoit le clivage de RIN4. Ainsi, ces deux protéines de résistance sont impliquées dans la perception de modifications survenant sur la protéine cible RIN4. Suite à la perception de ces modifications, l'ETI est déclenchée.

Chez la tomate, les LRR-RLP Cf-2, Cf-4 et Cf-9 confèrent une résistance à *Cladosporium fulvum* en reconnaissant respectivement les effecteurs apoplastiques Avr2, Avr4 et Avr9 de l'agent pathogène fongique (Dixon et al., 1996; Kruger, 2002).

1.2.2 Différents types de réponses immunitaires, la PTI/ETI

La nature des motifs moléculaires (éliciteurs) et des récepteurs cellulaires (extra- ou intracellulaires) conditionne la spécificité du mécanisme de reconnaissance conduisant à deux niveaux de résistance induite du système immunitaire inné (Muthamilarasan and Prasad, 2013) : une résistance

« basale » à large spectre (PTI) et une résistance plus forte et plus spécifique (ETI). Ces différents niveaux d'immunité seraient la conséquence de la coévolution des plantes et de leurs agresseurs (modèle zigzag proposé par Jones et Dangl, 2006).

Le premier niveau d'immunité est déclenché par la reconnaissance de molécules exogènes avec des motifs microbiens spécifiques (MAMPs) mais également de certains motifs endogènes (DAMPs) reconnus au niveau de la membrane plasmique par les récepteurs membranaires de type PRR. La perception de ces motifs conduit à l'activation de l'immunité déclenchée par un motif MAMP ou PTI (*Pattern Triggered Immunity*) (Chinchilla, 2006; Krol et al., 2010; Macho and Zipfel, 2014; Zipfel et al., 2006) , généralement considérée comme une résistance peu intense mais à large spectre afin de limiter l'invasion (Jones and Dangl, 2006). Cette première forme de résistance inclut des réponses de défense directes telles que la production de composés antimicrobiens, de molécules répulsives et de composés organiques volatils (COV), mais également le renforcement de la paroi cellulaire (Boller and Felix, 2009).

Malgré l'activation de la PTI, l'interaction entre la plante et l'agresseur peut être compatible et suivie par une prolifération de l'agent pathogène si les défenses mises en place sont inappropriées, pas assez rapides ou « inactivées ». En effet, certains agents pathogènes adaptés à leur(s) hôte(s) ont développé des effecteurs spécialisés leur permettant d'interférer avec les voies de défense pour supprimer la PTI et coloniser les tissus (Deslandes and Rivas, 2012; Franceschetti et al., 2017; Karasov et al., 2014). On parle alors de sensibilité liée aux effecteurs ou ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*).

Cependant, à leur tour, les plantes ont développé des récepteurs immunitaires capables de détecter directement ou indirectement les effecteurs de l'agent pathogène (Cui et al., 2015) déclenchant l'ETI (Garcia-Brugger et al., 2006) (Figure 4).

Ce deuxième niveau de résistance est décrite dans le modèle de résistance « gène pour gène ». En effet, l'ETI est activée lorsque les protéines de résistance (R) codées par la plante, qui sont généralement situés dans la cellule végétale, reconnaissent directement ou indirectement l'effecteur de l'agent pathogène introduit dans l'hôte. Cette forme de résistance génétiquement déterminée a été proposé par Harold Henry Flor (Flor, 1971).

Un autre modèle appelé « hypothèse de garde » a été proposé, impliquant l'intervention d'une troisième composante dans cette interaction dans lequel la protéine Avr/effecteur et la protéine R feraient partie d'un complexe incluant une protéine cible sur laquelle la protéine de résistance monte la garde (Bergelson et al, 2001; Luderer et al, 2001; Van der Hoorn et al, 2002).



Figure 4 : Modèle de l'évolution de la résistance aux agents pathogènes chez les plantes. A : En cas d'attaque par un agent pathogène, les MAMP activent les récepteurs PRR chez l'hôte, ce qui entraîne une cascade de signalisation en aval conduisant à la PTI. B : Les agents pathogènes virulents ont acquis des effecteurs (étoiles pourpres) qui suppriment la PTI, entraînant l'ETS. C : À leur tour, les plantes ont acquis des protéines de résistance (R) qui reconnaissent ces effecteurs spécifiques de l'attaquant, ce qui entraîne une réponse immunitaire secondaire l'ETI.

La coévolution de l'hôte et de l'agent pathogène conduit à une succession dynamique entre PTI, ETS et ETI qui a été décrite dans le "modèle en zigzag" comme une sorte de course aux armements des plantes et de leurs agents pathogènes (Jones and Dangl, 2006). Vu dans un contexte évolutif, les agents pathogènes sont sélectionnés en fonction de la perception du système immunitaire de la plante et inversement, le système immunitaire de la plante est sélectionné pour la perception des agents pathogènes envahissants.

Au niveau fonctionnel, l'ETI rétablit et amplifie les programmes de transcription basale et les défenses antimicrobiennes de la PTI et est souvent associé à une mort cellulaire programmée localisée au niveau des tissus infectés : la réponse hypersensible (HR) (Mur et al., 2008). La HR est une réaction apoptotique rapide dans les cellules infectées et à proximité, qui permet de supprimer la disponibilité des nutriments pour les agents pathogènes, bloquant ainsi efficacement la propagation d'agents pathogènes biotrophes (Mengiste, 2012a). En plus de l'inhibition directe de l'agent phytopathogène ou de son confinement au site d'infection, la HR permet de libérer des signaux conditionnant les cellules adjacentes à devenir plus réactives et d'activer des réponses de défense plus étendues (Kombrink et al., 2001). De plus, les réactions de résistance locales induisent une immunité systémique à long terme (résistance acquise systémique), qui prépare les tissus non infectés à une attaque ultérieure d'agents pathogènes (Fu and Dong, 2013).

Les limites du modèle ETI / PTI ont fait naître l'idée que le système immunitaire de la plante est un moyen général de faire face à une invasion ou à un danger, vision globale et caractéristique générale de l'immunité chez les eucaryotes supérieurs. L'ETI déclenchant les réponses de défense très rapidement et avec une forte amplitude ; la PTI déclenchant des réponses similaires mais plus tardivement et avec une amplitude modérée.

Des expériences de méta-analyse transcriptionnelle effectuées sous différents traitements de stress abiotiques et biotiques ont révélé un nombre important de gènes communs régulés lors de ces stress (Ma and Bohnert, 2007). Les principaux composants du réseau de signalisation contrôlant l'adaptation aux stress abiotique et biotique incluent les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les phytohormones, les modifications du statut redox, les protéines kinases (MAPK) et les flux d'ions inorganiques (calcium), le trafic vésiculaire et l'apoptose (Kissoudis et al., 2014). Ces composants communs entre la signalisation des stress abiotique et biotique, indiquent l'existence d'une interconnexion voire d'une convergence des mécanismes de réponse aux stress (Walley and Dehesh, 2010). En effet, de nombreux exemples montrent que l'application exogène de produits chimiques tels que l'acide β -aminobutyrique (β -ABA), le SA (SA) ou l'acide jasmonique (JA) accroît la résistance globale à divers stress d'ordre environnementaux ou infectieux (Khan et al., 2015; R Khan and A Khan, 2013; Walia et al., 2007).

1.2.3 L'activation des différentes défenses, le rôle des phytohormones

Chez les plantes, les mécanismes de réponse aux stress nécessitent l'activation intracellulaire et la concertation de plusieurs voies de signalisation. La complexité de ces interactions nécessite des régulateurs afin d'adapter et de prioriser les réponses en fonction des signaux perçus. Les phytohormones sont les principaux régulateurs de la croissance et du développement des plantes, ainsi que les médiateurs des réponses aux stress environnementaux (Sreenivasulu et al., 2012). Ainsi, les phytohormones sont des facteurs endogènes clés dans la médiation de la réponse aux stress des plantes en permettant l'élaboration d'une réponse sophistiquée et efficace (Verma et al., 2016). Les phytohormones sont ainsi considérées comme des signaux secondaires pouvant intégrer et faire le lien entre les événements précoces de signalisation et l'activation finale des réponses de défense (Pieterse, 2012).

Les principales hormones végétales connues pour jouer un rôle majeur dans les réponses de défense des plantes contre les agents pathogènes et les stress abiotiques sont l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) (Bari and Jones, 2009). L'acide abscissique (ABA) est le régulateur central coordonnant la résistance aux stress abiotiques chez les plantes (Finkelstein, 2013) tels que la sécheresse, la salinité, le froid, le stress thermique et les blessures, y compris celles liées aux herbivores (Zhang et al., 2006). En revanche, SA, JA et ET jouent

un rôle majeur dans la réponse aux stress biotiques en fonction de leur concentration et de leur accumulation suite à l'infection par un agent pathogène (Bari and Jones, 2009). La réponse aux stress biotiques médiée par les hormones dépend du mode de nutrition des bioagresseurs. Selon ce concept, la voie du SA est généralement impliquée dans la défense contre les agents pathogènes biotrophes et hémi-biotrophes, alors que celle impliquant JA est responsable de la défense contre les agents pathogènes nécrotrophes et les insectes herbivores (Glazebrook, 2005). Cependant, de nouveaux éléments suggèrent une interrelation plus complexe entre les différentes classes d'hormones à l'origine de la modulation de la résistance, sans pour autant dépendre du mode de vie des agents pathogènes (Kazan and Lyons, 2014; Mur, 2005; Robert-Seilaniantz et al., 2011).

De nombreuses études montrent que la reconnaissance d'un bioagresseur entraîne l'accumulation d'acide salicylique (SA) et/ou d'acide jasmonique (JA) et ses dérivés au site d'infection mais aussi de manière systémique (Bari and Jones, 2009; Loake and Grant, 2007), qui jouent un rôle majeur dans l'activation des réponses de défense en aval. En effet, ces phytohormones interviennent dans la mise en place de la résistance dans l'ensemble de la plante, via la résistance systémique acquise (SAR) pour le SA (Delaney et al., 1994; Mauch-Mani, 1998) ou la résistance systémique induite (ISR) pour le JA (Verhagen et al., 2004).

1.2.3.1 La voie de défense dépendante du SA

1.2.3.1.1 Voie de biosynthèse du SA

L'acide salicylique est un composé organique aromatique. Il est formé à partir de dérivés de la voie du shikimate qui conduit à la production d'acides aminés aromatiques (Tyrosine, Tryptophane et Phénylalanine) à partir de chorismate. Le chorismate produit dans cette voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques peut être transformé en isochorismate à l'aide de l'isochorismate synthase (ICS). Cet isochorismate est ensuite transformé en SA grâce à l'action de la pyruvate lyase. Dans le contexte de stress biotiques, e SA est principalement formé par l'intermédiaire de cette voie. Le mutant *sid2* d'*A. thaliana*, affecté dans l'enzyme l'isochorismate synthase ne produit que peu de SA (Wildermuth et al., 2001), mais la présence de SA résiduel a suggéré que cette hormone pouvait être synthétisée par une autre voie. Ainsi, il a été montré que le SA pouvait aussi être formé, en moins grande quantité à partir de la phénylalanine et de l'action de la phénylalanine amonia lyase et de la Benzoic acid 2-hydroxylase (Garcion et al., 2008) (Figure 5).



Figure 5 : Représentation simplifiée des voies de biosynthèse du SA. Les enzymes responsables des transformations sont indiquées en bleu; des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la production de SA sont mentionnés en rouge. Le mutant *sid2* est affecté dans le gène codant pour l'ICS. *sid1* est muté dans un transporteur qui pourrait être impliqué dans le transport de précurseurs de SA ou de molécules signal. *npr1* présente une sensibilité accrue aux pathogènes induisant la voie de défense dépendant du SA. ICS : Isochorismate synthase; PAL : phénylalanine amonia lyase; AS : anthranilate synthase; BA2H : Benzoic acid 2-hydroxylase; PL : pyruvate lyase. D'après(Garcion et al., 2008; Wildermuth et al., 2001).

1.2.3.1.2 Implication du SA dans la mise en place des défenses

Le SA régule les mécanismes de la résistance acquise systémique (SAR) et de la résistance locale acquise (LAR), y compris la mort des cellules de l'hôte (HR) et l'expression des gènes de défense (Park et al., 2007; Vlot et al., 2008). Il a été démontré que le SA peut provoquer un burst oxydatif, notamment en inhibant l'action de catalase, ce qui accroit le niveau cellulaire de H₂O₂ (Ananieva et al., 2004) via des modifications du pool de glutathion (Han et al., 2013).

Les mécanismes sous-jacents à cette voie impliquent la protéine NPR1. Ils seront développés plus en détail dans la partie NPR1 suivante 1.3.1.

1.2.3.2 Les voies de défenses dépendantes du JA

1.2.3.2.1 Voie de biosynthèse du JA

Les jasmonates sont des oxylipines cycliques dérivées d'acides gras. Ces acides gras sont clivés de la membrane par des lipases puis transformés en hydroxyperoxides par les lypoxygénases (LOX).

Les hydroxyperoxides ainsi formés sont transformés en cyclopenténones (OPDA) dans le chloroplaste par l'action séquentielle des Allene Oxyde Synthases (AOS) et Allene Oxyde Cyclases (AOC). Les OPDA sont alors exportés vers les peroxisomes où ils sont réduits par l'OPDA réductase puis oxydés en acide jasmonique (JA). Celui-ci peut être exporté vers le cytoplasme et dérivé en méthyl-jasmonate (MeJA) (Weber, 2002) ou en isoleucine-jasmonate (IleJA) (Figure 6). La forme la plus active est l'isoleucine Jasmonate Ile-JA (Wasternack and Hause, 2013).



Figure 6 : Voie de biosynthèse des jasmonates (Wasternack and Hause, 2013). Les enzymes responsables des transformations sont indiquées dans les rectangles. PLA : lipases ; LOX : lypoxygénases AOS : Allene Oxyde Synthases ; AOC : Allene Oxyde Cyclases ; OPR3 : OPDA réductase ; JAR1 : JA-amino acid synthetase.

1.2.3.2.2 Implication du JA dans la mise en place des défenses

L'acide jasmonique (JA) et le méthyljasmonate (MeJA) sont des composés régulant le développement des plantes, l'adaptation à l'environnement et l'expression des gènes (Bell et al., 1995). L'implication du JA et de ses dérivés dans la réponse aux stress biotiques a été démontrée chez les plantes (Farmer and Ryan, 1992; Wasternack and Hause, 2013). Pour cela, une forte relation entre la signalisation ROS et la signalisation impliquant le JA est démontrée avec notamment l'importance des ROS générées par les enzymes RbohD et RbohF pour l'expression de gènes régulés par le facteur de transcription MYC2 induit par le JA (Maruta et al., 2011). La production et l'accumulation de ROS intracellulaires dans des plantes d'Arabidopsis conduit à l'activation de la voie JA-dépendante médiée par le glutathion (Han et al., 2013).

L'éthylène est un acteur principal de la mort cellulaire programmée ou Programmed Cell Death (PCD), que ce soit pendant la sénescence (Orzaez and Granell, 1997), le stress oxydatif imposé par l'ozone (Overmyer et al., 2000) ou les interactions avec les agents phytopathogènes (Lund et al., 1998). Il a donc été suggéré que l'éthylène était crucial pour la production de ROS (H₂O₂) pendant la PCD. Une synthèse simultanée et synergique de production d'éthylène et de ROS a été rapportée chez des plants de tabac infectés par l'oomycète hémibiotrophe *Phytophthora parasitica* (Wi et al., 2012).



Figure 7 : Modèle de perception de l'IleJA et régulation de l'expression des gènes de défense de la voie JA. (Santino et al., 2013) A : Lorsque le JA est en faible quantité le complexe JAZ-NINJA-TOPLES réprime l'expression des gènes de la voie de défense impliquant e JA. B : Lorsque la quantité de JA augmente, le complexe IIeJA-COI1-SCF ubiquitine les protéines JAZ les adressant ainsi au protéasome, ce qui lève l'inhibition de la transcription des gènes de défenses impliquant le JA et induit donc leur expression médiée par les facteurs de transcription bHLH.

Le JA induit l'expression de gènes de défenses spécifiques de la voie du JA par des mécanismes bien décrits. Les facteurs de transcription basic-helix-loop-helix (bHLH) interagissent avec la séquence cible (G-box) des promoteurs des gènes de défenses de la voie JA et induisent leur transcription (Santino et al., 2013). Lorsque les niveaux de Ile-JA sont faibles, les protéines Jasmonate-Zim-Domain (JAZ) forment des homo ou hétérodimères et se fixent sur les facteurs de transcription bHLH et inhibent leur activité grâce au répresseur général TOPLESS lié aux JAZ par l'intermédiaire des protéines Novel Interactor of JAZ (NINJA) (Kazan and Manners, 2008). Lorsque le niveau d'Ile-JA augmente, cette forme de jasmonate se lie au récepteur COronatine Insensitive1 (COI1) lui-même lié à des protéines Skp-Cullin-F-box (SCF) et le complexe ainsi formé permet l'ubiquitination des protéines JAZ par l'intermédiaire d'une ubiquitine ligase. Les protéines JAZ ubiquitinées sont adressées au protéasome levant ainsi la répression de l'induction des gènes de défenses de la voie JA (Santino et al., 2013) (Figure 7)

1.2.3.3 Interactions entre les différentes voies hormonales de défenses

Les voies de signalisation médiées par le SA et le JA sont interconnectées et agissent dans des réseaux complexes (Caarls et al., 2015). D'autres phytohormones comme l'acide abscissique (ABA), l'auxine (IAA), les gibbérellines (GAs), les cytokinines (CK), les brassinostéroïdes (BR) et des hormones peptidiques contribuent elles aussi à la régulation des voies de signalisation des défenses et/ou à la gestion des priorités métaboliques (Huot et al., 2014). Ainsi, l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène (ET) peuvent agir en synergie avec le JA, alors qu'ils ont généralement un rôle antagoniste des réponses dépendantes du SA (Figure 9). L'auxine, les gibbérellines et les cytokinines peuvent également réprimer les processus de défense pour donner la priorité à la croissance de la plante, et inversement leur action peut être inhibée par le SA ou le JA pour prioriser les mécanismes de défense aux dépens de la croissance de la plante (Pieterse et al., 2012).



Figure 8 : Représentation schématique des composants moléculaires impliqués dans la suppression de l'expression des gènes de défenses impliquant la voie du JA par le SA (Van der Does et al., 2013). La monomérisation de la protéine NPR1 induite par le SA induirait la répression de l'expression des gènes de défenses de la voie impliquant le JA par l'intermédiaire de facteurs TGAs ou WRKYs. Les lignes pleines indiquent les interactions établies; Les lignes pointillées indiquent des interactions hypothétiques.

Les différentes voies hormonales impliquant le SA ou le JA ont été décrites comme des réponses respectives aux agents pathogènes biotrophes ou aux agents pathogènes nécrotrophes et insectes (Pieterse 2012). Elles ont été décrites comme se réprimant l'une et l'autre (Van der Does et

al., 2013) par l'intermédiaire de la protéine NPR1 ayant un rôle central dans l'interaction de ces deux voies (Spoel, 2003) (Figure 8). Ce concept sera plus développé dans les parties 1.3.1 et 1.3.2.

Lorsque le JA fonctionne en synergie avec l'ET, la voie de défense contre les agents pathogènes nécrotrophes se met en place par l'intermédiaire des facteurs de transcription ORA59 et ERF1 et induit entre autre l'expression du gène *PDF1.2* marqueur de cette voie. Lorsque le JA fonctionne en synergie avec l'ABA, la voie de défense contre les insectes se met en place par l'intermédiaire des facteurs de transcription MYCs qui induisent l'expression du gène *VSP2* marqueur de cette voie (Wasternack and Hause, 2013) (Figure 9). Ces deux voies impliquant d'une part le JA et l'ET et d'autre part le JA et l'ABA se répriment l'une l'autre (Wasternack and Hause, 2013).



Figure 9 : Antagonisme entre le JA, l'ET et l'ABA déclenché en réponse à des insectes herbivores et à des agents pathogènes nécrotrophes (Wasternack and Hause, 2013). Les attaques par des insectes herbivores induisent des voies de signalisation dépendantes du JA et de l'ABA, alors que les infections par les agents pathogènes nécrotrophes induisent des voies de signalisation dépendantes du JA et de l'ET. L'inhibition des facteurs de transcription MYCs et ORA59 et ERF1 par les protéines JAZ est levée en présence de JA. La présence d'ABA ou d'ET détermine quels facteurs de transcription parmi ceux-ci vont être activés. Les lignes continues représentent les interactions connues; les lignes pointillées représentent les interactions hypothétiques.

Ces trois voies de défense impliquant soit le SA, soit d'une part le JA et l'ET, soit d'autre part le JA et l'ABA se répriment donc l'une l'autre afin d'induire une spécificité de réponse vis-à-vis de l'agresseur perçu (Santino et al., 2013) (Figure 10).

Cet antagonisme n'est pas toujours observé et il arrive que ces voies soient activées de manière synergique selon les conditions. Ceci pourrait être dû à la dose présente des hormones impliquées, à une mise en place différentielle de ces différentes voies dans le temps et l'espace (Betsuyaku et al.,

2018) ou même à l'implication d'autres voies hormonales dans la régulation des défenses générales (Berens et al., 2017).



Figure 10 : Antagonisme entre les voies de défense impliquant le JA, l'ET, l'ABA et le SA. Les lignes continues représentent les interactions connues; les lignes pointillées représentent les interactions hypothétiques. Les flèches rouges montrent l'activation des protéines ou de la transcription de gènes les lignes vertes montrent l'inactivation des protéines ou de la transcription de gènes.

1.2.3.4 Les voies de défenses induites et persistantes, la SAR et l'ISR

Les défenses induites par la perception de MAMPs ou d'effecteurs peuvent persister dans l'ensemble de la plante et dans le temps pendant plusieurs semaines. Ainsi la plante peut se protéger de manière systémique face à de nouvelles agressions par des agents pathogènes. Il existe ainsi, deux voies de défense systémiques, la résistance systémique acquise ou Systemic Acquired Resistance (SAR) et la résistance systémique induite ou Induce Systemic Resistance (ISR) (Vallad et Goodman, 2004). La SAR est principalement mise en place suite à une attaque par un agent pathogène ou la stimulation par un éliciteur et fait intervenir le SA. L'ISR est généralement induite par des rhizobactéries non pathogènes les Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) et fait intervenir le JA et l'ET (Pieterse et van Loon, 1999 ; Jourdan *et al*, 2008). La protéine NPR1 est décrite comme ayant un rôle central dans l'interaction de ces deux voies (Chan, 2013) (Figure 11).

Ces différentes voies de défenses systémiques et persistantes peuvent être utilisées dans un contexte agronomique afin d'induire une protection des cultures (Heil, 2001; Heil and Bostock, 2002; Herman et al., 2007; Liu et al., 2016; Sivasakthi et al., 2014).


Figure 11 : Voies de transduction du signal pour la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR) (Chan, 2013).

1.3 NPR1 une protéine clé dans la signalisation des défenses

Le gène *NPR1* (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1) est un gène clé, impliqué dans la régulation des défenses systémiques de nombreuses plantes. Ce gène a été initialement identifié chez *A. thaliana (AtNPR1, At1g64280)* grâce à un crible génétique destiné à identifier des mutants incapables d'activer l'expression d'un gène répondant au SA suite à une infection par la bactérie pathogène *P. syringae* pv. *maculicola*. Un mutant EMS a ainsi été isolé dans lequel l'expression des gènes marqueurs de la voie du SA *PR1, PR2* et *PR5* est abolie suite à une application de SA ou l'acide 2,6-dichloroisonicotinic (INA) (Cao et al., 1994). Ce mutant fut nommé « NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 » (*npr1*). Le gène NPR1 a également été appelé *NIM1* (NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1) ou *SAl1* (SALICYLIC INSENSITIVE 1) (Shah et al., 1997). *NPR1* code pour une protéine possédant un domaine BTB-POZ (Bric à brac, Tramtrack, Broad complex - POx virus and Zinc finger ; Pfam : PF00651) en sa partie N terminale, un domaine d'ankyrines (Pfam: PF00023) répétées en sa partie centrale (domaine de liaison protéines-protéines constitué de répétitions d'hélices α séparées par des boucles) (Cao et al., 1997), un domaine de transactivation et un signal de localisation nucléaire (NLS) dans sa partie C-terminale (Figure 12).



Figure 12 : Représentation schématique de la protéine NPR1 d'*A. thaliana* avec la position de ses différents domaines. Le Bric à brac, Tramtrack, Broad complex - POx virus and Zinc finger (BTB-POZ) est représenté en rouge, le domaine de répétitions d'ankyrines (ANK) en jaune, le domaine transactivateur (TAD) en violet et le système d'adressage au noyau en bleu (NLS).

Le rôle de la protéine NPR1 dans l'activation des mécanismes de défenses dépendants du SA est bien décrit dans la littérature (Dong, 2004; Kuai et al., 2015). Par contre il s'avère que cette protéine est aussi impliquée dans la régulation des défenses dépendantes du couple hormonal JA/ET d'une manière qui n'est pas encore clairement définie (Ramírez et al., 2010; Spoel, 2003). Chez Arabidopsis, le gène *NPR1* fait partie d'une famille multigénique comportant les gènes codants pour les protéines NPR2, NPR3 et NPR4, toutes trois également impliquées dans la régulation des défenses systémiques. La protéine NPR1 est conservée avec une forte homologie de séquence chez de nombreuses espèces du règne végétal et son rôle dans les défenses dépendantes du SA a été démontré dans plusieurs modèles (Tableau 2). De manière intéressante, la famille multigénique REL/NF-ĸB/I-ĸB de protéines impliquées dans l'immunité innée chez les mammifères possède un mode de fonctionnement qui présente des similitudes avec celui des NPR chez les plantes.

1.3.1 Implication de NPR1 dans la voie de défense dépendante du SA chez A. thaliana

La mise en place des mécanismes de défenses impliquant la voie du SA nécessite l'intervention de la protéine NPR1 chez l'espèce modèle *A. thaliana*. En effet, lorsque le gène *NPR1* est muté, les plantes ne sont plus capables de mettre en place leurs défenses impliquant le SA telles que l'expression de *PR1* (Cao et al., 1997; Shah et al., 1997). De plus, la surexpression de *NPR1* chez *A. thaliana* conduit à une forte induction des gènes *PR* et une protection augmentée face à différents agents pathogènes tels que *P. syringae* et *Hyaloperonospora parasitica* (Cao et al., 1998; Kinkema et al., 2000).



Figure 13 : Modélisation in-silico de la topologie de l'oligomère du domaine BTB-POZ de NPR1. A : Représentation du dimère du domaine BTB-POZ de NPR1, les cystéines importantes dans l'oligomérisation et dans la stabilisation de NPR1 sont indiquées. Le dimère est stabilisé par des ponts disulfures entre les cystéines 82. B : Prédiction de la topologie de l'oligomère. Les homodimères s'agrègent entre eux grâce à des ponts disulfures entre leurs cystéines C150, C155, C156 et C160 (CCCC). Chaque homodimère se positionnerait ainsi à la perpendiculaire du précédent (Tada et al., 2008a).

Lorsque les plantes d'*A. thaliana* ne sont ni soumises à un stress biotique, ni confrontées à un éliciteur, la protéine NPR1 est localisée dans le cytosol agglomérée sous une forme oligomérique. Plusieurs protéines NPR1 s'agrègent en oligomère par la formation de ponts disulfure entre les cystéines conservées Cys82 (Mou et al., 2003a) en absence de stress. Il a été montré que la *S*-nitrosylation de la cysteine-156 favorise l'oligomérisation (Tada et al., 2008a). L'application d'un éliciteur ou la perception d'un agent pathogène par la plante provoque une augmentation de la quantité de SA intracellulaire qui induit des changements de l'état redox cellulaire (Herrera-Vaisquez et al., 2015). Le degré de polymérisation de la protéine NPR1 est modifié en fonction de l'état redox cellulaire. En situation réductrice, NPR1 passe sous sa forme monomérique grâce à l'action de thioredoxines (Li and Loake, 2016; Tada et al., 2003a) (Figure 13). La protéine NPR1 s'avère être aussi un récepteur direct du SA (Manohar et al., 2015; Wu et al., 2012). L'acide salicylique se fixe à un ion cuivre lié aux cystéines Cys521 et Cys529. La fixation du SA sur NPR1 permet de lever l'interaction entre le domaine BTB/POZ N terminal et le domaine trans-activateur C-terminal (Wu et al., 2012) Figure 14.



Figure 14 : Modèle présentant les différentes hypothèses d'interaction entre le domaine transactivateur de NPR1, l'ion métallique et le SA (Wu et al., 2012). Dans le premier modèle (gauche), en présence de SA, le domaine transactivateur s'éloigne du domaine BTB/POZ car ces deux domaines se repoussent mutuellement. Dans le deuxième modèle (droite), la présence de SA induit un changement de conformation du domaine transactivateur.

Au moins deux processus cellulaires différents sont donc impliqués dans l'activation de NPR1 dans la voie de défense dépendant du SA. Le premier repose sur un changement de l'état redox cellulaire et l'autre repose sur l'action directe de SA sur la protéine. Selon Wu et al (2012), Les deux processus seraient nécessaires pour l'adressage de monomères de NPR1 au noyau. Ces différents mécanismes impliquent tout deux des Cystéines de NPR1 différentes (Tableau 1).

Position		Méthode	
Cystéine	Mécanisme dans lequel elle est impliquée	utilisée	Publication
07		Expérimentale	(Mou et al., 2003a;
02	dimérisation / monomérisation		Tada et al., 2008a)
150		Modélisation	(Mou et al., 2003a;
130	oligomérisation / monomérisation	informatique	Tada et al., 2008a)
155		Modélisation	
122	oligomérisation / monomérisation	informatique	(Tada et al., 2008)
160		Modélisation	
100	oligomérisation / monomérisation	informatique	(Tada et al., 2008)
216	dimérisation / monomérisation	Expérimentale	(Mou et al., 2003a)
156	oligomérisation / monomérisation	Expérimentale	(Tada et al., 2008)
		Expérimentale	(Rochon et al.,
521	activation du domaine transactivateur /		2006; Wu et al.,
	par liaison au SA par l'intermédiaire de l'ion métallique		2012)
		Expérimentale	(Rochon et al.,
529	activation du domaine transactivateur /		2006; Wu et al.,
	par liaison au SA par l'intermédiaire de l'ion métallique		2012)

Tableau 1 : Implication des cystéines de NPR1 dans les différents mécanismes

Lorsqu'elle est sous forme monomérique active, la protéine NPR1 migre vers le noyau par l'intermédiaire du complexe MOS7/Nup88 (Cheng et al., 2009) pour interagir avec des facteurs de transcription bZip (basic domain-leucine zipper) de la famille TGA afin d'activer l'expression de gènes de défense tels que celui codant la protéine PR1 (Chern et al., 2001; Delaney, 2000; Després et al., 2000; Kinkema et al., 2000; Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000). Ces facteurs TGA peuvent être soit des répresseurs, soit des activateurs transcriptionnels. Leur interaction avec NPR1 a lieu au sein d'un complexe impliquant aussi les protéines NIMIN (NIM1 interacting) (Weigel et al., 2001). Ces protéines NIMIN agissent de manière séquentielle au cours de la mise en place des défenses dépendantes du SA afin de réguler l'activité de NPR1 au cours du temps (Hermann et al., 2013). L'interaction de NPR1 avec des facteurs TGA ayant un effet répresseur conduit à une levée de répression. L'interaction de NPR1 avec des facteurs TGA ayant un effet activateur conduit à une activation (Kesarwani et al., 2007). Par exemple, les facteurs TGA1 et TGA4 sont capables d'activer la transcription des gènes PR (Eckardt, 2003). Plus précisément, TGA1 est présent sous forme oligomérique en conditions oxydantes et en absence de stress. Les différentes protéines TGA1 formant l'oligomère sont liées par des ponts disulfure intramoléculaires entre leurs Cys260 et Cys266 (Lindermayr et al., 2010). Lorsque la voie du SA est activée, ces ponts disulfure sont réduits et la forme monomérique active de NPR1 peut alors se fixer aux facteurs TGA1 et induire la transcription des gènes PR (Li and Loake, 2016) (Figure 15).



Figure 15 : Régulation Redox de NPR1 et TGA1 au cours de la mise en place des défenses (Li and Loake, 2016) : En absence de stress biotique, NPR1 est présent dans le cytoplasme sous forme oligomérique et TGA1 possède des ponts disulfures intramoléculaires. TGA1 est alors incapable de se lier à l'ADN et NPR1 de rentrer dans le noyau pour activer la transcription de gènes de défense. En présence d'un stress biotique, le statut redox de la cellule change et permet la réduction des ponts disulfure présents chez NPR1 et TGA1. NPR1, sous sa forme monomérique, est alors adressée au noyau. Le facteur TGA1 dont les ponts disulfures intramoléculaires ont été réduits, est capable de se lier à l'ADN. Le complexe NPR1-TGA1 est alors formé et permet la transcription des gènes de défenses dépendants du SA.

Les facteurs de transcription TGA2 et TGA5 (Kim and Delaney, 2002) sont des régulateurs négatifs des gènes *PR*. Le facteur TGA2 est lié à l'ADN sous une forme oligomérique, bloquant ainsi la transcription de gènes de défense dépendants du SA. En présence de SA, le domaine BTB/POZ de NPR1 interagit avec le domaine de répression de TGA2, permettant ainsi d'empêcher son oligomérisation et de lever la répression transcriptionnelle. Le complexe TGA2-NPR1 ainsi formé est stabilisé grâce au domaine ankyrine de NPR1 (Boyle et al., 2009; Johnson, 2003; Rochon et al., 2006) (Figure 16).



Figure 16 : Régulation de TGA2 par NPR1 (Boyle et al., 2009). A gauche, chez les plantes non traitées TGA2 est sous forme oligomérique lié à la séquence d'ADN TGACG présente dans le promoteur du gène cible et réprime la transcription de ce gène. A droite, après augmentation du niveau de SA, le domaine BTB/POZ de NPR1 va permettre de désassembler l'oligomère de TGA2 et va s'assembler avec des dimères de TGA2. Ce domaine BTB/POZ dimérise et interagit avec le domaine répresseur N-terminal de TGA2 afin de le masquer. Les domaines ankyrines de NPR1 vont permettre de stabiliser le complexe NPR1-TGA2. Ces complexes vont ensuite induire l'expression du gène cible.

Afin de contrôler l'homéostasie de la protéine NPR1 cellulaire, le facteur de transcription WRKY18 est capable de se lier aux séquences TTGAC des trois boites W présentes au niveau du promoteur du gène *NPR1* et d'induire sa transcription lorsque la voie du SA est activée (Chen, 2002) (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013; Yu et al., 2001) (Figure 17). Par ailleurs, la concentration en NPR1 est contrôlée par le protéasome 26S via des protéines réceptrices du SA, les protéines NPR3 et NPR4 (Fu et al., 2012). Les protéines NPR1 ayant été impliquées dans la transcription dans le noyau sont dégradées et le niveau de NPR1 cellulaire est maintenu grâce à la transcription du gène *NPR1* induite par WRKY18.



Figure 17 : Modèle de la régulation de *PR1* **par NPR1 et TGA2** (Rochon et al., 2006). A : Dans le fond mutant *npr1*, la répression du gène *PR1* induite par TGA2 n'est pas levée, dû à l'absence de NPR1. B : Dans le fond mutant *tga2/5/6* la répression de l'expression de *PR1* par TGA2 n'a pas lieu. C : Dans un fond sauvage en absence de SA, NPR1 et TGA2 sont recrutés sur le promoteur de *PR1* mais sont incapables d'induire son expression de par la conformation inactive de NPR1. D : Dans un fond sauvage, en présence de SA, NPR1 est sous une forme active capable de se lier à TGA2 et ainsi former le complexe induisant la transcription de *PR1*.

1.3.2 Implication dans la voie de défense JA/ET dépendante

Outre son rôle dans les défenses dépendantes du SA, la protéine NPR1 est également impliquée dans les défenses dépendantes des hormones acide jasmonique et éthylène (JA/ET). Chez *A. thaliana*, un mutant *npr1* est incapable d'activer les défenses dépendantes de JA/ET suite à un traitement par des bactéries inductrices de l'ISR, les PGPR (Nie et al., 2017; Pieterse et al., 1998; Pieterse and van Loon, 1999). Suite à un traitement d'*A. thaliana* par des bactéries de type PGPR *Pseudomonas putida* LSW17S, la résistance face à *P. syringae* DC3000 est induite d'une manière dépendante des hormones JA/ET et de la protéine NPR1. En effet cette résistance induite est abolie

lorsque les mutants *etr1* (insensible à l'éthylène), *jar1* (moins sensible au MeJA) ou *npr1* sont utilisés, démontrant ainsi l'implication de NPR1 dans les défenses dépendantes du couple JA/ET (Ahn et al., 2007).

Contrairement à l'activation des défenses induites par le SA qui nécessite une localisation nucléaire de NPR1, la régulation des défenses dépendantes de JA/ET est effective en présence de la forme cytosolique de NPR1 (Spoel et al., 2003). En effet, dans un fond mutant *ocp3*, qui n'est pas capable de détecter le jasmonate et donc d'activer ses défenses dépendantes du JA/ET, la surexpression d'une forme de NPR1 incapable de migrer vers le noyau (NPR1-HBD) restaure la capacité de la plante à activer cette voie de défense (Ramírez et al., 2010). Cette forme NPR1-HBD surexprimée est une fusion de la protéine NPR1 avec un domaine de fixation aux glucocorticoïdes issu du récepteur de glucocorticoïdes du rat. La localisation nucléocytoplasmique de cette protéine fusionnée peut être contrôlée par l'hormone stéroïde dexamethasone (DEX) capable de se fixer sur le domaine HBD. En absence de DEX la protéine NPR1-HBD est retenue dans le cytosol par l'association avec la protéine HSP90 (Heat Shock Protein). En présence de DEX, le complexe se dissocie et NPR1-HBD migre vers le noyau (Spoel, 2003). La manière exacte dont la protéine NPR1 agit dans ces voies de défense JA/ET n'est toujours pas clairement décrite, mais il apparait que sa forme cytosolique serait impliquée dans l'activation de la voie dépendante du JA/ET.

Par ailleurs, il a été décrit que la forme cytosolique de NPR1 est impliquée dans la boucle de régulation du JA par l'intermédiaire du facteur de transcription WRKY62. En effet, le gène *WRKY62* est transcrit après traitement au MeJA d'une manière dépendante de la forme cytosolique de NPR1. WRKY-62 s'avère être un régulateur négatif de la voie du JA/ET car l'expression des gènes *LOX2* et *PDF1.2*, tous deux gènes marqueurs des voies JA/ET, est élevée dans un fond mutant *wrky62* et par opposition, ils sont réprimés dans un fond surexpresseur (Mao et al., 2007). Le facteur de transcription WRKY 62 est également impliqué dans la régulation de la voie JA/ET par la voie du SA car son expression est induite par l'acide salicylique. L'implication de NPR1 dans la régulation de la biosynthèse du JA, a aussi été constatée chez le tabac. En effet, chez un mutant *npr1* de tabac, la production d'enzyme de biosynthèse du JA après blessure est affectée (Kallenbach et al., 2010). La forme cytosolique de NPR1 permettrait la répression de la voie JA/ET en interagissant de manière directe ou indirecte avec des facteurs TGA ou WRKY afin de réprimer des facteurs de transcription impliqués dans la réponse dépendante du JA/ET (Pieterse et al., 2012).

1.3.3 Un gène au sein d'une famille multigénique : rôle des autres NPR

NPR1 fait partie d'une famille multigénique (Figure 18) comportant six gènes chez A. thaliana. NPR1, NPR2, NPR3 et NPR4 sont impliqués dans les défenses systémiques alors que NPR5 et NPR6, connus sous le nom de BOP1 et BOP2, sont plutôt impliqués dans des processus développementaux, bien qu'ils semblent aussi être impliqués dans la réponse au MeJA (Canet et al., 2012) (Figure 20). Les six protéines NPR possèdent un domaine BTB/POZ, des domaines ankyrines répétés, ainsi qu'un certain nombre de cystéines conservées (Pajerowska-Mukhtar et al., 2013) (Figure 19). Ces protéines possèdent donc les motifs suffisants permettant de s'agglomérer en homo, hétérodimères ou oligomères.



Figure 18 : Arbre phylogénique des 6 protéines NPR d'A. thaliana (Liu et al., 2004) : Le pourcentage d'identité avec NPR1 est présenté sur la droite.

Le rôle du gène *NPR2* dans les défenses, n'est pas clair à l'heure actuelle (Chern et al., 2008), bien qu'il soit légèrement induit lorsque la plante est soumise à un stress biotique (Canet et al., 2010) ou traitée à l'ABA (Williams et al., 1994).

Les protéines NPR5 et NPR6 ont essentiellement un rôle dans le développement de la fleur, mais ces protéines semblent aussi être impliquées dans la réponse au jasmonate. En effet, un mutant *npr5-npr6* est incapable de répondre au MeJA. A l'inverse, la surexpression de *NPR5* ou *NPR6* augmente le niveau de protection induit par le MeJA (Canet et al., 2012).



Figure 19 : Représentation graphique de la structure des 6 membres de la famille NPR d'A. thaliana (Shi et al., 2013). Les exons sont représentés par des rectangles et les introns par des lignes, les régions avec des domaines fonctionnels homologues sont colorés (en noir le domaine BTB/POZ, en gris le domaine de répétition ankyrines, en pointillé le domaine NLS.

Un focus sera fait ici sur les protéines NPR3 et NPR4, impliquées spécifiquement dans les défenses systémiques dépendantes du SA.



Figure 20 : Interactions de NPR1 avec les membres de sa famille protéique en fonction des hormones et des voies dans lesquelles elles sont impliquées. Les trois voies hormonales présentées sont impliquées dans la réponse aux stress biotiques et les voies impliquant le couple JA/ET ou l'ABA peuvent aussi être impliquées dans la réponse aux stress abiotiques. En présence de SA, NPR1 pourra interagir avec NPR3 ou NPR4. En présence d'acide jasmonique et d'éthylène, il interagira avec NPR5 ou NPR6. En présence d'ABA NPR1 interagira avec NPR2. Ainsi NPR1 n'aura pas le même partenaire selon la voie de défense mise en jeu.

Le rôle de NPR3 et NPR4 dans la voie de défense dépendant du SA a été récemment décrit. Ces deux protéines sont des régulateurs négatifs de cette voie, les domaines ankyrines sont d'ailleurs typiques de l'interaction avec des Cullin Ubquitine Ligase (CUL) impliquées dans l'adressage de protéines cibles au protéasome après leur ubiquitination. Les gènes *NPR3* et *NPR4* ont d'abord été décrits comme étant des régulateurs négatifs de l'immunité (Zhang et al., 2006). Chez les mutants *npr3* et *npr3-npr4*, l'expression du gène *PR1* est induite comparée à son niveau dans la plante sauvage (Zhang et al., 2006). L'induction du gène *PR1* après traitement avec du SA est plus élevée chez ces mutants que chez les plantes sauvages. En outre, le niveau de protéine NPR1 augmente chez les mutants *npr3* et *npr4* alors que le niveau d'expression du gène *NPR1* ne varie pas. Ceci suggère que les protéines NPR3 et NPR4 seraient impliquées dans la dégradation de la protéine NPR1. Cette hypothèse a été confirmée en montrant que l'addition des protéines NPR3 et NPR4 recombinantes sur un extrait protéique du double mutant *npr3 npr4* ramenait le niveau de NPR1 à celui observé chez les plantes sauvages (Fu et al., 2012). De plus, des expériences de co-immuno-précipitation ont montré que NPR3 et NPR4 se lie à CUL3, protéine impliquée dans l'ubiquitination, indiquant un rôle de NPR3 et NPR4 dans l'adressage au protéasome (Furniss and Spoel, 2015).

44

NPR3 et NPR4 sont tous deux des récepteurs du SA avec différentes affinités : le SA a été montré comme facilitant l'interaction entre les protéines NPR1 et NPR3 mais à l'inverse permettant la rupture de celle entre les protéines NPR1 et NPR4. Lors de l'infection par un agent pathogène, la forte augmentation du niveau de SA au niveau du site d'infection permet la dégradation de NPR1 par l'intermédiaire de NPR3-CUL3. Cela permettrait de favoriser la mort cellulaire programmée via l'accumulation de NPR1 qui a été décrit comme étant capable de supprimer la mort cellulaire lors de l'ETI (Boatwright et al., 2013). Au niveau des cellules adjacentes, le niveau de SA est moins élevé et n'est pas suffisant pour induire l'ubiquitination de NPR1 par NPR3-CUL3 mais est suffisant pour induire la séparation du complexe NPR1/NPR4 (Boatwright et al., 2013). Le niveau de NPR1 nucléaire augmente alors dans ces cellules adjacentes, réprime la mort cellulaire permettant ainsi de préserver les tissus autour de la HR, et induit alors les défenses systémiques dépendantes du SA (Fu and Dong, 2013) (Figure 20).

Lorsque la plante n'est pas soumise à un stress biotique, le niveau de SA n'est pas suffisant pour induire la transcription des gènes de défenses. La protéine NPR3 se lie alors à la protéine NPR1 nucléaire afin de l'adresser au protéasome et ainsi éviter l'activation des défenses due à la présence de NPR1 nucléaire résiduelle. Lorsque la voie de défense dépendante du SA est activée, un niveau intermédiaire de SA permet la disruption du complexe NPR1-NPR3 et donc l'induction des gènes de défenses dépendants du SA mais aussi la formation du complexe NPR1-NPR4 qui permet de réguler le niveau de NPR1 nucléaire afin de maintenir la concentration de NPR1 cellulaire (Kuai et al., 2015). Les protéines NPR3 et NPR4 permettent donc de réguler finement le niveau de NPR1 nucléaire en présence ou en absence de SA(Pajerowska-Mukhtar et al., 2013) via l'ubiquitination de NPR1 par CUL3 (Figure 21).

Il a aussi été montré que NPR3 et NPR4 ont un rôle dans l'induction de l'ETI par l'intermédiaire du jasmonate. Dans ce cas de mise en place rapide des défenses, il a été montré que NPR3 et NPR4 se lient aux protéines JAZ, répresseurs transcriptionnels de la voie jasmonate et les dirigent vers le protéasome, levant ainsi cette répression (Liu et al., 2016; Withers and Dong, 2017).



Figure 21 : Implication de NPR3 et NPR4 dans la régulation de NPR1 en fonction de la concentration de SA. Lorsque le niveau de SA est faible, NPR1 est majoritairement sous sa forme oligomérique cytosolique et la protéine NPR4 se lie à la protéine NPR1 nucléaire afin de l'adresser au protéasome et ainsi éviter l'activation des défenses due à la présence de NPR1 nucléaire résiduelle. Lorsque le niveau de SA est intermédiaire, NPR1 se retrouve essentiellement sous sa forme monomérique nucléaire et ne se lie ni à NPR3 ni à NPR4 et peut donc induire les gènes de défenses. En présence d'un fort niveau de SA, NPR1 est sous sa forme monomérique nucléaire et se lie aux protéines NPR3 et CUL3 ubiquitiné complexe adressé au protéasome. La répression de l'ETI par NPR1 est ainsi levée. D'après (Boatwright et al., 2013).

1.3.4 Une protéine conservée au sein du règne végétal

La protéine NPR1 est retrouvée chez la plupart des plantes avec une forte homologie et jouerait un rôle similaire dans les défenses dépendantes du SA. Ainsi, un grand nombre de publications, montrant que l'homologue de la protéine NPR1 est impliqué dans l'activation des défenses dépendantes du SA chez différentes plantes sont disponibles. Ceci est montré par l'utilisation de mutations, de surexpression ou d'expression hétérologue qui ont permis de mettre en évidence un rôle similaire des homologues de NPR1 chez les plantes à celui décrit chez *A. thaliana*. Une liste non exhaustive des expériences effectuées sur la protéine NPR1 chez diverses plantes est présentée dans le tableau 2.

Organisme	Approche expérimentale	Résultats	Pourcentage d'identité /AtNPR1	Informations supplémentaires	Publication
Coffea arabica, Caféier	Analyse <i>in-silico</i> , phylogénie, infection et q-RT-PCR, pCaNPR1::GUS traitées au SA	Activité GUS après traitement avec du SA, pas de changement dans l'expression après infection par <i>Hemileia</i> vastatrix		Possède un motif leucine zipper en plus du BTB/POZ, des répétitions ankyrines et du NLS	(Barsalobres- Cavallari et al., 2013)
Solanum torvum, Aubergine sauvage; Solanum tuberosum, Pomme de terre	Analyse <i>in-silico</i> , phylogénie, q-RT-PCR, mutation transitoire, surexpression de <i>StNPR1</i> chez la pomme de terre	Induction de l'expression après traitement SA, augmentation de la résistance à <i>Verticillium</i> <i>dahliae et de l'expression</i> <i>de PR1</i> chez la pomme de terre surexpresseur		Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Deng-wei et al., 2014)
<i>Ipomea batatas,</i> Patate douce	Analyse <i>in-silico,</i> phylogénie, q-RT-PCR,	Induction de l'expression après traitement SA	52%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Chen et al. <i>,</i> 2009)
<i>Beta vulgaris,</i> Betterave à sucre	Analyse <i>in silico,</i> phylogénie		52.40%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Kuykendall et al., 2007)
Citrus sinensis, Oranger	Surexpression de AtNPR1	Augmentation de la résistance à <i>Candidatus</i> <i>Liberibacter asiaticus</i> et de l'expression de <i>PR1</i> chez l'orange surexpresseur			(Dutt et al., 2015)
<i>Citrus limon,</i> Citronnier	Analyse <i>in silico</i> , surexpression de <i>CtNH1</i> dans le citron, q-RT-PCR, protection,	La surexpression induit l'expression de <i>CtPR1</i> et augmente la protection vis à vis de <i>Xanthomonas</i> <i>axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	73%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Chen et al., 2013b)
<i>Brassica juncea,</i> Moutarde brune	Analyse <i>in silico,</i> q-RT- PCR, fusion transcriptionelle	Induction de l'expression après traitement SA, translocation de BjNPR1- GFP dans le noyau après traitement SA	80%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Meur et al. <i>,</i> 2006)
<i>Helianthus annuus,</i> Tournesol	q-RT-PCR	Induction de l'expression après traitement SA ou infection avec Plasmopara halstedii			(Radwan et al., 2005)
Gossypium hirsutum L, Cotonnier	Analyse <i>in silico,</i> southern blot, northern blot, q-RT- PCR, résistance aux agents pathogènes	Induction de l'expression après traitement SA, MeJA ou Et ou infection avec Fusarium axysporum ou Xanthomonas campestris	53%	Un seul gène NPR1	(Zhang et al., 2008)
Gossypium hirsutum L, Cotonier	Surexpression de AtNPR1 chez le coton	Amélioration de la résistance a <i>Verticillium</i> dahliae chez les surexpresseur		Deux NPR1 identifiés PtNPR1.1 et PtNPR1.2, qui possèdent un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Parkhi et al., 2010)

Tableau 2 : Bilan non exhaustif des études effectuées sur l'homologue de la protéine NPR1 chez d'autres espèces végétales

<i>Gladiolus hybridus,</i> Glaïeul	Analyse <i>in-silico,</i> complémentation fonctionnelle	L'expression hétérologue, permet de restaurer la protection vis-à-vis de P. syringae chez le mutant npr1.1 chez A. thaliana, la mutation de GhNPR1 augmente la susceptibilité à Curvularia gladioli			(Zhong et al., 2015)
<i>Populus deltoids,</i> Peuplier	Analyse <i>in-silico,</i> phylogénie, q-RT-PCR	Induction de l'expression de <i>PtNPR1.1</i> et <i>PtNPR1.2</i> après traitement SA et uniquement de <i>PtNPR1.2</i> après traitement MeJA			(Shao et al., 2013)
<i>Vitis vinifera,</i> Vigne	Analyse in-silico, phylogénie, q-RT-PCR, surexpression de VvNpR1 dans la vigne	La surexpression de <i>VvNPR1.1</i> induit l'expression de <i>VvPR1</i>	55% 40%	Deux NPR1 identifiés VvNPR1.1 et VvNPR1.2, qui possèdent un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Le Henanff et al., 2009)
<i>Vitis vinifera,</i> Vigne	Surexpression de VvNPR1 chez la vigne, complémentation fonctionnelle de AtNPR1 par VvNPR1, Fusion traductionnelle de VvNPR1 et de la GFP chez la vigne	L'expression hétérologue permet de restaurer l'induction de <i>PR1</i> chez le mutant <i>npr1.1</i> d'A. <i>thaliana</i> , la surexpression de <i>VvNPR1</i> dans la vigne permet d'augmenter la résistance à <i>Erisyphe</i> <i>necator</i> , la protéine <i>VvNPR1::</i> GFP est adressée au noyau après traitement SA			(Le Henanff et al., 2011)
Vitis aestivalis et Vitis vinifera, Vigne	Complémentation fonctionnelle de AtNPR1 par VaNPR1	L'expression hétérologue permet de restaurer l'induction de <i>PR1</i> chez le mutant <i>npr1.1</i> d'A. thaliana		Un seul acide aminé différent entre VaNPR1 et VvNPR1, possèdent un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Zhang et al., 2013)
<i>Malus x domestica,</i> Pommier	Analyse <i>in-silico</i> , phylogénie, surexpression de <i>MpNPR1.1</i>	La surexpression de <i>MpNPR1.1</i> induit l'expression des <i>MpPR</i> et augmente la protection vis-à-vis de <i>Erwinia</i> <i>amylovora, Venturia</i> <i>inaequalis</i> et <i>Gymnosporangium</i> <i>juniperi-virginianae</i>			(Malnoy et al., 2007)
Malus hupehensis, pommier du hou-pei, Nicotiana tabacum, Tabac	Surexpression de <i>MhNPR1</i> dans le tabac, fusion traductionnelle de <i>MhNPR1</i> avec la GFP dans le pommier	La surexpression de MhNPR1 dans le tabac induit l'expression des NtPR et augmente la résistance à Botrytis cinerea, la protéine MhNPR1::GFP est adressée au noyau après traitement SA			(Zhang et al., 2010)
<i>Malus</i> <i>hupehensis,</i> Pommier du hou-pei ; <i>Malus x</i>	Surexpression de <i>MhNPR1</i> dans le pommier Fuji	La surexpression induit l'expression de <i>MdPR e</i> t augmente la protection vis à vis de <i>Podosphaera</i> <i>leucotricha</i>		Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Chen et al., 2012)

<i>domestica,</i> Pommier Fuji					
<i>Carica papaya L,</i> Papayer	Analyse <i>in-silico,</i> phylogénie, q-RT-PCR	L'expression hétérologue des quatre gènes <i>CpNPR</i> suggère un rôle équivalent de <i>CpNPR1</i> <i>CPNPR2</i> et <i>CpNPR3</i> à celui de NPR1 chez <i>A. thaliana</i>	54% 53.7%, 41.5% 41.2%	Quatre homologues de NPR1 sont identifiés, CpNPR1, CpNPR2, CpNPR3 et Cp NPR4 qui possèdent un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Peraza- Echeverria et al., 2012)
Theobroma cacao, Cacaoyer	Analyse in silico, Expression hétérologue de TcNPR1dans un mutant npr1 d'A. thaliana, q-RT-PCR, protection,	La surexpression de <i>TcNPR1</i> dans <i>A. thaliana</i> <i>Atnpr1</i> mutant induit l'expression des <i>AtPR</i> et augmente la résistance à <i>Pseudomonas syringae</i> , la protéine TcNPR1::GFP est adressée au noyau après traitement SA chez <i>A.</i> <i>thaliana</i>	55%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Shi et al., 2010)
<i>Glycyine max,</i> Soja	Analyse <i>in-silico</i> , phylogénie, expression hétérologue	Les expressions hétérologues permettent de restaurer l'induction de <i>PR1</i> chez le mutant <i>npr1.1</i> chez <i>A. thaliana.</i>	40%	Deux orthologues de NPR1 identifiés GmNPR1.1 et GmNPR1.2, qui possèdent un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Sandhu et al., 2009)
Arachis hypogaea, Arachide	Analyse <i>in-silico,</i> phylogénie, q-RT-PCR	Induction de l'expression de NPR1 après traitement SA		Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Wu et al., 2014)
<i>Saccharum</i> spp. Hybrids, Canne à sucre	Analyse <i>in-silico</i> , phylogénie, q-RT-PCR,	Induction de l'expression de NPR1 après traitement SA		Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(CHEN et al.)
Phalaenopsis aphrodite subsp. Formosana, Orchydée	Analyse <i>in-silico,</i> phylogénie, q-RT-PCR, mutation transitoire ????	Induction de l'expression de NPR1 après traitement SA, diminution de l'expression de <i>PR1</i> lorsque NPR1 est muté	50%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Chen et al. <i>,</i> 2013a)
Musa sapientum, Bananier	Analyse <i>in silico,</i> q-RT- PCR	Induction de l'expression de NPR1 après traitement SA pour <i>MNPR1B,</i>	47%A 48%B	Deux NPR1 identifiés MNPR1A et MNPR1B, qui possèdent un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Endah et al. <i>,</i> 2008)
<i>Musa</i> spp. ABB Dongguan Dajiao, Bananier	Analyse <i>in-silico,</i> phylogénie, q-RT-PCR	induction de l'expression e NPR1 après infection avec Fusarium oxysporum	61%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Zhao et al., 2009, 200)
Musa sapientum, Bananier	Expression hétérologue de <i>MNPR1A</i> et <i>MNPR1B</i> , dans un mutant <i>npr1</i> d' <i>Arabidopsis</i> q-RT- PCR	Induction de l'expression de <i>PR1</i> et résistance à <i>Pseudomonas syringae</i> restituée chez les plantes complémentées			(Yocgo et al., 2012)

Cocos nucifera, Cocotier	Analyse <i>in-silico,</i> phylogénie, q-RT-PCR	Induction de l'expression de NPR1 après traitement SA	47.70%	Possède un BTB/POZ, des répétitions ankyrines et un NLS	(Nic-Matos et al., 2017)
<i>Oryza sativa,</i> Riz	Surexpression de AtNPR1 dans le riz	La surexpression de AtNPR1 augmente la protection du riz vis à vis de Xanthomonas oryzae pv. oryzae			(Chern et al., 2001)
Oryza sativa, Riz	Mutation et surexpression de <i>OsNPR1</i>	La résistance à Magnaporthe grisea induite par le benzothiadiazole est diminuée lorsque OsNPR1 est muté et augmentée lorsqu'il est surexprimé			(Sugano et al., 2010)
Triticum æstivum, Blé	Surexpression de AtNPR1	Induction de l'expression de PR1 et augmentation de la résistance à Fusarium graminearum			(Makandar et al., 2006)

De manière générale, au moins un homologue de NPR1 a été identifié *in silico* chez chacune des espèces étudiées par homologie des séquences peptidiques. Les protéines ainsi identifiées possèdent les même domaines que ceux de NPR1 chez *A. thaliana*, à savoir un domaine BTB/POZ, des répétitions ankyrine et une séquence de localisation nucléaire NLS. L'expression du gène *NPR1* est induite après traitement au SA ou infection par un agent pathogène chez le caféier, l'aubergine, la patate douce, la moutarde brune, le tournesol, le cotonnier, le peuplier, le papayer, l'arachide pour les dicotylédones et chez la canne à sucre, l'orchidée, le bananier et le cocotier chez les monocotylédones. Lorsque le gène *NPR1* est surexprimé artificiellement par l'introduction d'une construction dans laquelle le gène *NPR1* est sous le contrôle d'un promoteur fort, l'expression du gène *PR1* rapporteur de l'activation de la voie impliquant le SA est augmentée chez la pomme de terre, l'oranger, le citronnier, la vigne, le pommier, le tabac et le cacaoyer pour les dicotylédones et chez le bananier et le blé pour les monocotylédones. Dans ce cas, une augmentation de la résistance face à certains agents pathogènes a aussi été constatée chez la pomme de terre, l'oranger, le citronnier, la vigne, le pommier, le tabac et le cacaoyer pour les dicotylédones.

Ainsi, la stratégie de sur-exprimer *NPR1* pourrait être utilisée dans le cadre du développement de nouvelles variétés d'espèces d'intérêt agronomique pour améliorer leur résistance aux maladies (Kuai et al., 2017; Kuai and Després, 2016; Silva et al., 2018). Par opposition, la mutation de *NPR1* induit une diminution de la résistance à certains agents pathogènes chez le glaïeul, le riz et le blé.

Des expériences d'expression hétérologue des gènes NPR1 du cacaoyer, du glaïeul, de la vigne, du soja et de la banane ont été effectuées dans un mutant *npr1 d'A. thaliana* et ont permis la

restauration des défenses. De plus il a été montré chez la moutarde brune, le pommier et le cacaoyer que NPR1 est adressée au noyau après stimulation avec du SA.

Il a pu donc être montré que le rôle de cette protéine ainsi que les mécanismes de monomérisation et d'adressage au noyau décrits chez *A. thaliana*, dans le cadre des défenses dépendantes du SA, ont été conservés au cours de l'évolution des plantes supérieures car on peut les retrouver autant chez les dicotylédones que chez les monocotylédones.

1.3.5 Une famille d'homologue chez les mammifères.

De manière intéressante, une famille de protéines présentant des similitudes de structure avec NPR1 est connue chez les mammifères, la famille REL/NF-kB. Cette famille est constituée de différentes protéines possédant les mêmes motifs que la famille NPR, à savoir un domaine RHD (Rel homology domain) de liaison aux facteurs de transcription à doigt de zinc en Nter, un NLS dans leur partie médiane et un domaine de répétitions ankyrine en Cter (Li and Verma, 2002). Ces protéines fonctionnent en synergie avec une famille d'inhibiteurs, les IkB (inhibiteur des NF-kB) qui possèdent un domaine de liaison protéine-protéine de répétitions ankyrines (Figure 22).



Figure 22 : Les membres des complexes NF-κB / I-κB. A Représentation des 5 membres de la famille NF- κB incluant les protéines Rel et lesp105/50 et p100/52 montrant leurs différents domaines. Les flèches au niveau de p105 et p100 montrent le site de clivage qui permet de les transformer respectivement en p50 et p52 ; RHD est le domaine d'homologie REL (équivalent BTB/POZ), NLS le signal de localisation nucléaire, TAD représente des domaines non homologues de transactivation, LZ un domaine Leucine zipper et ANK les domaines ankyrine répétés; B représentations des 4 membres de la famille Inhibiteur de NF- κB ; ANK représente les domaines ankyrine répétés. C représentation de NPR1 ainsi que de ses différents domaines. D'après (Li and Verma, 2002).

Ces différentes familles de protéines jouent un rôle dans l'immunité chez les mammifères par des mécanismes proches de ceux mis en place lors de l'immunité dépendante des NPR chez les plantes ainsi que de ceux décrits chez les insectes (Ghosh et al., 1998; Medzhitov and Janeway, 1997). Ceci suggère que l'immunité aurait évolué de manière convergente vers des mécanismes similaires entre les plantes et les animaux. De manière intéressante, il a été montré que dans des cellules humaines de type « glyoblastoma cell lines » exprimant le gène *BjNPR1* de la moutarde (*Brassica juncea*), la protéine BjNPR1 est capable de se fixer sur NF-KappaB conduisant à la répression des gènes contrôlés par NF-KappaB et donc de jouer le même rôle que la protéine IĸB (voir ci-dessous) (Kesanakurti et al., 2009).



Figure 23 : Schéma général de l'implication de la voie NF- κB/I-κB dans différents processus immunitaires. Différents stress comme la présence d'espèces réactives de l'oxygène, d'UV, une infection bactérienne ou virale ou bien la présence de cytokine, vont induire la monomérisation du complexe NF-κB/I-κB. I-κB est alors dégradé dans le protéasome et NF-κB est adressé au noyau ou il fait office de facteur de transcription et permet l'expression de gènes de défenses impliqués dans différentes réponses immunitaire comme l'inflammation, la migration cellulaire, la réparation des cellules ou l'activation des cellules immunitaires. D'après (Ghosh et al., 1998).

Chez les mammifères, lors d'une infection bactérienne aiguë, il se produit une réaction locale et/ou systémique caractérisée par l'augmentation de l'accumulation de cytokines, protéines pro-

inflammatoires indispensables pour les défenses anti-infectieuses, mais qui peuvent paradoxalement être responsables des manifestations cliniques et biologiques du choc septique. L'expression des gènes codant la plupart de ces protéines pro-inflammatoires est contrôlée par NF-κB (nuclear factor-kappa B), un complexe activateur transcriptionnel activant les régions promotrices des gènes codant pour ces protéines. Ce complexe NF-KB n'est pas seulement impliqué dans les processus inflammatoires suite à une infection bactérienne, mais aussi suite à différents stress biotiques conduisant à la transcription de différents gènes de défense en fonction du type de stress détecté (Ghosh et al., 1998; Schmilz, 1995; Verma et al., 1995) (Figure 23) et selon le type de cellule concernée (Figure 24). L'activation quasi immédiate du complexe NF-kB après la reconnaissance d'un « non-soi » infectieux nécessite un système de signalisation intracellulaire. Le complexe NF-KB est homo- ou hetérodimérique constitué de protéines appartenant à la famille des « Rel ». Chez les mammifères, cinq protéines de cette famille ont été décrites : p65 (REL-A), REL-B, c-REL, p50 et p52. Les protéines p50 et p52 sont issues d'une maturation par clivage de leurs précurseurs respectifs p105 et p100. La dimérisation du facteur NF-кВ est formée à partir d'une combinaison de ces différentes protéines (Figure 25). Le dimère NF-κB est produit de façon constitutive, mais reste inactif dans le cytoplasme du fait de sa liaison non covalente avec des IkBs (Zabel and Baeuerle, 1990). Il existe six protéines IkBs (Gilmore., 1993), mais seulement Ικβα, Ικββ et Ικβε sont connues pour contrôler l'activation transcriptionnelle par NF-κB en réponse à une stimulation cellulaire.



Figure 24 : Implication de la voie NF-κB dans différents processus immunitaire impliquant différents type de cellules, d'après (Sun, 2017).

Différents oligomères constitués de différentes NF-kB sont présents dans la cellule en absence de stress biotique. Chacun de ces oligomères est impliqué dans les défenses en réponse à différents stress. Il existe différentes voies de signalisations canoniques et non-canoniques impliquant différents complexes protéiques. Ainsi, lors d'une activation via la voie canonique des défenses cellulaires, le complexe impliqué est composé des deux protéines à domaines ankyrines P50 et I-kB et du facteur de transcription ReIA. En réponse à un stress, l'inhibiteur I-kB est ubiquitiné, puis adressé au protéasome, libérant ainsi le complexe P50-ReIA qui va migrer vers le noyau et induire la transcription de gènes de défense. Dans la première voie non canonique, l'activation d'un complexe composé d'une protéine à domaines ankyrines p100 et du facteur de transcription RELB s'effectue par le clivage de la protéine p100 en protéine p52 suivi de la migration du complexe p52/RELB vers le noyau et de l'activation de l'expression des gènes cibles. Dans la deuxième voie non canonique, l'activation d'un complexe composé de la protéine p105 en protéines à domaines ankyrines p105 et p50 s'effectue par le clivage de la protéine p105 en protéine p50 suivi de la migration du complexe p50/p50 vers le noyau et le recrutement d'un facteur de transcription conduisant à l'activation de l'expression des gènes cibles.



Figure 25 : Différentes voies de signalisation impliquant différents complexes NF-κB /I-κB ou NF-κB /NF-κB induisant l'activation des défenses cellulaires. La voie canonique implique la dégradation de l'inhibiteur I-κB alors que les autres voies non canoniques impliquent le clivage de p100 ou p105 en p52 ou p50. Ces dégradations ou clivage permettent l'adressage des facteurs κB au noyau permettant l'induction de différents gènes de défenses cellulaires en fonction des oligomères impliqués. D'après (Gilmore, 2006).

1.4 L'élicitation par les SDP et leur utilisation en protection des cultures

Depuis plusieurs années, l'agriculture est soumise à des orientations sociétales et politiques favorables à des pratiques agricoles plus durables et plus respectueuses de l'environnement, accompagnée par un contexte réglementaire de réduction de l'usage des intrants phytosanitaires

conventionnels. Dans ces conditions, le développement de produits dits « alternatifs » s'est fortement accéléré dans le domaine de la fertilisation et de la protection des cultures, avec notamment l'essor des produits de type Stimulateur de Défense des Plantes (SDP). En effet, ces derniers visent à améliorer le fonctionnement du sol, de la plante ou de l'interaction sol-plante par la stimulation des processus biologiques de l'agrosystème avec un mode d'action indirect sur le(s) facteur(s) affectant la production agricole. Ainsi, les biostimulants, utilisés dans le domaine de la nutrition ou de l'adaptation des plantes à leur environnement, peuvent être un moyen pour limiter les apports en engrais minéraux, dont l'apport massif conduit à des dérèglements environnementaux (appauvrissement de la qualité des sols, eutrophisation des milieux,...). De même, les SDP utilisés dans le cadre de la protection des plantes, constituent une option intéressante pour réduire l'utilisation de produits phytosanitaires « conventionnels » et optimiser les stratégies de biocontrôle. L'utilisation de SDP repose sur la capacité des plantes à se défendre contre un bioagresseur. Ces produits activent les différentes voies de défense de la plante et ainsi limitent l'infection par les agents pathogènes (Walters et al., 2005). Par exemple, l'application de chitosan, de sulfate de cuivre ou de laminarine active les défenses chez la vigne et permet ainsi d'induire une résistance plus forte à Botrytis cinerea (moisissure grise) et à Plasmopara viticola (Mildiou) (Aziz et al., 2003, 2006). L'utilisation de produits phytosanitaires conventionnels peut ainsi être réduite (Ahmad et al., 2010; Aziz et al., 2003; Benhamou and Rey, 2012; Renard-Merlier et al., 2007).

Certains SDP activent directement les défenses des plantes (éliciteurs, ex : Bion®) et d'autres ont un effet de potentialisation (potentialisateur : ex BABA). Ces deux types de SDP sont utilisés classiquement au moment de la phase végétative des plantes mais il est suggéré qu'ils pourraient être aussi utilisés en traitement de semence (Rajjou, 2006; Worrall et al., 2012). Il serait aussi possible de produire des graines déjà potentialisées en traitant les plantes mères, la potentialisation pouvant être conservée entre les générations (Luna et al., 2012; Luna and Ton, 2012). Dans le cas d'un éliciteur, les défenses des plantes se mettent en place rapidement après le traitement et l'expression des gènes connus pour être des marqueurs de défense est activée. Lorsqu'un potentialisateur est utilisé, les gènes marqueurs de défense ne sont pas exprimés et les réponses de défenses ne deviennent actives qu'après l'attaque d'un agent pathogène (Conrath et al., 2006). Les réponses et la résistance des plantes sont alors plus élevées chez les plantes potentialisées que chez les plantes non traitées. Les mécanismes sous-jacents à la potentialisation impliquent l'accumulation de PRRs et de MAP kinases, la méthylation de la lysine 4 dans l'histone H3 (Conrath et al., 2015). L'accumulation de métabolites différents suite à une potentialisation dépend du stimulus appliqué et de la plante traitée (Gamir et al., 2014). Il est important de comparer les couts énergétiques de l'activation ou la potentialisation des défenses vis-à-vis des bénéfices qu'elles apportent (Heil, 2001; van Hulten et al., 2006; Vos et al., 2013). Une plante ayant été traitée avec un potentialisateur répondra non seulement plus vite à

55

l'arrivée d'un agent pathogène mais le coût énergétique découlant de cette résistance sera aussi réduit (Martinez-Medina et al., 2016) (Figure 26).



Figure 26 : Schéma de la relation entre les réponses de défense (lignes pleines) et le coût énergétique (en pointillé) dans les plantes potentialisées (rouge) ou non (bleu) (Martinez-Medina et al., 2016). A : Maintien de la mémoire de la potentialisation ; B : Faible coût énergétique de la potentialisation ; C : Induction des défenses plus rapides et plus forte dans les plantes potentialisées à l'arrivé du stress. D : Bénéfice énergétique des plantes potentialisée par rapport à celles non potentialisées.

Le développement de SDP capables d'éliciter les défenses des plantes est donc une stratégie prometteuse dans le contexte agro-écologique actuel. Le marché de ces produits est en plein essor (+10% par an en Europe), porteur d'enjeux majeurs pour l'agriculture de demain, s'accompagnant d'un fort besoin de développement de nouvelles solutions mais également de nouvelles pratiques agricoles. Au-delà d'une certaine pression parasitaire, l'efficacité des SDP n'est pas suffisante et un traitement chimique d'appoint est recommandé (en mélange ou dissocié) (Marolleau et al., 2017). Ainsi afin de pouvoir intégrer l'utilisation de SDP dans une stratégie de protection efficace au champ, ces produits doivent être associés à des produits phytosanitaires conventionnels. Cependant, l'efficacité de ces produits reste erratique et leur utilisation compliquée du fait de la complexité de la mise en œuvre en conditions de production et de leur efficacité dépendante de nombreux paramètres agronomiques et environnementaux encore méconnus ou mal maîtrisés. Il n'existe à l'heure actuelle que peu de SDP homologués en France (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste de SDP commerciaux homologués en France et de leurs substances actives d'après ELICITRA

Matières actives	produits commerciaux Fournisseur Cibles		Cibles
COS-OGA	Pytosave Garden Messager	Jouffray Driaud Singenta	-mildiou, oïdium : vigne -oïdium : culture légumières
Laminarine	lodus 2 culture spécialisées lodus 2 céréales Vacciplant Jardin	Goëmar	-oïdium : vigne, blé, orge, fraise -piéti-verse, septoriose : blé -helminthosporiose : orge -mildiou : laitue -feu bactérien, tavelure : cultures fruitières et jardins
Phosphonate/ phosphites de potassium	Pertinan/ Etonan LBG-o1F34	De Sangosse	-mildiou : vigne et cultures légumières
Phosphonates de sodium	Redeli	Syngenta	-mildiou : vigne
Bacillus subtilis souche QST 713	Serenade Max Texio	Bayer SBM développement	-pourriture grise : vigne -cultures légumières ornementales, plantes à pafum, alimentaires, médicinales et condimentaires
Bacillus amyloliquefaciens souche MBI 600	Integral Pro	BASF	Traitement de semences : champignons autres que Pythiacées : crucifères oléagineuses
Cerevisiane	Actileaf Romeo	Agrauxine BASF	mildiou, oïdium, pourriture grise : vigne, culture légumières
Extrait de fenugrec	Stifenia	SOFT	-oïdium : vigne -traitement parties aeriennes : melon
Acybenzolar-S-méthyle	Bion WG	Syngenta	-traitement parties aeriennes : bananier, cultures ornementales -oïdium : blé -bactériose : tomate

1.5 Effet de la fertilisation azotée sur le développement des maladies

Les facteurs environnementaux sont connus pour influencer la capacité des plantes à mettre en place leurs défenses. Des conditions environnementales différentes peuvent influer sur les interactions entre les micro-organismes phytopathogènes, telles que le type de lumière (de Wit et al., 2013; Janda et al., 2015; Kazan and Manners, 2011; Mintoff et al., 2015), la nutrition minérale (Aznar et al., 2015; Kieu et al., 2012; Poschenrieder et al., 2006) ou la disponibilité de l'eau (Blumenthal et al., 2009a). L'impact de la quantité d'engrais, en particulier de la fertilisation azotée, sur l'interaction entre les phytopathogènes et les plantes est bien documenté (Eyles et al., 2007a; Fagard et al., 2014; Pato and Obeso, 2013; Shaner and Finney, 1977; Veresoglou et al., 2013a).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons particulièrement à l'impact de la fertilisation azotée.

1.5.1 Un facteur abiotique d'importance, la disponibilité de l'azote

L'azote est un élément essentiel à la vie et au développement des plantes. L'azote est présent dans le sol, sous des formes minérales (nitrate ou ammonium) ou sous forme organique (acides aminés, urée). Les plantes absorbent ces différentes formes d'azote par l'intermédiaire de leurs racines. Beaucoup de composés organiques présents dans les plantes contiennent de l'azote tel que les protéines et les acides nucléiques. L'oxygène, le carbone et l'hydrogène sont les seuls éléments qui sont plus abondants que l'azote dans les plantes (Taiz and Zeiger, 2002).

L'azote se trouve sous diverses formes dans la biosphère, mais la plus importante, le diazote atmosphérique N_2 n'est pas directement assimilable par les plantes. Elles sont capables d'assimiler essentiellement les formes inorganiques que sont l'ammonium (NH_4^+) et le nitrate (NO_3^-). Certains acides aminés peuvent aussi être absorbés par les racines (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Différents facteurs comme les précipitations, le vent, le type de sol, le type de culture précédemment effectuée sont à l'origine d'une variation spatiale ou temporelle dans la quantité d'azote disponible dans les sols.

La fertilisation azotée se fait le plus souvent sous la forme de nitrates afin d'assurer les rendements car l'ammonium en trop forte concentration peut être toxique (Hirel et al., 2007). Tous les nitrates apportés par les fertilisants ne sont pas absorbés par les plantes et la partie non assimilée de ces nitrates est lessivée par l'action du drainage et se retrouve dans les eaux souterraines. Ainsi, les eaux souterraines, les rivières ou encore les mers se retrouvent polluées par les nitrates, ce qui peut constituer un danger pour la santé humaine et induire la prolifération d'algues qui mettent en danger les écosystèmes. Ceci montre l'importance de réduire les apports d'azote afin de maintenir un environnement de qualité.

Les légumineuses sont capables d'établir une symbiose avec des bactéries (les *Rhizobia*) dans des organes spécifiques, les nodules, situés au niveau de leurs racines. Ces bactéries sont capables de prélever le N₂ atmosphérique et de le fixer sous forme d'ammonium, forme assimilable par les plantes. La culture des légumineuses ne requiert donc que peu ou pas de fertilisation en azote. Chez les autres plantes les étapes clé de l'assimilation des nitrates ou de l'ammonium ont été décrites.

Les plantes possèdent deux systèmes de transport du nitrate différents qui permettent son absorption racinaire et sa redistribution dans la plante (Daniel-Vedele et al., 1998; Kiba and Krapp, 2016). La famille des gènes *NRT1* code pour des transporteurs permettant l'absorption des nitrates dans le cas où la concentration en nitrate disponible est forte. Ils ont une faible affinité pour le nitrate et font partie du système « Low Affinity Transport System » (LATS). Les gènes de la famille *NRT2* codent pour des transporteurs à forte affinité pour les nitrates et permettent donc l'absorption des nitrates lorsqu'ils sont en faible quantité disponible dans le sol. Ils font partie du système « Hight Affinity Transport System » (HATS). L'ammonium est quant à lui absorbé au niveau des racines par les transporteurs codés par les gènes de la famille *AMT* (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

Une fois absorbé, le nitrate est assimilé en différentes étapes. La première correspond à la réduction de celui-ci en nitrite par la nitrate réductase (NR)

 $NO_3^- + NAD(P)H + H^+ \Leftrightarrow NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O$

La quantité de nitrate absorbée, la lumière et la quantité de sucres présents font varier l'expression des gènes codant pour la NR. Ces mêmes facteurs activent une phosphatase qui va déphosphoryler des résidus sérine sur la NR et ainsi l'activer. L'obscurité et le Mg²⁺ vont au contraire activer une kinase qui va phosphoryler ces mêmes résidus et ainsi inactiver la NR (Campbell, 1999).

La deuxième étape permet la conversion de nitrite en ammonium grâce à l'action de la nitrite réductase (NiR). Cette enzyme utilise le nitrite présent dans le cytosol et le transforme en ammonium dans les chloroplastes au niveau des feuilles et dans les plastes au niveau racinaire :

$$NO_2^-$$
 + 6 (ferrédoxine réduite) + 8H⁺ + 6 e⁻ \Leftrightarrow NH_4^+ + 6 (ferrédoxine oxydée) + 2 H₂O

La transcription des gènes codant pour la NiR est activée par les nitrites et la lumière, elle est réprimée par la glutamine (Vincentz et al., 1993).

L'ammonium étant toxique pour les plantes en grande quantité, celui-ci et rapidement assimilé à l'aide de la glutamine synthétase (GS) et de la glutamate synthase (GOGAT).

La GS permet l'incorporation des ions ammoniums dans les molécules de glutamate, formant ainsi une molécule de glutamine. Les glutamines ainsi formées réagissent avec des molécules de 2oxoglutarate pour former deux molécules de glutamate, cette réaction est catalysée par la GOGAT. Le glutamate est ensuite utilisé pour la formation de différents acides aminés (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

1.5.2 La fertilisation en azote joue sur les interactions plantes/agents pathogènes

L'impact de la fertilisation par les nitrates peut engendrer des niveaux de pression opposées en fonction du couple plante / agent pathogène impliqué (Dordas, 2008). En effet, un faible apport en nitrate augmente la sensibilité à *E. amylovora* et diminue la sensibilité à *B. cinerea* chez *A. thaliana* (Fagard et al., 2014). On sait que la fertilisation a un impact sur la physiologie des plantes (Kong et al., 2017; Mozafar, 1993; Tian et al., 2008; Walters et al., 2011; Xu et al., 2012) et sur l'activation des défenses (Kutyniok and Müller, 2013; Zarattini et al., 2017) mais peut également avoir un impact sur l'agressivité de l'agent pathogène (Robert et al., 2004; Sauge et al., 2010). Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels la fertilisation influe sur les défenses végétales apparait donc nécessaire pour améliorer les pratiques culturales afin d'optimiser la fertilisation et de réduire l'utilisation des pesticides, (Khan et al., 2016; Mitchell et al., 2016; Schwessinger et al., 2015). Plus précisément, la nutrition minérale, et principalement la nutrition azotée, comme précédemment mentionné, joue un rôle majeur dans l'établissement des mécanismes de défenses végétales.

1.6 Effet du stade de développement de la plante sur le développement des maladies

Il est connu que le stade de développement de la plante influe sur la mise en place des défenses (Develey-Rivière and Galiana, 2007) mais peu d'études ont mesuré cet impact sur *A. thaliana*. En effet, la plupart des études réalisées sur l'impact des maladies sur *A. thaliana* se font à un stade unique de développement de la plante. Selon le pathosystème envisagé l'infection se fait préférentiellement à un stade donné. Il a ainsi été montré, par exemple, que les champignons du genre *Alternaria* sont des agents pathogènes qui s'attaquent à la graine (Guillemette et al., 2004). Une autre étude a montré que la présence de *Pseudomonas aeruginosa* (une bactérie pathogène de l'homme) limite la germination d'*A.thaliana* (Chahtane et al., 2018). L'impact des pathogènes est aussi mesuré lors des phases tardives du développement de la plante. En effet l'impact des pathogènes sur la phase de sénescence d'*A. thaliana*, à laquelle elle remobilise ses nutriments pour la production de graines, a longuement été étudié (Häffner et al., 2015).

Il a aussi été montré que la maladie peut avoir un impact sur les processus de développement des plantes. L'infection par *Pseudomonas syringae, Xanthomonas campestris,* et *Hyaloperonospora parasitica* induit une accélération de la phase reproductive d'A.thaliana et une augmentation du nombre de hampes florales secondaires (Korves, 2003).

Chez la vigne, selon l'étage foliaire et donc l'âge de la feuille, l'infection par *Plasmopara viticola* n'a pas le même impact. En effet, plus la feuille infectée est âgée, moins l'oomycète est capable de se développer. Ce phénomène est amplifié lorsque les plantes sont traitées avec un éliciteur de défense connu, la laminarine (Steimetz et al., 2012).

Des études sur l'évolution au cours du temps de l'impact d'un agent pathogène sur les différents stades de développement ont aussi été réalisées, par exemple l'impact d'*Alternaria brassicicola* sur *A. thaliana* (Pochon et al., 2012) a montré que ce champignon peut être transmis à la génération suivante.

60

A ma connaissance, il n'y a que peu d'études dans la littérature qui mesurent l'impact du stade de développement de la plante sur les mécanismes de défense en effectuant des infections à différents stades. Il a ainsi été montré que les réponses chimiques du plantain (*Plantago lanceolata*) induites par des insectes herbivores varient en intensité en fonction du stade de développement. L'accumulation de composés toxiques est plus forte chez les plantes matures que chez les plantes juvéniles face à ces insectes herbivores (Quintero and Bowers, 2011).

Ces études suggèrent que le stade de la plante aurait un impact sur l'activation des défenses suite à l'infection par un agent pathogène. Il s'avère donc intéressant d'étudier l'impact du stade de développement de la plante sur l'activation des défenses après un traitement avec des SDP.

1.7 Objectifs de la thèse

L'utilisation de SDP repose sur la capacité des plantes à se défendre contre un bioagresseur. Ces produits activent les différentes voies de défense de la plante et ainsi peuvent limiter l'infection par les agents pathogènes. L'utilisation de produits phytosanitaires conventionnels peut ainsi être réduite (Aziz et al, 2003 ; Benhamou et Rey, 2012). Le développement de SDP capables d'éliciter les défenses des plantes est donc une stratégie prometteuse dans le contexte agro-écologique actuel car ils peuvent contribuer à la gestion de la résistance ou à la réduction des PPP instaurée par la directive européenne 2009/128/CE dans le cadre d'action communautaire (déclinée en France par le plan Ecophyto). Or, ceux-ci ne peuvent être évalués en utilisant la méthodologie classique dédiée aux produits phytopharmaceutiques (PPP) conventionnels. En raison de leur mode d'action indirect, ils doivent démontrer d'une part leur non ou faible activité biocide et d'autre part leur action de protection contre les parasites et les maladies en utilisant l'activation des mécanismes de défense des plantes. En outre, l'homologation des SDP dépend du règlement (CE) N°1107/2009 relatif aux produits phytopharmaceutiques. Ainsi, ils doivent démontrer un minimum d'efficacité, comparable à l'efficacité des PPP déjà sur le marché, dans les conditions de production des cultures. Or, ces produits, utilisés seuls ne sont pas aussi efficaces que les PPP conventionnels, pour cela ils sont souvent utilisés en combiné avec des PPP et permettent d'en diminuer les doses appliquées. Il est donc nécessaire de développer une méthode d'évaluation des SDP qui soit spécifiques à ces produits. Dans ce contexte, une méthode française dédiée à l'évaluation des stimulateurs des défenses des plantes portée par la CEB et soutenue par l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail) a été délivrée début 2016 (MG 14, Principes généraux d'expérimentation de stimulateurs des défenses des plantes).

L'efficacité des SDP dépend de leur capacité à activer les défenses. Au champ, aucun outil n'est disponible, à l'heure actuelle afin de vérifier qu'ils ont bien activé les défenses. Ainsi, il est possible que la variabilité constatée dans leur efficacité au champ soit expliquée par le fait que dans certaines conditions ils n'activent pas les défenses. Il s'avère donc indispensable de disposer d'un outil de détection de l'activation des défenses pour le suivi de l'efficacité des SDP sur le terrain au cours du temps et l'adaptation des programmes de traitements qui en découle.

L'efficacité de ces SDP à activer les défenses dépend de plusieurs paramètres dont certains sont cruciaux. Le stade de développement de la plante auquel ces composés sont appliqués est un facteur clé (Steimetz *et al*, 2012). Par ailleurs, les conditions environnementales affectent la réceptivité des plantes aux SDP (Dietrich *et al*, 2005). De plus, les réponses aux SDP dépendent des génotypes considérés (Bruce, 2014). Enfin, la nutrition minérale, et essentiellement la nutrition azotée, joue un rôle majeur dans la mise en place des défenses (Dietrich *et al*, 2004 ; Fagard *et al*, 2014). Il est donc nécessaire d'étudier l'impact de ces 2 facteurs clés sur l'efficacité des SDP pour identifier les conditions optimales de leur utilisation. Afin de pouvoir évaluer l'efficacité des SDP, des outils de détection efficaces, rapides et peu coûteux sont requis.

Dans ce projet de thèse, une étude de l'effet du stade de développement et de la fertilisation azotée, sera mise en place. Ce projet a deux objectifs principaux :

1- Développement d'outils de diagnostic simples et fiables de détection des réponses de défense.

2- Compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place des défenses à différents stades de développement suite à des traitements SDP en fonction de la fertilisation azotée.

1.7.1 Objectif 1 : Développement d'outils simples et fiables de détection des réponses de défense des plantes.

1.7.1.1 Kit de détection de réponse de défense « terrain »:

Ce projet a pour ambition de créer un outil d'aide à la décision (OAD) à la fois pour l'expérimentation mais également à plus long terme pour l'utilisation des SDP dans les programmes de protection intégrée des cultures (conseillers agricoles et/ou agriculteurs). Cet outil et basé sur un test immunologique, il permettra le suivi de l'efficacité des SDP sur le terrain au cours du temps et l'adaptation des programmes de traitements qui en découle.

1.7.1.2 Kit de détection de réponse de défense au « laboratoire »:

Le principe de ce test est d'utiliser des plantes exprimant un gène rapporteur codant une ßglucuronidase, le gène *GUS*. Celui-ci a été fusionné au promoteur d'un gène connu pour être activé par le SA (Shapiro et Zhang, 2001) et par certains SDP, le gène *PR1*. L'utilisation de ce test permettra de manière rapide de cribler des SDP qui sont capables d'activer les défenses en visualisant facilement les sites d'expression du gène *PR1*.

1.7.2 Objectif 2 : Compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place des défenses à différents stades de développement suite à des traitements SDP, en fonction de la fertilisation azotée.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la mise en place des défenses à différents stades de développement, les traitements seront effectués depuis la graine jusqu'au stade reproductif. Différentes conditions de nutrition azotée seront utilisées pour déterminer l'impact de cet intrant sur la réceptivité aux SDP. L'efficacité des SDP sera estimée par plusieurs paramètres (activation des défenses, protection contre des agents pathogènes) en conditions contrôlées et au champ.

Partie 2. Résultats

Chapitre 2. ELICITEST

2.1 Stratégie de conception des anticorps

Afin d'étudier l'implication de la protéine NPR1 dans la mise en place des défenses induites par les SDP, des anticorps spécifiques de la forme monomérique donc potentiellement active de NPR1 ont été développés durant cette thèse. Comme décrit précédemment, la protéine NPR1 est impliquée dans les deux voies de défenses impliquant le SA ou le JA. Cette protéine est conservée au sein du règne végétal. La méthode d'obtention de ces anticorps a été développée de manière à créer des anticorps reconnaissant uniquement la forme active de NPR1 chez différentes espèces végétales (Figure 27). La stratégie développée afin d'obtenir ces anticorps a été protégée par le dépôt d'une enveloppe SOLEAU auprès de l'INPI (institut national de la protection intellectuelle), puis par le dépôt d'un brevet.



Figure 27 : Représentation du fonctionnement théorique des anticorps développés selon la méthode décrite dans le brevet. A gauche, les défenses ne sont pas activées, NPR1 est donc sous forme oligomérique, l'anticorps n'est donc pas capable de s'y hybrider et donc aucun signal n'est détectable par les méthodes de biochimie classique. A droite, les défenses sont activées par un stress biotique ou un SDP, NPR1 est sous sa forme monomérique, l'anticorps est donc capable de s'y hybrider et permet l'obtention d'un signal par les techniques de biochimie classiques et donc de mettre en évidence l'activation des défenses. TRX : thioredoxine. Afin de créer cet anticorps, nous avons tout d'abord effectué un alignement multiple à partir des séquences peptidiques des protéines NPR1 de la betterave, la luzerne, du cotonnier, du cacaoyer, de la tomate, de la pomme de terre, du ricin, du piment, du peuplier, du tabac, de la patate douce, de la papaye, de la vigne, de la moutarde brune, du colza, du pommier et d'*A. thaliana* pour le pep0 et uniquement (Figure 28).





La partie de la protéine qui est en interaction avec d'autres monomères et donc inaccessible au solvant sous sa forme oligomérique a été délimitées en se basant sur la région correspondante chez *A. thaliana* (entre la cystéine 82 et la cystéine 216 d'après Mou et al., 2003a). Ainsi, un anticorps ciblant spécifiquement cette région ne devrait reconnaître que la forme active monomérique de NPR1 (Figure 27). Une séquence peptidique dégénérée (peptide 0) la plus antigénique possible a donc été créée en se basant sur cet alignement de manière à couvrir le plus de séquences différentes possibles de NPR1 (Figure 28). Ce peptide, constitué de 14 résidus, possède deux acides aminés (aa) variables en position 6 (V ou I) et 12 (S ou P) qui lui permettent de correspondre aux séquences des 22 séquences protéiques utilisées de manière suffisante pour permettre de développer des anticorps polyclonaux spécifiques de ces protéines. Une deuxième séquence peptidique a également été développée mais sera moins utilisée car la séquence de ce peptide couvre moins de séquences des différentes protéines NPR1 (peptide 1). Les peptides synthétiques ont été injectés dans le lapin. Cela a permis d'obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre ces peptides. Les détails sur la conception et la validation de ces anticorps ainsi que leur méthode d'obtention sont décrits dans la partie suivante.

2.2 Conception des antipeptides anti NPR1

Des peptides dégénérés consensus d'une douzaine d'acides aminés ont été définis sur la base de l'alignement des différentes protéines NPR1 des principales espèces de plantes d'intérêt agronomique. La séquence du peptide 0 correspond à une séquence consensus inter-espèces (Figure 29) et le peptide 1 correspondant et à une séquence consensus s'alignant sur moins d'espèces ont été synthétisés par une entreprise spécialisée (GENEPEP SA, 12 rue du Fer à Cheval, 34430, St-Jean-de-Védas, FRANCE). Ces peptides ont ensuite été injectés chez le lapin (GENEPEP SA) afin de produire des anticorps (antipeptides 0 & 1).



Figure 29 : Alignement de la séquence du peptide 0 avec les séquences de la zone de NPR1 correspondante chez les plantes étudiées.

2.3 Tests de spécificité et de validité de l'anticorps

Afin de tester la spécificité de l'anticorps et sa capacité à reconnaître la protéine NPR1 dans des extraits de plantes, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre.

2.3.1 Tests d'hybridation de l'anticorps sur la protéine NPR1 recombinante

Nous avons choisi de produire différentes portions de la protéine NPR1. Pour cela, trois différentes parties du gène *NPR1* ont été clonées dans un vecteur d'expression de manière à surproduire les protéines correspondantes afin de tester la spécificité des anticorps anti NPR1. Ainsi, une construction a permis d'obtenir la protéine NPR1 entière de 617 acides aminés (68,85 kDa) que nous appellerons forme totale (prot T dans le reste du document). Deux autres constructions ont été réalisées de manière à obtenir deux versions de la séquence N-terminale contenant les Cystéines 82 et 216 impliquées dans l'oligomérisation et contenant la séquence des peptides utilisés pour synthétiser l'anticorps. La première construction a permis de produire une protéine partielle (prot P) de 274 acides aminés (30,48 kDa) correspondant aux 250 acides aminés de l'extrémité N-terminale de NPR1. La deuxième construction a permis de produire une protéine de 163 acides aminés (18,26 kDa)

qui contient uniquement la partie inaccessible de NPR1 lorsque celle-ci est sous sa forme oligomérique soit les 134 acides aminés situés entre la cystéine 82 et la cystéine 216 de NPR1 (appelée prot I pour protéine d'intérêt). Ces trois constructions ont été conçues en intégrant, en 5' de leur séquence, la séquence permettant le clonage par la technique Gateway ainsi que les séquences permettant d'intégrer une étiquette histidine ainsi qu'une séquence de clivage spécifique par la protéase Tobacco Etch Virus (TEV) permettant la purification des protéines et de retirer l'étiquette histidine après purification (Figure 30, Figure 31)



Figure 30 : Alignement des trois protéines recombinantes construites à partir de la protéine NPR1 d'*A. thaliana*. Les différents domaines de NPR1 ont été annotés. Les cystéines 82 et 216 encadrées en rouge sont les cystéines impliquées dans la dimérisation de NPR1 (Mou et al., 2003b). Alignement effectué à l'aide du logiciel Jalview.



Figure 31 : Représentation schématique des peptides utilisés pour produire les anticorps et des trois protéines recombinantes. Alignement des peptides utilisés pour produire les anticorps avec la protéine consensus (en jaune) ainsi que des trois protéines recombinantes construites à partir de la protéine NPR1 d'*A. thaliana* (en bleu). Le rectangle bleu clair représente le His-tag, le rectangle violet, les acides aminés découlant de la séquence permettant le clonage par la méthode gateway et le rectangle vert la séquence permettant le clivage par la protéase TEV. Les lignes en pointillés rouges représentent les positions des cystéines 82 et 220 impliquées dans la dimérisation de la protéine.

Ces trois constructions ont été obtenues et validées par séquençage.

Les cultures bactériennes exprimant ces 3 constructions ont été traitées à l'IPTG afin d'induire l'expression des gènes sous le contrôle du promoteur β -gal et assurer une production de protéines en quantité importante.



Figure 32 : Détection des différentes protéines recombinantes par un anticorps anti étiquette histidine en WB. A : Western blot suite à l'hybridation avec l'anticorps anti-His. B : Coloration au bleu de Coomassie du gel contenant les mêmes échantillons et ayant subi l'électrophorèse dans la même cuve. La flèche rouge indique la taille de la protéine T, la flèche verte celle de la protéine P et la flèche orange celle de la protéine I. Les puits T correspondent à l'échantillon total après lyse des bactéries, les puits C correspondent aux culots obtenus après centrifugation des échantillons re-suspendus dans du Laemmli. Les puits S correspondent au surnageant récupéré après centrifugation des échantillons totaux. Lad : marqueur de poids moléculaire.

Des westerns-blots (WB) ont permis d'observer les profils protéiques issus de ces constructions et reconnus par l'anticorps anti-His (Figure 32). Les extraits correspondant à la protéine totale présentent plusieurs bandes. Une bande de taille attendue 66 KDa et plusieurs bandes de tailles plus petites provenant probablement de la dégradation de la protéine entière. Les extraits correspondant à la protéine P présentent plusieurs bandes. Une bande à la taille attendue 30,5 Da et plusieurs bandes probablement issues de sa dégradation. Les extraits correspondant à la protéine I présentent 1 bande à la taille attendue de 18,3 kDa. Aucune bande n'est détectée dans les surnageant de culture indiquant qu'il est nécessaire de lyser les cellules bactériennes pour extraire les protéines (Figure 32). Deux anticorps spécifiques de la protéine NPR1 ont été obtenus auprès du Pr X. Dong et du laboratoire privé Agrisera et sont utilisés dans cette thèse (voir Matériel et méthode). Afin de déterminer si notre anticorps antipep0 est capable de reconnaitre les protéines NPR1 recombinantes, les profils d'hybridation de cet antipep0 sont comparés à ceux obtenus avec l'anticorps anti étiquette Histidine sur les protéines recombinantes. Les deux profils obtenus sont similaires et l'antipep0 est aussi capable de détecter les protéines recombinantes à la leurs tailles attendues (Figure 33)



Figure 33 : WB sur protéines recombinantes issues de NPR1. Détection des cibles de l'anticorps anti étiquette histidine et de l'antipep0 en Western blot sur les extraits d'*E. coli* possédant les constructions permettant la production des protéines recombinantes T, P et I. La flèche rouge montre la taille de la protéine T (66 KDa), la flèche verte celle de la protéine P (30,5 KDa) et la flèche orange celle de la protéine I (18,3 KDa). Lad : marqueur de poids moléculaire.

Afin de déterminer si les anticorps anti-NPR1.com et anti-NPR1.XD sont capables de reconnaitre les protéines NPR1 recombinantes, les profils d'hybridation de cet anti-pep 0 sont comparés à ceux obtenus avec l'anticorps anti étiquette Histidine sur les protéines recombinantes. Ces deux anticorps sont capables de détecter la protéine P et seul l'anti-NPR1-XD est capable de s'hybrider sur la protéine I (Figure 34).


Figure 34 : Détection des protéines recombinantes P et I en WB en utilisant l'anti-NPR1.com, l'anti étiquette histidine et l'anti-NPR1 fourni par Prof. Xinian Dong. La flèche verte montre la taille ou la protéine P est attendue et la flèche orange là où la protéine I est attendue. Lad : marqueur de poids moléculaire.

2.3.2 Hybridation de l'anticorps sur des extraits végétaux



Figure 35 : Détection des cibles de l'antipeptide 0 en WB sur des extraits d'*A. thaliana* **cultivées en terre et traitées avec du Bion®, du SA et de l'eau.** Les plantes Col0 d'*A.thaliana* de 5 semaines ont été cultivées en terre, pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide de l'anticorps antipep0.

L'objectif était de déterminer si les anticorps, produits par la méthode développée, permettent de détecter une forme monomérique de NPR1. Deux méthodes différentes peuvent être utilisées afin d'obtenir cette forme monomérique de NPR1 : une méthode *in-planta* consistant à traiter les plantes avec un éliciteur de défense avant l'extraction des protéines et une méthode *in-vitro* consistant en Partie 2. Résultats

l'ajout d'un réducteur de pont disulfure, le dithiothréitol (DTT) décrit comme capable d'induire la monomérisation de NPR1 directement sur les extraits de plantes (Mou et al., 2003a). Des westerns blots ont donc été réalisés à partir d'extraits de plantes d'*A. thaliana* traitées avec du Bion[®], du SA, ou de l'eau. Ces mêmes extraits ont aussi été traités avec du DTT afin de forcer la monomérisation de NPR1. Dans les WB effectués avec les extraits de plantes traités avec du Bion[®] ou du JA, une bande est détectée par l'anticorps antipep0 lorsque les plantes sont traitées par des activateurs de défense et n'est pas détectée lorsque les plantes sont traitées avec de l'eau. Cette bande est détectée à une taille de 38 kDa (Figure 35). Dans les WB effectués avec les extraits protéiques traités au DTT aucune bande n'est détectée ni par l'antipep0, ni par l'antiNPR1-X.D (Données non montrées). Les extraits protéiques traités au DTT montrent des profils protéiques non dégradés en coloration au rouge ponceau (Données non montrées). Ceci suggère que dans nos conditions le traitement au DTT induit une dégradation du monomère de NPR1.

Afin de déterminer si les profils d'hybridation de notre anticorps antipep0 sur plantes traitées avec des stimulateurs de défense sont similaires aux profils d'hybridation par l'anticorps commercialisé par l'entreprise Agrisera (anti-NPR1com), les mêmes échantillons ont été utilisés pour réaliser des WB. L'anticorps antipep0 révèle une bande à 38 kDa dont l'intensité augmente dans des plantes traitées au méthyl jasmonate et au SA. L'anticorps anti-NPR1.com révèle deux bandes dont l'intensité augmente dans les échantillons traités traitées au méthyl jasmonate ou au SA : une bande à 38 kDa et une autre à 55 KDa (Figure 36). Ces résultats suggèrent que l'antipep0 et l'anticorps anti-NPR1.com reconnaissent une même protéine de taille 38 KDa. Etant donné que l'anticorps anti-NPR1.com est considéré comme spécifique d'NPR1 (https://www.agrisera.com/en/artiklar/npr1-nonexpresser-of-pr-genes-1.html), il est probable que l'antipep0 que nous avons généré reconnaisse spécifiquement NPR1.



Figure 36 : Comparaison des profils obtenus en WB avec l'anti-NPR1.com et l'antipep0. Les plantes Col0 d'*A.thaliana* de 5 semaines ont été cultivées en terre, pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis les WB ont été réalisés à l'aide des anticorps indiqués. Les colorations au bleu de Coomassie des membranes correspondantes au niveau de la RuBisCo sont montrées.

2.3.3 Identification des protéines extraites du gel d'acrylamide par spectrométrie de masse

Afin de déterminer si la bande détectée par WB avec l'anticorps antipep0 contient la protéine NPR1, nous avons identifié les protéines situées au niveau de cette bande par spectrométrie de masse. Pour cela, les mêmes échantillons ont été soumis à une électrophorèse simultanément sur deux gels différents dans la même cuve d'électrophorèse afin de s'assurer que la migration est identique. Le premier gel a été soumis à transfert puis hybridation par l'antipep1. Le second gel contenant les mêmes échantillons a été utilisé pour extraire les bandes correspondant aux zones auxquelles l'antipep0 s'est hybridé après avoir superposé le WB sur le gel d'acrylamide. Ces bandes ont été découpées pour permettre l'identification des protéines qu'elles contiennent par la plateforme PAPPSO (UMR Génétique Quantitative et Evolution - le Moulon, PAPPSO, Ferme du Moulon, 91190 Gif sur Yvette). Entre 100 et 160 protéines sont alors identifiées au niveau des bandes détectées par WB dont la protéine NPR1 (Annexe 1). NPR1 est donc bien présente au niveau de la bande détectée par WB (à la taille de 38 kDa).

2.3.4 L'immunisation avec différents peptides synthétiques permet d'obtenir différents antipeptides détectant la même bande

Afin de savoir si les anticorps générés à partir de deux peptides situés dans la même région de NPR1 (pep0 et pep1, Figure 31) permettent de détecter la même forme de NPR1, des WB sur les mêmes échantillons ont été réalisés avec les anticorps antipep0 et antipep1. Les anticorps obtenus de cette manière permettent de détecter une bande à la même taille en WB sur des extraits protéiques d'*A. thaliana* élicités par un SDP ou une molécule élicitrice des défenses des plantes Figure 37.



Figure 37 : Comparaison des profils obtenus en WB avec antipep0 et antipep1. Les plantes Col0 d'*A.thaliana* de 5 semaines ont été cultivées en terre, pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide des anticorps antipep0 et antipep1. Lad : Marqueur de poids moléculaire.

2.3.5 Variation de la taille de la bande détectée par l'antipep0

Comme précisé plus haut, et de manière étonnante, la bande correspondant à la protéine hybridée par les antipeptides est retrouvée à une taille de 38 kDa chez *A. thaliana.* La protéine NPR1 sous sa forme monomérique a été décrite à une taille de 65 kDa chez *A. thaliana*, ce qui correspond à la taille attendue par analyse informatique (NCBI). Cependant, par souci de rigueur, nous appellerons la protéine détectée Protéine de Défense NPR1 Like de 38 kDa PDNL38 dans la suite du manuscrit1.



Figure 38 : Comparaison des profils obtenus en WB avec des plantes cultivées dans des conditions différentes. Les plantes Col0 d'*A.thaliana* ont été cultivées en terre pendant 5 semaines. Les plantes Col0 d'*A.thaliana* ont été cultivées *in-vitro* pendant 3 semaines. Elles ont été pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide de l'anticorps antipep0. La coloration au rouge ponceau de la membrane correspondante est montrée. Lad : Marqueur de poids moléculaire.

Les antipeptides révèlent la plupart du temps deux bandes de taille très proche et ces bandes sont retrouvées autour de 38 kDa dans de multiples expériences en utilisant de multiples extraits d'*A.thaliana* différents.

Afin de tester si le mode de culture est le facteur expliquant la taille inattendue de 38 kDa de la bande, d'autres expérimentations ont été réalisées avec du matériel végétal obtenu à partir de culture en terre et *in-vitro*. Ces WB ont été effectués en utilisant antipep0. Une seule expérience a permis de mettre en évidence une bande à 65 kDa qui pourrait correspondre à la protéine NPR1 totale. Dans cette expérience, des plantes cultivées *in vitro* ont été utilisées avec le tampon habituel. La bande détectée est alors plus intense lorsque les plantes sont traitées au SA que lorsqu'elles sont traitées à l'eau (Figure 38). Ceci suggère que la protéine détectée cette fois ci est bien la forme monomérique de NPR1 décrite dans la littérature.

2.3.6 Analyse des profils protéiques des mutants npr1

Afin de tester la spécificité de l'anticorps antipep0, deux mutants *npr1* ont été utilisés.

Le mutant *npr1.1* (NASC ID N3726) dans un fond Col0 a été cultivé en terre afin d'en extraire les protéines et d'effectuer des westerns blots avec l'anticorps antipep0. L'anticorps antipep0 révèle une accumulation de la bande à 38 KDa aussi bien chez le mutant *npr1.1* que chez les plantes sauvages traitées avec du SA ou du MeJA. Une bande d'une taille d'environ 38 kDa s'accumule dans les mêmes conditions lorsque l'anticorps anti-NPR1.com est utilisé. L'anticorps anti-NPR1.com met en évidence une autre bande d'une taille d'environ 55 kDa qui n'apparaît pas avec l'antipep0. Ces résultats indiquent que l'antipep0 détecte des bandes à la même taille que l'anticorps anti-NPR1.com chez les plantes sauvages et chez le mutant *npr1.1* (Figure). La présence de cette bande à 38 KDa suite à un traitement SA ou MeJA chez le mutant *npr1.1* peut s'expliquer par le fait que la mutation est ponctuelle chez ces plantes. La protéine est peut-être traduite mais non fonctionnelle.



Figure 39 : Comparaison des profils obtenus en western blot avec des plantes Col0 et *npr1.1* **cultivées dans des conditions différentes.** Les plantes Col0 et *npr1.1* d'*A.thaliana* ont été cultivées en terre pendant 5 semaines. Les plantes Col0 et *npr1.1* d'*A.thaliana* ont été cultivées *in-vitro* pendant 3 semaines. Elles ont été pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide de l'anticorps antipep0. La coloration au bleu de Coomassie au niveau de la RuBisCo des membranes correspondantes est montrée.

Un autre mutant *npr1* dans un fond Ler a été utilisé, le mutant *npr1-71*. Ce mutant possède un transposon dans le premier exon de la séquence codant pour la protéine NPR1. Bien que plusieurs bandes d'intensité assez faible soient détectées dans les plantes Ler et *npr1-71*, les traitements par le SA ou par le MeJA ne provoquent pas l'accumulation d'une bande située autour de 38 KDa détectée par l'anticorps antipep0 (Figure 40). Il n'est donc pas possible de conclure quant à la capacité de cet anticorps à reconnaître la protéine NPR1 chez les plantes Ler.



Figure 40 : Comparaison des profils obtenus en western blot avec des plantes Col0, Ler et *npr1.71* Les plantes Col0, Ler et *npr1.71* de 5 semaines ont été cultivées en terre, pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide des anticorps antipep0. La coloration au bleu de Coomassie des membranes correspondantes est montrée. Lad : marqueur de poids moléculaire.

2.3.7 Test de validation des anticorps sur plusieurs espèces végétales

L'objectif de ce travail était de générer un anticorps capable de détecter les protéines NPR1 chez plusieurs espèces. La conception des peptides utilisés pour obtenir les anticorps tenait compte de l'alignement des séquences peptidiques des protéines NPR1 de plusieurs espèces végétales. Afin de déterminer la capacité de l'anticorps antipep0 à reconnaître les orthologues de NPR1 chez d'autres espèces, des WB ont été réalisés avec des extraits protéiques issus de vigne, tomate et *Brachypodium distachyon*. Pour montrer que la stratégie d'utiliser des peptides dégénérés peut permettre d'obtenir des anticorps capables de détecter l'activation des défenses chez différentes espèces végétales, des extraits protéiques de plantes de Brachypodium, Medicago, tomate et de vigne traitées avec du SA, du MeJA ou de l'eau ont été analysés en WB.

Une optimisation des protocoles d'extraction a été nécessaire afin d'obtenir des extraits protéiques intègres. Cette optimisation a consisté à faire varier la composition des tampons d'extraction et du traitement physique des échantillons.

Deux tampons d'extraction de protéines ont été utilisés : tampon 1 et tampon 2 (voir matériel et méthodes). Le tampon 1 permet d'obtenir des protéines non dégradées et en quantités suffisantes chez *A. thaliana*, *B. distachyon* et *M. truncatula*. Les extractions à partir de vigne et de tomate avec le tampon 1 ne permettaient pas de visualiser des protéines au rouge ponceau, indiquant que ce tampon n'était pas adapté à la vigne ni à la tomate. Pour la tomate, le tampon 2 a été utilisé et a permis d'obtenir des protéines non dégradées. Pour la vigne, le tampon 1 ou le tampon 2 ont été utilisés, associés à une lyse préalable des tissus permettant ainsi d'obtenir des protéiques non dégradés.

Chez *B. distachyon*, l'antipep0 ne permet de détecter aucune bande quel que soit le traitement des plantes. Chez *M. trunatula*, l'antipep0 permet de détecter une protéine à 38 KDa qui s'accumule dans les plantes traitées au SA et à l'eau mais pas dans les plantes traitées au MeJA (Figure 41).



Figure 41 : Test de validation de l'anticorps antipep0 par WB sur *A. thaliana, B. distachyon, M. truncatula.* Les plantes Col0 d'*A.thaliana, B. distachyon et M. truncatula* ont été cultivées en terre pendant 5 semaines. Elles ont été pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Les protéines ont été extraites à l'aide du tampon 1 (voir matériels et méthodes). Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide de l'anticorps antipep0. La coloration au rouge ponceau de la membrane correspondante est montrée.



Figure 42 : Test de validation de l'anticorps antipep0 par WB sur *S. lycopersicum et V. vinifera.* Les plantes de tomate ont été cultivées en terre pendant 5 semaines. Elles ont été pulvérisées avec les traitements indiqués puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. Les protéines ont été extraites à l'aide du tampon 2 (voir matériels et méthodes) Les plantes de vigne ont été cultivées en terre pendant 5 semaines. Elles ont été pulvérisées avec les traitements indiqués puis les feuilles ont été prélevées 24h plus tard. Les protéines ont été extraites à l'aide du tampon 2 (voir matériels et méthodes) Les plantes de vigne ont été prélevées 24h plus tard. Les protéines ont été extraites à l'aide du tampon 1 (voir matériels et méthodes). Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide de l'anticorps antipep0. La coloration au bleu de Coomassie des membranes correspondantes est montrée. Lad : marqueur de poids moléculaire.

Chez la tomate, l'antipep0 permet de détecter une protéine autour de 45kDa qui s'accumule lorsque les plantes ont été traitées avec du SA ou au MeJA (Figure 42).

Chez la vigne, l'antipep0 permet de détecter une protéine autour de 55kDa qui s'accumule lorsque les plantes ont été traitées avec du SA (Figure 42).

Ces résultats indiquent que l'anticorps antipep0 permet de détecter une protéine qui s'accumule suite à des traitements éliciteurs de défenses chez plusieurs espèces végétales. De plus, selon l'espèce végétale utilisée, des méthodes d'extraction différentes doivent être mises en œuvre.

2.3.8 Ces antipeptides permettent une quantification relative de l'activation des défenses

Afin de montrer que les antipeptides permettent une quantification relative de l'activation des défenses, des extraits d'*A. thaliana*, connus pour avoir un niveau d'activation des défenses différent (observé en qPCR sur la base de l'expression du gène *PR1*), ont été utilisés en WB. Ces échantillons correspondent à des extraits d'*A. thaliana* traitées avec du Bion[®] à différents stades de croissance. L'intensité de la bande détectée en western blot ramenée à l'intensité de la bande correspondant à la RuBisCo détectée en bleu de Coomassie est corrélée avec le niveau d'activation des défenses observé en qPCR (Figure 43).



Figure 43 : Comparaison de l'expression de *PR1***, et de l'intensité de la bande détectée en Western blot.** Les plantes de Col0 ont été cultivées en terre jusqu'à différents stades de développement 1 ; 2 ; 3 et 4. Elles ont été pulvérisées avec du Bion[®] puis des prélèvements ont été effectués 24h plus tard. A Expression de *PR1* exprimée en niveau de transcrit *PR1* normalisée par rapport au niveau de transcrits de la Clathrine. B Intensité de la bande détectée en Western blot normalisée par rapport à l'intensité de la RuBisCo (bleu de Coomassie) des échantillons correspondants. C Détection de la cible de l'antipep0 en Western blot sur les quatre échantillons et coloration de la RuBisCo par le bleu de Coomassie. Des quantités équivalentes de protéines ont été déposées puis le WB a été réalisé à l'aide de l'anticorps antipep0. La coloration au bleu de Coomassie de la membrane correspondante est montrée.

2.3.9 Ces antipeptides peuvent être utilisés en Immuno précipitation (IP)

Les antipeptides ainsi que l'anticorps commercial ont été utilisés pour effectuer une IP (Dynabeads[™] Protein A, ThermoFisher n°10001D) sur extraits de protéines d'*A. thaliana* traitées au SA. La bande de 38 kDa est observée sur le western blot de l'éluât d'IP obtenu avec des extraits de plante dont les défenses ont été activées. Ces anticorps ont aussi été utilisés pour immunoprécipiter la protéine recombinante P de taille connue. Cette protéine est détectée en WB sur l'éluât d'IP obtenu avec les antipeptides, mais pas avec celui obtenu en utilisant l'anticorps commercial (Figure 44). Les bandes observées autour de 55 kDa correspondent aux chaines lourdes des anticorps utilisés lors de l'étape d'immunoprécipitation, les bandes retrouvées autour de 20 kDa correspondent aux chaines légères de ces mêmes anticorps.



Figure 44 : Détection par antipep0 des protéines immunoprécipitées avec antipep0 ou anti-NPR1.com. La protéine recombinante NPR1 partielle (P) a été immunoprécipitée avec l'anticorps indiqué puis l'éluât de l'immunoprécipitation utilisé pour un WB avec l'anticorps antipep0. Les plantes d'*A. thaliana* ont été cultivées en terre pendant 5 semaines. Elles ont été pulvérisées avec les traitements indiqués puis les feuilles ont été prélevées 24h plus tard. Les protéines ont été extraites puis immunoprécipitées avec les anticorps indiqués. L'éluât de l'immunoprécipitation est utilisé pour un WB avec l'anticorps antipep0

2.4 Discussion

2.4.1 Spécificité des antipeptides développés

Nous avons développé au cours de cette thèse deux antipeptides destinés à reconnaître la forme active monomérique de la protéine NPR1. Les résultats obtenus ont soulevé plusieurs questions liées à la spécificité de ces antipeptides et à leur intérêt en tant qu'outil de détection de l'activation des défenses. L'antipeptide développé détecte une ou deux bandes autour de 38 kDa au lieu des 65 kDa, taille attendue pour la protéine NPR1. Par ailleurs, la ou les bandes autour de 38 kDa sont détectées

chez le mutant *npr1.1*. Ceci pourrait suggérer que les antipeptides ne sont pas capables de s'hybrider sur NPR1 mais sur une protéine inconnue. Cependant, les différentes approches expérimentales mises en œuvre dans cette thèse nous ont permis d'identifier 5 arguments qui confortent l'hypothèse selon laquelle ces antipeptides sont capables de s'hybrider sur une forme encore non décrite de NPR1.

 Les séquences des peptides Pep1 et Pep0 qui sont conservées dans la zone BTB/POZ de la protéine NPR1 ne se sont présentes dans aucune autre protéine connue d'après une analyse par BLAST hormis NPR4 et NPR6 pour Pep0. Donc, les antipeptides antipep0 et antipep1 devraient permettre de cibler la protéine NPR1.

2. Une (parfois 2) bande(s) plus intense(s) est(sont) détectée(s) par les antipeptides antipep0 et antipep1 chez les plantes d'*A. thaliana* traitées avec des produits connus pour activer les défenses, par rapport aux témoins. L'intensité de cette bande est corrélée au niveau de l'expression du gène *PR1* chez *A. thaliana* (Figure 43). De plus, antipep0 (conçu pour plusieurs plantes) reconnait une protéine qui s'accumule dans les vignes et les tomates traitées avec des produits connus pour activer les défenses. Ces antipeptides permettent donc de détecter une ou plusieurs protéine(s) qui s'accumule(nt) lors de la mise en place des défenses.

3. Les 4 anticorps utilisés : antipep0 (conçu pour plusieurs plantes), antipep1 (spécifiquement conçu plusieurs plantes), anti-NPR1.X.D et anti-NPR1.com sont capables de reconnaître la protéine recombinante couvrant les 260 premiers acides aminés de la protéine NPR1 (Figure 33 & 34). Les antipeptides que nous avons développés sont donc bien capables de détecter la protéine NPR1.

4. Les 4 anticorps utilisés sont capables de détecter une ou des bandes située(s) à la même taille de 38 kDa chez *A. thaliana* présentant le même profil d'accumulation dans les mêmes échantillons. Cela suggère que ces 4 anticorps reconnaissent la même protéine. Etant donné que les deux anticorps anti-NPR1.X.D et anti-NPR1.com sont décrits dans la littérature comme étant spécifiques de la protéine NPR1, les résultats décrits en 3- et 4- suggèrent que les antipeptides antipep0 et antipep1 reconnaissent NPR1.

5. Les bandes détectées à 38 kDa ont été découpées à partir du gel d'acrylamide pour identifier les protéines présentes. Trois peptides spécifiques de la protéine NPR1 et situés en N-terminal ont été retrouvés par spectrométrie de masse (Annexe 1). Aucun peptide correspondant à NPR4 ou NPR6 n'a été retrouvé. Ce résultat indique que la protéine NPR1 est bien présente au niveau de la bande détectée à la taille de 38 KDa.

Ces 5 arguments suggèrent donc fortement que les antipeptides antipep0 et antipep1 détectent la protéine NPR1. Afin de valider définitivement et de manière irréfutable que NPR1 est bien la cible des antipeptides antipep0 et antipep1, il faudrait utiliser un mutant KO *npr1*. Nous avons utilisé

81

deux mutants *npr1* différents : le mutant *npr1.1* est dans fond Col0 portant une tyrosine à la place de l'histidine 334 dans le domaine ankyrines de la protéine NPR1 (Cao et al., 1997) et le mutant *npr1.71* est dans un fond Ler portant l'insertion d'un transposon dans le premier exon du gène *NPR1* (Canet et al., 2010).

Les antipeptides antipep0 et antipep1 sont capables de détecter des bandes à 38 kDa chez le mutant *npr1.1* suite à un traitement SA ou MeJA. La détection de cette bande à 38 kDa n'est pas incohérente avec le fait que les antipeptides reconnaissent la protéine NPR1. Il est tout à fait possible que la mutation ponctuelle chez le mutant *npr1.1* n'affecte pas l'antigénicité de la protéine NPR1 car la zone reconnue par les antipeptides (acides aminés 46 à 59 pour pep0, et acide aminés 80 à 93 pour pep1) se situe en amont de la mutation (His334). D'autres mutants produits par la même équipe sont disponibles en fond Col0 mais ils sont tous issus d'une mutagénèse EMS.

Les traitements par le SA ou par le MeJA ne provoquent pas l'accumulation d'une bande détectée par antipep0 chez Ler. Il n'est donc pas possible de conclure quant à la capacité de cet anticorps à reconnaître la protéine NPR1 chez les plantes Ler.

2.4.2 Hypothèses sur les mécanismes de clivage potentiels de la protéine NPR1

Nos résultats indiquent qu'il existerait une forme de la protéine NPR1 qui serait une forme clivée qui n'a jamais été décrite dans la littérature à notre connaissance. Pour expliquer la taille des bandes obtenues, il est possible que la protéine NPR1 soit clivée par un mécanisme encore inconnu, et que cette forme clivée de NPR1 soit impliquée dans les voies de défenses dépendantes du SA et du MeJA. La localisation de cette forme clivée de NPR1 dans la cellule ainsi que les mécanismes, l'impliquant dans ces voies de défenses, sont à l'heure actuelle inconnus. Par contre, au vu de la méthode de conception de ces anticorps, il est certain que ces formes de NPR1 seraient constituées de la partie N-terminale de la protéine. En effet les peptides utilisés pour obtenir ces anticorps correspondent à une partie située dans la séquence N-ter de la protéine NPR1 au début du domaine BTB/POZ. De plus, les peptides de NPR1 détectés en spectrométrie de masse se situent tous les trois dans cette partie N-terminale, en amont de la séquence de Pep0 et de Pep1. Les formes de NPR1 potentiellement détectées par antipep0 et antipep1 ont une taille comprise entre 38 et 40 kDa. Cela suggère que ces formes de NPR1 seraient clivées au niveau de leur domaine de répétitions ankyrines (Figure 45). Les westerns blots étant effectués en condition non-dénaturante, le marqueur de poids moléculaire ne permet d'obtenir qu'approximativement les tailles des protéines observées, les sites de clivages précis ne peuvent pas être définis. Si la protéine NPR1 était soumise à un clivage par des protéases, il devrait être possible d'identifier des sites potentiels de clivage in silico. Afin d'identifier ces sites potentiels de clivage dans la séquence peptidique de la protéine NPR1 permettant de libérer

82

un peptide d'environ 38 KDa, plusieurs algorithmes disponibles en ligne ont été utilisés. L'utilisation de PeptideCutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) a permis d'identifier une protéase potentiellement capable de cliver la protéine NPR1 au niveau de l'acide aminé 363 en libérant un peptide de 40,11 kDa. Cette protéase retrouvée uniquement dans le sang des mammifères selon NCBI (Facteur Xa) ne possède pas d'orthologue chez les plantes. Ceci ne veut pas dire qu'il n'y a pas de clivage médié par une protéase, car le logiciel utilisé ne teste pas les sites de toutes les protéases existant chez les plantes. Ainsi, lorsque l'on utilise le logiciel en ligne Prosper (https://prosper.erc.monash.edu.au/webserver.html), il ressort que des sites spécifiques des métallopeptidases 2-9 & 3 sont situés autour du 330^{ème} acide aminé. Le clivage de la protéine NPR1 par une métallopeptidase pourrait donc expliquer la taille observée en western blot détectée à l'aide des antipeptides (Figure 46).



Figure 45 : Alignement de NPR1 avec le peptide ayant servi à la conception de l'antipep0, avec les trois peptides séquencés lors du séquençage de la bande détectée en western blot (pep seq1 – 2 & 3) et avec la protéine clivée soit à 38, 39 ou 40 kDa. Les domaines de NPR1 sont représentés au-dessus des séquences et la zone dans laquelle a lieu le clivage potentiel est encadrée en rouge.



Figure 46 : Clivage *in silico* obtenu à l'aide du logiciel en ligne Prosper. Les sites de clivages permettant d'expliquer la taille attendue sont encadrés en rouge.

Deux métallopeptidases identifiées chez A. thaliana, TOP1 et TOP2, sont connues pour être des récepteurs du SA (Moreau et al., 2013) et avoir un rôle dans la régulation du stress oxydatif induit par un agent pathogène (Westlake et al., 2015). Les gènes codants pour ces protéines sont induits par l'application de SA exogène ou par l'inoculation avec un agent pathogène tel que P. syringae pv. tomato DC3000 (Zampogna, 2012). TOP1 et TOP2 se lient au SA avec une affinité différente et leur liaison au SA inhibe leur activité peptidase. TOP1 est décrit comme étant adressé aux chloroplastes de manière dépendante du SA; et TOP2 est localisé dans les chloroplastes mais également dans le cytoplasme. Ces protéines ont été décrites comme étant nécessaires à la mise en place de l'ETI en réponse à des bactéries avirulentes. En effet, les mutants top1 et top2 ne sont plus capables de mettre en place l'ETI lorsqu'ils sont inoculés avec des souches avirulentes de P. syringae pv. tomato (Moreau et al., 2013). Dans ce cas, le haut niveau de SA inhibe l'activité peptidase de TOP1 et TOP2, ce qui suppose que leur implication dans l'ETI est liée au fait qu'elles ne sont plus capables de cliver une protéine substrat importante dans la mise en place de l'ETI. En situation de concentration en SA modérée, l'activité peptidase de TOP1 et TOP2 n'est pas inhibée, et elles peuvent alors cliver des substrats inconnus permettant ainsi la mise en place des défenses. Dans nos conditions expérimentales, les concentrations en SA sont modérées. Ces conditions pourraient être suffisantes pour conduire à l'accumulation de TOP1 et TOP2 mais ne conduiraient pas à leur inactivation. L'accumulation de TOP1 et/ou TOP2 pourrait donc conduire au clivage de la protéine NPR1. La localisation nucléo-cytoplasmique de TOP2 suggère que cette peptidase pourrait être responsable du clivage de la protéine NPR1. Il est aussi possible que ce clivage soit dû à un autre mécanisme non

85

identifié. Cette hypothèse mériterait d'être étudiée en essayant, par exemple, d'effectuer un clivage in vitro de NPR1 par TOP2.

2.4.3 Une analogie avec les systèmes animaux

Comme cela a été décrit dans l'introduction, la protéine NPR1 contient un domaine ankyrines qui présente une forte homologie avec les domaines ankyrines des protéines du complexe NF-κB impliqué dans l'immunité chez les animaux. Plusieurs protéines peuvent être impliquées dans ce complexe et former différentes combinaisons. Brièvement, dans ce complexe, des protéines contenant un domaine ankyrines forment des dimères avec un facteur de transcription dans le cytoplasme, empêchant son activité. Le clivage de ces protéines à domaine ankyrines conduit à l'adressage du dimère au noyau et permet aux facteurs de transcription d'activer leurs gènes cibles. Nos résultats suggèrent un mode d'action de la protéine NPR1 similaire à celui de ce complexe NF-κB.

Chez les plantes, les données de la littérature indiquent que le mécanisme par lequel agit la protéine NPR1 le plus documenté correspond à celui impliquant une monomérisation de NPR1 en réponse au SA suivie d'une migration du monomère vers le noyau. Dans le cadre de cette thèse, nous suggérons l'existence d'un autre mécanisme qui présenterait des similitudes avec les voies non canoniques du complexe NF- κ B décrites en introduction 1.3.5. Ce nouveau mécanisme impliquerait le clivage et la monomérisation de la protéine NPR1 en réponse aussi bien au SA qu'au MeJA. La protéine NPR1 clivée peut jouer un rôle soit dans le cytoplasme soit dans le noyau où elle s'associerait à des facteurs TGA. Ce modèle est illustré dans la Figure 47. Dans l'hypothèse où elle resterait dans le cytosol elle pourrait avoir un rôle d'inhibition ou d'activation de la signalisation des voies de défenses en interagissant avec des partenaires impliqués dans ces voies. En effet, il a été montré que la forme cytosolique de NPR1 pouvait jouer un rôle dans la balance SA/JA (Spoel, 2003). Ainsi le rôle précis et le mode de fonctionnement de cette partie clivée de NPR1 reste à élucider et ses partenaires potentiels à découvrir.



Figure 47 : Comparaison entre l'hypothèse d'une voie non canonique impliquant NPR1 chez les plantes et ce qui est connu chez les animaux. Chez les plantes, le schéma représente la voie impliquant une monomérisation de NPR1 connue jusqu'à présent (considérée comme canonique) et l'hypothèse d'une voie non canonique impliquant un clivage de NPR1. NPR1c représente la protéine NPR1 clivée identifiée dans cette thèse qui pourrait agir soit de manière nucléaire et permettre l'activation de gènes de défense en agissant tel un facteur de transcription ou en en recrutant, soit de manière cytoplasmique, dans ce cas son rôle reste à découvrir. Chez les animaux la voie canonique implique la dégradation de l'inhibiteur I-κB alors que les autres voies non canoniques impliquent le clivage de p100 ou p105 en p52 ou p50. Ces dégradations ou clivage permettent l'adressage des facteurs κB au noyau permettant l'induction de différents gènes de défenses cellulaires en fonction des oligomères impliqués D'après (Gilmore, 2006).

2.4.4 Hypothèse d'une autre protéine marqueur de l'immunité

Malgré les différents arguments qui plaident en faveur de la capacité des antipeptides antipep0 et antipep1 à reconnaître la protéine NPR1 in planta, il est possible que la protéine détectée ne soit pas NPR1.

Dans ce cas, la protéine détectée reste à découvrir. Cette protéine serait une protéine clé dans les voies de défenses cellulaires qui est conservée au sein du règne végétal, car on la retrouve toujours en plus grande quantité lorsqu'un produit connu pour activer les défenses des plantes est pulvérisé sur les plantes et cela sur différentes espèces végétales (Arabidopsis, tomate et vigne). Ainsi, l'antipeptide développé reste un bon marqueur de l'activation des défenses utilisable autant en recherche fondamentale sur *A. thaliana*, qu'en agronomie dans le cadre du développement des SDP. Il serait intéressant de montrer que l'induction de cette protéine après un traitement SDP est retrouvée chez d'autres plantes d'intérêt agronomique.

Chapitre 3. GUSTAVE

3.1 Principe du test

Afin de montrer l'effet potentiellement stimulateur de défense de produits en cours de développement, l'entreprise Staphyt souhaitait avoir un test simple et à faible coût à disposition afin de le proposer à ses clients. L'entreprise Staphyt maîtrise déjà les expérimentations au champ et l'anticorps présenté dans le chapitre 2 permet de montrer l'activation des défenses au niveau protéique. Nous avons donc décidé de développer un test permettant de montrer l'activation des défenses chez A. thaliana au niveau de l'expression des gènes. La technique de la qRT PCR nécessite d'avoir à disposition un certain nombre de machines assez coûteuses, de plus les consommables utiles pour ce type d'expérimentation ont eux aussi un coût élevé et les différentes étapes de préparation des échantillons sont relativement longues à effectuer et impliquent donc un coût élevé en terme de temps technicien. Nous avons décidé d'utiliser des plantes possédant des constructions de type fusion transcriptionnelle afin de développer ce test. Nous nous sommes basés sur les travaux de l'équipe du Professeur C. Pieterse (Koornneef and Pieterse, 2008) et avons décidé d'utiliser les constructions présentées dans cette publication pour mettre au point ce test que nous avons appelé GUSTAVE pour GUS Technologie for Analyse and Validate your plant Elicitor. Dans cette publication A. Koornneef montre que le traitement au SA induit l'accumulation d'ARNm de PR1 ainsi que l'expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène PR1 dans une construction pPR1 ::GUS, mais n'induit pas l'accumulation d'ARNm de PDF1.2 ni l'expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène PDF1.2 dans une construction pPDF1.2 ::GUS. Le traitement au MeJA induit l'accumulation d'ARNm de PDF1.2 ainsi que l'expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène PDF1.2 dans une construction pPDF1.2 :: GUS , mais n'induit pas l'accumulation d'ARNm de PR1 ni l'expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène PR1 dans une construction pPR1 ::GUS. Le traitement avec les deux composés induit l'accumulation d'ARNm de PR1 ainsi que l'expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène PR1 dans une construction pPR1 ::GUS, mais n'induit pas l'accumulation d'ARNm de PDF1.2 l'expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène PDF1.2 dans une construction pPDF1.2 ::GUS (Figure 48). Ceci montre l'antagonisme des voies impliquant le SA et le JA.

L'utilisation de SDP repose sur l'activation des voies de défense de la plante dépendantes du SA ou du JA pour limiter l'infection par les agents pathogènes bactériens ou fongiques. Dans certains cas, les SDP n'activent pas directement l'expression des gènes de défenses, mais induisent des mécanismes en amont de ces gènes de défense qui lui permettant de répondre plus rapidement suite à un stress biotique, ce phénomène est appelé potentialisation.

89

Afin de mettre en évidence l'activation ou la potentialisation de l'une ou l'autre de ces deux voies, des plantes exprimant un gène rapporteur qui s'active en réponse au SA ou au MeJA respectivement, ont été utilisées. En effet, le MeJA est connu pour activer la voie JA. Les plantes utilisées expriment un gène rapporteur codant pour la β-glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur du gène *PR1* ou du gène *PDF1.2* respectivement. L'enzyme GUS est capable de cliver le substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium) et produit un précipité bleu et insoluble. Pour mettre en évidence l'activation de l'enzyme GUS, les plantes sont incubées dans le X-Gluc. Si une coloration bleue apparait, l'enzyme GUS a été activée et la voie de défense considérée a été activée. Les résultats présentés sont ceux obtenus à partir des graines libres de droit obtenus auprès du NASC (http://arabidopsis.info/).



Figure 48 : Activation des deux voies de défense impliquant le SA ou le JA (Koornneef and Pieterse, 2008). Les plantes sont non traitées, traités avec 1 mM de SA, 0.1 mM de MeJA ou les deux. A : Expression des gènes *PR1* et *PDF1.2* analysées RT-PCR. B : Expression du gène *GUS* sous le contrôle des promoteurs des gènes *PR1* et *PDF1.2*.

Ainsi nous avons proposé d'utiliser les plantes possédant les deux fusions transcriptionnelles décrites ci-dessus selon deux protocoles différents : le premier destiné à montrer l'activation directe des défenses par un produit ; le deuxième destiné à montrer l'effet potentialisateur d'un produit. Ces deux protocoles sont décrits dans les Figures 49 et 61 dans les parties ci-dessous et dans la partie Matériel et méthode, et sont utilisés en parallèle sur les deux constructions.

3.2 Validation de la réponse des plantes exprimant les constructions

Afin de valider les constructions en notre possession dans nos conditions expérimentales, nous avons tout d'abord effectué des tests d'activation directe des défenses en utilisant les différents témoins positifs (SA, MeJA) et négatif (eau et DMSO), et en utilisant le protocole d'élicitation (Matériel et méthodes, Figure 49)



Figure 49 : Schéma du protocole permettant de montrer l'activation directe des défenses. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées à l'aide des produits testés ou des témoins. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées.

Nous avons testé la construction *pPR1 ::GUS* en traitant les plantes à l'aide d'eau, de SA, de MeJA et de DMSO (Figure 50).



Figure 50 : Test de validation de la construction *pPR1::GUS***.** Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées.

Les plantes traitées avec de l'eau, du MeJA ou du DMSO ne montrent pas de coloration bleue et les plantes traitées avec du SA montrent une coloration bleue. Ainsi, seul le traitement avec du SA a permis l'accumulation du composé bleu et induit donc l'expression du gène *GUS* sous le contrôle du promoteur du gène *PR1*. Cette construction nous permet donc de montrer l'activation de l'expression du gène *PR1* et donc de la voie de défense impliquant le SA.

Nous avons ensuite testé la construction *pPDF1.2::GUS* en traitant les plantes à l'aide d'eau, du SA, du MeJA et du DMSO (Figure 51).



Figure 51 : Test de validation de la construction *pPDF1.2 ::GUS.* Les plantes de 3 semaines sont non traitées, pulvérisées avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées.

Toutes les plantes présentent une coloration bleue, nous avons supposé que le temps d'incubation dans le tampon (durant la nuit) était trop long, nous avons donc testé différents temps d'incubation (Figure 52)



Figure 52 : Test de validation de la construction *pPDF1.2::GUS***.** Les plantes de 3 semaines sont non traitées, pulvérisées à avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant le temps indiqué avant d'être décolorées et photographiées.

Toutes les plantes présentent une coloration bleue similaire, ce n'est donc pas un temps d'incubation trop long dans le tampon qui a amené à cette coloration. Nous avons alors testé de les cultiver avec d'autres milieux de culture (*in vitro* ou en terre) afin de vérifier si nos conditions de culture ne sont pas à l'origine de cette coloration. Les mêmes résultats ont alors été obtenus quelle que soit la méthode de culture utilisée (données non montrées). Dans nos conditions, l'expression de la construction *pPDF1.2::GUS* est constitutive. Elle n'a donc pas été validée comme permettant de développer le test GUSTAVE.

Une nouvelle construction possédant le gène rapporteur *GUS* sous le contrôle du promoteur du gène *LOX2* a alors été identifiée comme pouvant être un bon rapporteur de l'activation de la voie JA (Jensen et al., 2002). Cette construction a donc été commandée auprès du NASC puis a été testée dans les conditions précédemment décrites afin de vérifier si elle pouvait être utilisée dans le cadre de GUSTAVE (Figure 53).



Figure 53 : Test de validation de la construction *pLOX2 ::GUS*. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées.

Les plantes traitées avec de l'eau, du SA ou du DMSO ne montrent pas ou peu de coloration et les plantes traitées avec du MeJA montrent une coloration bleue. Ainsi, seul le traitement avec du MeJA a permis l'accumulation du composé bleu et induit donc l'expression du gène *GUS* sous le contrôle du promoteur du gène *LOX2*. Cette construction nous permet donc de montrer l'activation de l'expression du gène *LOX2* et donc de la voie de défense JA/ET.

3.3 Mise au point de la cinétique d'activation

Afin d'optimiser le protocole permettant de visualiser l'activation des défenses en utilisant les constructions *pPR1::GUS* et *pLOX2::GUS* le temps nécessaire à la visualisation de l'activation des deux voies de défenses a été déterminé. Ainsi, il sera aussi possible de visualiser si une des deux voies est activée avant l'autre. Les plantes possédant l'une ou l'autre des deux constructions *pPR1::GUS* et *pLOX2::GUS* sont traitées avec du SA et du MeJA respectivement. Les plantes sont alors prélevées et incubées dans le tampon de coloration à différents temps : 15min, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h ou 24h après le traitement (Figure 54).



Figure 54 : Schéma du protocole permettant de montrer le temps nécessaire à l'activation directe des défenses. Les plantes de 3 semaines possédant les constructions *pPR1::GUS* et *pLOX2::GUS* sont pulvérisées respectivement avec du SA et du MeJA respectivement. Les plantes sont alors remises en culture durant un temps X= 15min, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h ou 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées.



Figure 55 : Test permettant de montrer le temps nécessaire à l'activation directe des défenses. Les plantes de 3 semaines possédant la construction *pPR1::GUS* sont pulvérisées avec du SA. Les plantes sont alors remises en culture pendant le temps indiqué puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

L'expression du gène *GUS* est détectée à partir de 6h après traitement avec SA (Figure 55). Cela indique que l'activation du promoteur du gène *PR1* commence entre 3 et 6h après le traitement SA. Cette construction nous permet donc de montrer l'activation de l'expression du gène *PR1* et donc de la voie de défense impliquant le SA dès 6h après le traitement.



Figure 56 : Test permettant de montrer le temps nécessaire à l'activation directe des défenses. Les plantes de 3 semaines possédant la construction *pLOX2::GUS* sont pulvérisées avec du MeJA + DMSO. Les plantes sont alors remises en culture pendant les temps indiqués puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

L'expression du gène *GUS* est détectée à partir de 6h après traitement avec MeJA (Figure 56). Cela indique que l'activation du promoteur du gène *LOX2* commence entre 3 et 6h après le traitement MeJA. Cette construction nous permet donc de montrer l'activation de l'expression du gène *LOX2* et donc de la voie de défense impliquant le JA dès 6h après le traitement.

3.4 Spécificité de l'élicitation

Afin de tester la spécificité des constructions *pPR1::GUS* et *pLOX2::GUS* vis-à-vis des voies de défenses SA et JA, l'effet d'autres hormones impliqués dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques a été testé. Ainsi, les plantes sont traitées avec du SA et du MeJA comme témoins positifs mais aussi avec de l'ABA, de l'IAA (une auxine), du BAP (une cytokinine) et de l'ACC (un précurseur de l'éthylène) ainsi qu'avec les témoins négatifs correspondants.

Dans le but de déterminer s'il existe une interaction synergique ou antagoniste entre le SA et le MeJA sur l'activation de ces fusions transcriptionnelles, un traitement simultané avec les deux composés a été effectué.

Les plantes possédant la construction *pPR1::GUS* sont pulvérisées avec ces différentes hormones ou combiné d'hormones afin de visualiser l'effet direct de ces produits sur la voie SA (Figure 57).



Figure 57 : Test de l'activité de différentes hormones sur les plantes possédant la construction *pPR1 ::GUS*. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Les plantes traitées avec de l'eau, du MeJA, du DMSO, de l'ABA, de l'IAA, du BAP et de l'ACC ne montrent pas de coloration et les plantes traitées avec du SA et simultanément avec du SA et du MeJA montrent une coloration bleue. Les plantes possédant la construction *pPR1::GUS* ne répondent donc qu'au SA et répondent au traitement simultané avec du SA et du MeJA comme montré par Koornneef en 2008 (Koornneef and Pieterse, 2008). Cette construction nous permet donc de montrer l'activation de l'expression du gène *PR1* et donc l'activation de la voie de défense impliquant le SA de manière spécifique. Les plantes possédant la construction *pLOX2::GUS* pulvérisées avec les différentes hormones ou combiné d'hormones afin de visualiser l'effet direct de ces produits sur la voie JA (Figure 58).



Figure 58 : Test de l'activité de différentes hormones sur les plantes possédant la construction *pLOX2 ::GUS*. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Les plantes traitées avec de l'eau, du SA, du DMSO, de l'ABA, de l'IAA, du BAP et de l'ACC ne montrent pas de coloration et les plantes traitées avec du MeJA et simultanément avec du SA et du MeJA montrent une coloration bleue. Cette construction nous permet donc de montrer l'activation de l'expression du gène *LOX2* et donc l'activation de la voie de défense impliquant le JA, de manière spécifique. Le traitement simultané avec du SA et du MeJA active aussi cette voie, contrairement à ce qui avait été montré par A. Koornneef en 2008 (Koornneef and Pieterse, 2008) Ainsi l'utilisation de cette construction ne montre pas l'effet antagoniste des voies impliquant le SA et le JA.

3.5 Réponse à différents SDP et éliciteurs

Les plantes sont traitées avec différents SDP commerciaux et éliciteurs connus pour avoir une action sur les voies de défenses. Elles sont donc pulvérisées avec du Bion[®], du Vacciplant, du Stifenia, du Messager[®], du BABA, du chitosan, de la flagelline, ainsi qu'avec les témoins négatifs correspondants.

Les plantes possédant la construction *pPR1::GUS* sont pulvérisées avec ces SDP et éliciteurs afin de visualiser l'effet direct de ces produits sur la voie SA (Figure 59).



Figure 59 : Test de l'activité de différents SDP et éliciteurs sur les plantes possédant la construction *pPR1 ::GUS***.** Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées à l'aide avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Les plantes traitées avec du Vacciplant, du Stifenia, du Messager[®], du BABA, du Chitosan ou de la flagelline, ainsi qu'avec le témoin correspondant ne montrent pas de coloration et les plantes traitées avec du Bion[®] montrent une coloration bleue. Ainsi seul le traitement avec du Bion[®] a permis d'activer l'expression du gène *PR1* et donc l'activation de la voie de défense impliquant le SA.

Les plantes possédant la construction *pLOX2::GUS* sont donc pulvérisées avec ces SDP et éliciteurs afin de visualiser l'effet direct de ces produits sur la voie JA (Figure 60).



Figure 60 : Test de l'activité de différents SDP et éliciteurs sur les plantes possédant la construction *pLOX2 ::GUS*. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec les traitements indiqués. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Les plantes traitées avec du Bion[®], du Vacciplant, du Stifenia, du Messager[®], du BABA, du Chitosan ou de la flagelline, ainsi qu'avec le témoin correspondant ne montrent pas de coloration. Ainsi aucun de ces SDP ou éliciteurs n'a induit l'expression du gène *LOX2*. La voie de défense impliquant le JA n'est donc activée par aucun de ces SDP ou éliciteurs.

3.6 Test de l'activité de potentialisation de différents SDP et éliciteurs



Figure 61 : Schéma du protocole permettant de mettre en évidence la potentialisation des défenses. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec de l'eau, ou du produit testé puis remises en culture durant 48h. Elles sont alors de nouveau traitées, avec du SA, du MeJA, de l'eau ou de la flagelline ou du chitosan afin de mimer la présence d'un agent pathogène bactérien ou fongique. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées.

Afin de montrer si le test GUSTAVE permet de montrer l'effet potentialisateur des SDP, les plantes possédant les constructions *pPR1::GUS* et *pLOX2::GUS* sont traitées une première fois avec les SDP commerciaux à notre disposition ainsi qu'avec le BABA puis sont traitées 48h après avec de la

flagelline ou du chitosan afin de mimer la présence d'un agent pathogène bactérien ou fongique (Figure 61).

Les plantes possédant les constructions *pPR1::GUS* sont donc traitées en suivant le protocole de potentialisation. Cette expérience a d'abord été effectuée à l'INRA en utilisant uniquement du Bion[®], du Vacciplant et du Stifenia puis du chitosan et de la flagelline et a permis de montrer deux fois l'effet potentialisateur de ces produits (données non montrées). Elle a ensuite été effectuée dans le laboratoire de Staphyt (deux fois aussi) en utilisant du Messager et du BABA en plus et les résultats obtenus ont été moins contrastés. Il a été choisi de ne montrer que les résultats obtenus dans le laboratoire de Staphyt car l'expérimentation similaire avec les plantes possédant la construction pLOX2::GUS n'a été effectuée que dans ces conditions.



Figure 62 : Test de l'activité potentialisatrice d'éliciteurs sur les plantes possédant la construction *pPR1 ::GUS* .Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec de l'eau, ou du produit testé puis remises en culture durant 48h. Elles sont alors de nouveau traitées, avec du SA, du MeJA, de l'eau ou de la flagelline ou de chitosan afin de mimer l'arrivée d'un agent pathogène bactérien ou fongique. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Pour les témoins négatifs de potentialisation (pas de traitement mimant l'arrivée d'un agent pathogène), seules les plantes traitées à l'eau puis au SA (témoin positif), au Bion[®] puis à l'eau, montrent une coloration. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus précédemment qui montrent que ces produits ont une activité d'élicitation directe sur les plantes possédant cette construction *pPR1 ::GUS*. Pour les conditions auxquelles les plantes ont été soumise à un traitement mimant l'arrivé d'un agent pathogène (test de potentialisation) les plantes traitées avec du Bion[®] puis avec de la flagelline, avec du Bion[®] puis du chitosan, avec du Vacciplant puis de la flagelline, avec du BABA puis de la flagelline, avec du Stifenia puis du chitosan et avec du BABA puis du Chitosan montrent une coloration bleue. Pour les plantes traitées d'abord avec du Bion[®], ceci ne montre pas un effet potentialisateur car lorsque ni flagelline ni chitosan ne sont rajoutés, la coloration est similaire. Par contre les plantes traitées en premier lieu avec du Vacciplant, du Stifenia ou du BABA, la coloration

n'apparait qu'après qu'elles aient subi un deuxième traitement, soit avec de la flagelline, soit avec du chitosan alors que le traitement avec de la flagelline ou du chitosan seul n'induit pas de coloration (Figure 62). Ceci suggère que le Vacciplant le Stifenia et le BABA sont capable d'induire une potentialisation au niveau de l'expression du gène *PR1* et donc une potentialisation de la voie de défense impliquant le SA.

Les plantes possédant les constructions *pLOX2::GUS* sont aussi traitées en suivant ce protocole de potentialisation (Figure 63).



Figure 63 Test de l'activité potentialisatrice d'éliciteurs sur les plantes possédant la construction *pLOX2::GUS.* Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec de l'eau, ou du produit testé puis remises en culture durant 48h. Elles sont alors de nouveau traitées, avec du SA, du MeJA, de l'eau ou de la flagelline ou de chitosan afin de mimer l'arrivée d'un agent pathogène bactérien ou fongique. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Pour les témoins négatifs de potentialisation (pas de traitement mimant l'arrivée d'un agent pathogène, seules les plantes traitées à l'eau puis au MeJA (témoin positif) montrent une coloration. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus précédemment qui montrent que seul ce produit produits a une activité d'élicitation directe sur les plantes possédant cette construction *pLOX2 ::GUS*. Pour les conditions auxquelles les plantes ont été soumise à un traitement mimant l'arrivé d'un agent pathogène (test de potentialisation), aucune ne montre de coloration bleue. Ceci suggère qu'aucun de ces produits n'est capable d'induire une potentialisation au niveau de l'expression du gène *LOX2*.

3.7 Test de cumulation des traitements SDP ou éliciteurs

Les SDP étant pulvérisés plusieurs fois au champ dans les itinéraires de cultures classiques, nous avons voulu tester si plusieurs pulvérisations successives d'éliciteur permettent l'expression du gène GUS sous le contrôle des promoteurs des gènes PR1 et LOX2 respectivement. Pour cela les plantes possédant les constructions *pPR1::GUS* et *pLOX2::GUS* sont traitées à trois reprises successives avec un intervalle de 48h, puis sont récoltées pour analyse (Figure 64). Ce test est appelé test de l'effet cumulatif. Les plantes possédant les différentes constructions ont donc été traitées 3 fois avec du Bion[®], du Vacciplant, du Stifenia, du Messager[®], du BABA, du chitosan et de la flagelline. L'effet cumulatif de l'H₂O₂ a aussi été analysé car ce produit est utilisé en deuxième traitement dans les tests d'activité SDP proposés par l'INRA d'Anger (qPFD) afin de vérifier qu'il n'a pas d'effet sur ces constructions. De plus les plantes possédant les constructions *pPR1::GUS* et *pLOX2::GUS* sont traitées à trois reprises successives respectivement avec du MeJA et du SA afin de visualiser si ces produits peuvent avoir un effet sur l'expression du gène *GUS* sous le contrôle respectif des promoteurs des gènes *PR1* et *LOX2* et ainsi vérifier qu'ils sont des bons témoins négatifs.



Figure 64 : Schéma du protocole permettant de montrer l'effet cumulatif de produits activant les défenses. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec de l'eau, ou les produits testés puis remises en culture durant 48h. Elles sont alors de nouveau traitées avec de l'eau, ou les produits testés. Elles sont alors de nouveau traitées, avec du SA, du MeJA, de l'eau ou les produits traités. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées.

Afin de visualiser si ces SDP et éliciteurs sont capable d'induire une coloration dans les plantes possédant les constructions *pPR1::GUS*, *l*orsqu'ils sont pulvérisées à plusieurs reprises successives, les plantes ont été soumise à un test de l'effet cumulatif de ces produits.



Figure 65 : Test de l'effet cumulatif de produits activant les défenses sur les plantes possédant la construction *pPR1::GUS*. Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec de l'eau, ou les produits testés puis remises en culture durant 48h. Elles sont alors de nouveau traitées avec de l'eau, ou les produits testés. Elles sont alors de nouveau traitées, avec du SA, du MeJA, de l'eau ou les produits traités. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Les plantes traitées deux fois avec de l'eau puis avec du SA (témoin positif), traitées trois fois successives avec du Bion[®], du Vacciplant, du Stifenia, du Messager[®], du BABA ou du chitosan montrent une coloration bleue. Ces traitements successifs induisent donc l'expression du gène *PR1* et activent donc la voie de défense impliquant le SA. Les plantes traitées trois fois avec de l'eau (témoin négatif), du MeJA (témoin positif de la voie impliquant le couple JA/ET), de la flagelline ou de l'H₂O₂ ne montrent pas de coloration (Figure 65). Les plantes possédant la construction *pPR1::GUS* ne répondent donc pas à ces traitements et la pulvérisation de MeJA n'induit pas d'effet sur ces plantes.

Afin de visualiser si ces SDP et éliciteurs sont capable d'induire une coloration dans les plantes possédant les constructions *pLOX2::GUS*, *l*orsqu'ils sont pulvérisées à plusieurs reprises successives, les plantes ont été soumise à un test de l'effet cumulatif de ces produits.



Figure 66 : Test de l'effet cumulatif de produits activant les défenses sur les plantes possédant la construction *pLOX2 ::GUS*. . Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec de l'eau, ou les produits testés puis remises en culture durant 48h. Elles sont alors de nouveau traitées avec de l'eau, ou les produits testés. Elles sont alors de nouveau traitées, avec du SA, du MeJA, de l'eau ou les produits traités. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 2 fois.

Les plantes traitées deux fois avec de l'eau puis avec du MeJA (témoin positif) ou traitées trois fois successives avec de l'H₂O₂ montrent une coloration bleue. Ces traitements successifs induisent donc l'expression du gène *LOX2* et donc l'activation de la voie impliquant le JA/ET. Les plantes traitées trois fois avec de l'eau (témoin négatif), du SA (témoin positif de la voie impliquant le SA), ou tous les autres SDP ou éliciteurs testés ne montrent pas de coloration (Figure 66). Les plantes possédant la construction *pLOX2::GUS* ne répondent donc pas à ces traitement et la pulvérisation de SA n'induit pas d'effet sur ces plantes.

3.8 Transfert de la technologie vers Staphyt

Afin de transférer le test GUSTAVE vers le laboratoire de Staphyt, à Bordeaux, le matériel et les consommables nécessaires à l'application de ce test ont été listés et achetés. Le test GUSTAVE a été réalisé à plusieurs reprises dans ce laboratoire, et différents documents ont été rédigés. De plus différents clients ont déjà sollicité l'expertise sur ce test (4 entreprises) et deux différents contrats ont d'ores et déjà été signés et réalisés. Ainsi, le protocole de l'expérimentation a été rédigé de manière à correspondre aux normes utilisées au sein de l'entreprise (Annexe 2). Un tableau interactif a été créé afin de pouvoir calculer rapidement le coût vendu d'un test en fonction du nombre de modalités souhaitées par le client (Annexe 3). Un devis type (Annexe 4), un plan d'étude type (Annexe 5) et un rapport d'étude type (Annexe 6), tous trois avec liste déroulante ont été écrits afin de faciliter le travail des personnels de Staphyt qui pourraient proposer ce test.

3.9 Application à un cas concret

L'outil GUSTAVE a déjà fourni des informations significatives pour la compréhension de mode d'action, mais aussi pour adapter les essais sur le terrain à une meilleure connaissance du comportement des produits. Ainsi nous avons testé un SDP en voie de développement par un de nos clients (appelé ici SDP1 par soucis de confidentialité) à l'aide du test GUSTAVE, uniquement sur les plantes possédant la construction *pPR1 ::GUS* avec un test d'élicitation direct et un test cumulatif mais avec uniquement deux pulvérisation successives.

Les résultats du test d'activation directe via l'expression du gène rapporteur *PR1* montrent que les témoins positifs acide salicylique (SA) et Bion[®] induisent les mécanismes de défense chez *A. thaliana*. Dans ce contexte, il est clairement démontré que le produit expérimental SDP1 ne génère qu'une activation de l'expression de *PR1* limitée au niveau des cotylédons (Figure 67).



Figure 67 : Test d'élicitation du produit testé sur les plantes possédant la construction *pPR1 ::GUS.* Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées avec de l'eau, du SA, du Bion® ou du produit testé. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 3 fois.

Au vu de ces résultats, un test avec plusieurs applications pour activer les défenses des plantes via l'outil GUSTAVE a été entrepris.

Des plantes d'*A. thaliana* possédant la construction *pPR1 ::GUS* ont été pulvérisées une première fois avec de l'eau (témoin négatif) ou avec le produit expérimental SDP1. Ensuite, une seconde pulvérisation a été effectuée 48h après avec soit du SA ou du Bion[®] (témoins positifs), soit avec le produit expérimental SDP1. Les plantes pulvérisées deux fois avec de l'eau ne présentent pas de coloration bleue, montrant la non induction des défenses. Les plantes ayant reçues les traitements SA et Bion[®] en seconde application montre des résultats équivalents à ceux de l'activation directe, avec une coloration bleue marquée. Comme précédemment, le traitement à l'eau suivi de l'application du produit expérimental SDP1 ne démontre qu'une activation limitée du gène *PR1*, marqueur de défenses des plantes de type SAR. Par contre les plantes pulvérisées une première fois avec le produit SDP1 suivi par une nouvelle pulvérisation du produit SDP1 sont colorées en bleu. Ces résultats suggèrent fortement que le produit expérimental SDP1 nécessite une accumulation d'application pour activer les défenses de type SAR et ne semble pas un activateur direct comme le Bion[®] (Figure 68).



Figure 68 : Test d'effet cumulatif du produit testé sur les plantes possédant la construction *pPR1 ::GUS.* Les plantes de 3 semaines sont pulvérisées une première fois avec de l'eau ou le SDP1 puis avec de l'eau, du SA, du Bion® ou du produit testé. Les plantes sont alors remises en culture durant 24h puis les rosettes sont récoltées et incubées dans le tampon de coloration GUS pendant la nuit avant d'être décolorées et photographiées. Chaque expérimentation a été réalisée 3 fois.

Fort de cette information concernant le mode d'action « par accumulation » du produit expérimental SDP1, des expérimentations en conditions naturelles au vignoble ont été menées et le protocole adapté à ce type de produit.

Ces résultats suggèrent le besoin de positionner au moins 2 applications du produit en préventif afin de maximiser son potentiel de protection des plantes. Dans cet objectif, le protocole expérimental pour des essais sur vigne réalisés en 2015-2016 par les équipes de Staphyt, a été adapté afin de positionner stratégiquement plusieurs applications de produit en amont de l'infection.

Le détail de ces essais sur vigne ne sera pas présenté ici car ils ne font pas partie des résultats obtenus au cours de cette thèse et par soucis de confidentialité. L'important à savoir est que l'approche expérimentale permettant de détecter l'activation des mécanismes de défense avec des plantes d'*A. thaliana* exprimant la fusion *PR1::GUS*, a permis de démontrer que le produit expérimental SDP1 n'active pas directement ou peu la voie systémique de la SAR mais nécessite au moins une double

application du produit pour activer les défenses de la plante. Ces résultats de laboratoire ont donc suggéré fortement la nécessité de positionner au moins 2 applications du produit en préventif afin d'activer son potentiel de protection des plantes. Ainsi, le protocole expérimental pour les essais en conditions naturelles au vignoble a été adapté dans le but de positionner stratégiquement plusieurs applications de produit (au moins 2) en amont de l'infection (dès le stade 4 feuilles si nécessaire). Suite à l'adaptation du protocole expérimental pour mener des expérimentations en conditions naturelles ciblant le mildiou de la vigne en Europe sur les saisons 2015 et 2016, les résultats obtenus avec le produit expérimental SDP1 sont encourageants. En effet, l'efficacité intrinsèque du produit SDP1 a été notable sur grappes (plus de 50% sur l'incidence du mildiou) même si le niveau de protection de la vigne reste insuffisant appliqué seul. Les résultats prometteurs obtenus dans les différents essais menés sur les 2 campagnes d'expérimentation 2015-2016 semblent donc conforter les résultats issus du test GUSTAVE en laboratoire.

Ainsi le test GUSTAVE a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes induit par un SDP en voie de développement par un des clients de Staphyt. Ce test a aussi permis d'optimiser les protocoles de test au champ de ce produit ce qui a permis de montrer une certaine efficacité de ce produit qui est à l'heure actuelle dans les dernières étapes avant dépôt pour homologation.

3.10 Discussion

Afin de développer le test GUSTAVE, nous avions besoin de deux lignées possédant des fusions transcriptionnelles permettant de montrer simplement l'activation de la voie de défense impliquant le SA et de celle impliquant le JA.

Les plantes possédant la construction *pPR1::GUS* permettent bien de montrer l'activation de la voie impliquant le SA, en effet elles répondent à l'élicitation par le SA et par un SDP commercial connu pour activer cette voie, le Bion[®]. De plus, ces plantes ne répondent à aucun autre stimulus hormonal, elles constituent donc un bon outil pour développer la partie de ce test permettant de montrer l'activation de la voie impliquant le SA.

Nous n'avons pas été capables d'utiliser les plantes possédant la construction *pPDF1.2::GUS* afin de montrer l'activation de la voie impliquant le JA. En effet ces plantes montrent une activation constitutive de l'expression du gène *GUS*. Il est possible que les conditions de culture utilisées pour ce test ne permettent pas d'obtenir un témoin négatif, bien que nous en ayons testées plusieurs. Nous avons donc utilisé des plantes possédant la construction *pLOX2::GUS* qui permettent bien de montrer l'activation de la voie impliquant le JA. En effet elles répondent à l'élicitation par le MeJA, éliciteur connu pour activer cette voie JA. De plus ces plantes ne répondent à aucun autre stimulus hormonal,

104

elles sont donc un bon outil pour développer la partie de ce test permettant de montrer l'activation de la voie impliquant le JA.

De plus, contrairement à ce qu'avait montré A. Koornneef en 2008 (Koornneef and Pieterse, 2008), les deux constructions pPR1::GUS et pLOX2::GUS répondent lorsque les plantes sont traitées simultanément avec du SA et du MeJA. Ceci suggère que les deux voies SA et JA ne sont pas forcément antagonistes l'une de l'autre comme le suggère un grand nombre de publications (Andargie and Li, 2016; Caarls et al., 2015; Feys and Parker., 2000; Glazebrook., 2005; Glazebrook et al., 2003; Koornneef et al., 2008; Leon-Reyes et al., 2010a; Maleck, 1999; Pieterse et al., 1998; Thaler et al., 2002; Van der Does et al., 2013; Van Wees, 1999). Il a d'ailleurs déjà été montré que ces deux voies peuvent être activées de manière concommitante. En effet les gènes PRs peuvent être exprimés les premiers jours après l'infection par Trichoderma hamatum qui est connu pour activer la voie JA (Mathys et al., 2012). L'infection par Verticillium dahliae (Sun et al., 2014), l'infection par Pseudomonas syringaea (Gkizi et al., 2016; Lee et al., 2015), le traitement avec du DCA (Zarattini et al., 2017), le traitement avec de fortes concentration de SA et MeJA (Guo and Stotz, 2007; Mur, 2005; Schenk et al., 2000), et même le traitement avec des iturines (Flors et al., 2007; Kawagoe et al., 2015) peuvent induire l'expression des gènes marqueurs de ces deux voies de défense impliquant le SA et JA de manière simultanée. Cet antagonisme ou synergisme observé dans différentes conditions pourrait être dû à un effet dose des hormones impliquées, à une mise en place de ces différentes voies différentielle dans le temps ou même à l'implication d'autres voies hormonales dans la régulation des défenses générales (Berens et al., 2017).

Nous avons montré que les deux lignées répondent aux stimuli dès 6h après le traitement. Il est ainsi possible de récolter les plantes dès 6h après le traitement, mais pour des raisons pratiques d'expérimentation la récolte des plantes se fera 24h après traitement dans le cadre du test GUSTAVE.

Nous avons ensuite montré que l'utilisation de ces lignées pouvait permettre de montrer l'activité potentialisatrice d'un SDP potentiel en traitant les plantes avec de la flagelline ou du chitosan 48h après le traitement par un SDP pour la lignée possédant la construction *pPR1::GUS*. Le protocole permettant de montrer ceci peut encore être amélioré car nous n'obtenons pas une activation suffisamment forte du gène rapporteur par rapport au témoin. Il sera aussi nécessaire d'utiliser un produit connu pour potentialiser la voie de défense impliquant le JA afin de valider le protocole de test de potentialisation pour la lignée possédant la construction *pLOX2::GUS*.

De manière intéressante il a aussi été montré que lorsqu'un SDP, qui ne montre pas d'effet avec une seule pulvérisation, est pulvérisé plusieurs fois, ce test permet de mettre en évidence

105

l'activation des défenses. Ceci est en accord avec l'utilisation effective des SDP sur le terrain qui nécessitent plusieurs pulvérisations au cours d'un itinéraire cultural afin de montrer une efficacité.

Nous avons pu montrer l'effet cumulatif pour le même SDP avec le test GUSTAVE ainsi qu'avec un test terrain. En effet les résultats obtenus sur un SDP en cours de développement appartenant à un des clients de Staphyt montrent l'importance des multiples pulvérisations.

Le test de laboratoire GUSTAVE développé durant cette thèse, est donc un test instructif, simple et peu coûteux, permettant de valider l'effet d'activation direct ou non d'une préparation et de préciser quelle voie de défense est activée.

Ce test a permis d'appréhender le mode d'action d'un produit expérimental en développement et ainsi d'optimiser sa stratégie d'application pour l'expérimentation en champ. D'autres utilisations du test GUSTAVE peuvent être encore envisagées, par exemple afin de d'effectuer une présélection de produits potentiellement SDP à partir d'un panel de molécules. De plus ce test permet bien de montrer l'activation des défenses au niveau transcriptionnel et pourra donc être utilisé CEB pour répondre demandes exprimées dans la méthode (MG14) aux (https://www.elicitra.org/index.php?rub=methode ceb mg 14 principes generaux d experimenta tion des sdp 2) exigeant de montrer l'activation des défenses par un produit afin de pouvoir l'homologuer comme SDP.

Chapitre 4. Impact de la nutrition azotée et du stade de développement des plantes sur la réponse aux éliciteurs

Afin de déterminer l'impact de la fertilisation azotée et du stade de développement sur la réponse aux SDP, nous avons mis en œuvre des essais en conditions contrôlées et des essais en plein champ.

4.1 Impact physiologique de la nutrition azotée et du stade de développement des plantes en <u>conditions contrôlées</u>

Pour réaliser nos expérimentations en conditions contrôlées, la plante modèle *A. thaliana* a été choisie. Afin d'étudier l'impact de la nutrition azotée sur la mise en place des défenses, nous avons décidé de tester 3 conditions physiologiques différentes : condition 1 : carence en azote, condition 2 : nutrition azotée optimale, condition 3 : sur-fertilisation azotée (Figure 69).



Figure 69 : Plan expérimental pour l'étude de l'effet des SDP en fonction de l'apport en azote et du stade de développement de la plante : Les différents stades du développement d'A. thaliana selon (Boyes et al., 2001). Stade 0 : Germination ; stade 1 : Développement des premières feuilles ; stade 2 : Développement de la rosette ; stade 3 : Induction florale ; stade 4 : Floraison ; stade 5 : Maturation des graines. Les plantes sont cultivées en présence de 2 mM, 10 mM ou 26 mM de nitrate et sont traitées aux stades 1, 2, 3, 4 avec du Bion[®] du MeJA ou de l'eau puis prélevées pour analyse 48 h après le traitement.

Les conditions 1 et 2 ont déjà été décrites par Lemaître et al. (Lemaitre et al., 2008). La condition 1 correspond à une carence azotée avec 2 mM de nitrate. La condition 2 correspond à une nutrition optimale avec 10 mM de nitrate.
Aucune référence bibliographique n'a été trouvée pour les conditions de sur-fertilisation azotée (condition 3) chez *A. thaliana*. L'apport de 50 mM de nitrate est létal (C. Masclaux-Daubresse et F. Chardon communication personnelle). Nous avons donc cultivé les plantes en présence de 26 mM de nitrate qui s'est avéré avoir un impact négatif sur la croissance (voir ci-dessous) sans être létale. Nous avons donc considéré que la concentration de 26 mM correspond à une sur-fertilisation.

Quatre stades de développement ont été considérés représentant 4 étapes distinctes du cycle de vie d'*A. thaliana* et correspondant à un intervalle d'une semaine entre les stades (Boyes et al., 2001).

Pour caractériser l'influence des trois conditions appliquées de fertilisation azotée au cours du cycle de culture d'*A. thaliana*, l'aspect des plantes a été observé (Figure 70) et plusieurs paramètres physiologiques de croissance des plantes (nombre de feuilles et surface projetée de la rosette) et de l'état nutritionnel en azote des plantes (dosage des nitrites et des acides aminés) ont été mesurés (Figure 71). La mesure de ces paramètres a pour objectif de vérifier que les conditions 1 et 3 correspondent à des stress « carence » et « sur-fertilisation » respectivement en répondant aux deux questions suivantes :

- 1- La condition 1 de nutrition azotée avec 2 mM de nitrate a-t-elle un impact sur la physiologie de la plante ?
- 2- La condition 3 de nutrition azotée avec 26 mM de nitrate a-t-elle un impact sur la physiologie de la plante ?





Comme attendu, le contenu en nitrate et nitrites ainsi que la teneur en acides aminés sont significativement inférieures lorsque les plantes sont fertilisées avec 2 mM de nitrate, comparé à celles fertilisées avec 10 mM et 26 mM, et ce, à partir du stade 2. Des résultats similaires ont été observés au niveau du dénombrement des feuilles traduisant une croissance réduite chez les plantes cultivées avec 2 mM de nitrate comparé à celles cultivées en présence de 10 mM ou 26 mM et ce, à partir du stade 2. Ces résultats indiquent que les conditions de culture à 2 mM correspondent bien à une carence azotée.

Les conditions de culture des plantes à 26 mM de nitrate résultent en une diminution significative du nombre de feuilles au stade 4 et en une diminution de la surface de la rosette au stade 3. Ces résultats indiquent que les conditions de culture à 26 mM affectent la croissance de la plante à partir du stade 3.



Figure 71 : Impact des différents taux de fertilisation en nitrate et du stade de développement sur la physiologie d'A. *thaliana.* Trois niveaux de nitrate sont utilisés pour cultiver les plantes et leur impact est mesuré à différents stades de développement. A : Teneur totale en nitrates+nitrites en µmol / mg de rosette en fonction du stade et du niveau de fertilisation en nitrates. Ces résultats représentent la moyenne de la teneur en nitrates+nitrites mesurée sur 10 plantes dans 3 expériences biologiques. B : Teneur totale en acides aminés en µmol / mg de poids frais de rosette en fonction du stade et du niveau de fertilisation en nitrate. Ces résultats représentent la moyenne des teneurs en acides aminés mesurées sur la poudre issue de 10 plantes dans 2 expériences biologiques. C : nombre de feuilles par plante en fonction du stade et du niveau de nitrate. Ces mesures représentent la moyenne de feuilles de 10 plantes dans 3 expériences biologiques. D : Moyenne de la surface projetée de la rosette en cm² au stade végétatif en fonction du stade et du niveau de nitrate et mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats correspondent à la moyenne de la surface de 6 rosettes provenant de 2 expériences biologiques. Les barres d'erreur représentent l'écart type et les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons provenant de plantes cultivées avec différents niveaux de fertilisation en nitrate, stade par stade, avec *p <0,05* calculé par test t.

Au premier stade de développement (stade 1) un très faible impact de la nutrition est mesurable sur les paramètres physiologiques mesurés. Les stades précoces de développement de la plantule étant indépendants de la fourniture en azote du milieu, les jeunes plantules utilisent leurs stocks d'azote présent dans la graine pour assurer leur développement dans un premier temps.

Ensemble, ces dosages et mesures physiologiques montrent que les trois conditions nutritionnelles testées et retenues pour les travaux engendrent une réponse physiologique de la plante différente. Un apport en nitrate de 2 mM est limitant et un apport en nitrate de 26 mM correspond à une fertilisation excessive, tandis que 10 mM semble être l'apport optimal en nitrate.

4.2 Influence de la fertilisation en nitrates et des stades de développement sur la capacité des éliciteurs à induire l'expression des gènes de défense <u>en conditions contrôlées</u>

Pour déterminer si l'activation des mécanismes de défense par les SDP est dépendante de la fertilisation azotée et/ou du stade de développement, les plantes d'*A. thaliana* ont été traitées avec deux éliciteurs différents. Les plantes ont été traitées soit avec un SDP activant la voie de défense dépendante du SA (acibenzolar-S-methyl, Bion[®]), soit avec un éliciteur activant la voie dépendante de l'acide jasmonique (méthyl-jasmonate, MeJA) à chacun des 4 stades et sous les 3 régimes de nutrition azotée. Les profils d'expression de deux gènes de la voie dépendante du SA (*PR1* et *PR5*) et de deux gènes marqueurs de la voie dépendante du JA (*LOX2* et *PDF1.2*) ont été analysés par RT qPCR 48 heures après le traitement par les SDP. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les résultats présentés sont représentatifs des 3 répétitions biologiques.

Ainsi les figures ci-dessous montrent les résultats obtenus pour la répétition biologique la plus représentative. Les tendances observées seront donc décrites et commentées dans le corps du texte.

Concernant la voie dépendante du SA, les profils d'expression de *PR1* et *PR5* sont similaires et peuvent donc nous renseigner de manière fiable sur l'activation de cette voie. Les niveaux de transcription des gènes *PR1* et *PR5* augmentent après le traitement au Bion® par rapport au traitement témoin. L'intensité de l'induction varie en fonction de l'apport en nitrates et du stade de la plante (Figure 72). Concernant l'effet de l'apport en nitrate, le niveau maximal d'expression de *PR1* et *PR5* est observé sous les conditions de fertilisation optimales à 10 mM nitrate aux 4 stades de développement. Les niveaux d'expression de *PR1* et *PR5* sont plus faibles à 2 mM et à 26 mM.

Concernant l'effet du stade, il varie en fonction de la nutrition azotée. Avec 10 mM de nitrate, l'expression des deux gènes marqueurs est similaire aux 4 stades indiquant qu'il n'y a aucun effet stade de développement sous régime optimal de nutrition azotée. Avec 2 mM de nitrate, l'expression

de *PR1* et *PR5* est plus élevée au stade 1 qu'aux 3 autres stades, indiquant qu'il existe un impact du stade de développement sous régime carencée en azote. Avec 26 mM de nitrate, l'expression de *PR1* et *PR5* est plus élevée au stade 2 qu'aux 3 autres stades, indiquant qu'il existe un impact du stade de développement sous régime de sur-fertilisation en azote.

D'une manière similaire au Bion[®] mais bien moins marquée (10 fois moins), le traitement au MeJA a également induit une augmentation des transcrits *PR1* et *PR5* mais uniquement en condition optimale de fertilisation (10 mM) et à partir du stade rosette (stade 2).



Figure 72 : Impact de la fertilisation azotée sur l'expression des gènes de défense représentatifs de la voie SA 48 heures après le traitement avec des éliciteurs. Trois niveaux de nitrate sont utilisés pour cultiver les plantes et l'impact de la fertilisation et du traitement par l'éliciteur sur l'expression des gènes de défense est mesuré par RT-qPCR aux quatre stades de développement étudiés. Ces résultats représentent le niveau de transcription dans une unité arbitraire normalisée par le niveau de transcription du gène constitutif Clathrine et mesurés sur un échantillon de poudre provenant de 10 plantes d'une expérience biologique représentative des résultats obtenus dans deux autres expériences biologiques. Les résultats sont similaires entre chaque expérience biologique. A : niveau de transcription normalisé du gène *PR1* 48h après le traitement Bion[®]. B : Niveau de transcription normalisé du gène *PR5* 48h après le traitement Bion[®]. D : Niveau de transcription normalisé du gène *PR5* 48h après le traitement MeJA. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois réplicas techniques. Des agrandissements des données obtenues après le traitement avec du Me-JA sont présentés.

La principale différence au niveau des profils d'expression des gènes *PR1* et *PR5* en réponse aux deux éliciteurs utilisés est observable en conditions de fertilisation azotée optimale au stade 1. Dans ce cas, le traitement Bion[®] provoque une activation de l'expression des transcrits *PR1* et *PR5* alors que le MeJA provoque une répression de ces transcrits. Concernant la voie impliquant le JA, les niveaux de transcription de *LOX2* (JA dépendant) et *PDF1.2* (JA/ET dépendant) présentent des profils qui varient à certains points selon l'expérience biologique. Les tendances observées ne sont reproductibles entre chacune des 3 expériences biologiques qu'aux stades 1 et 2. Ainsi, ne seront considérés que ces 2 stades de développement pour l'analyse de l'expression des 2 gènes marqueurs de la voie du JA (Figure 73).



Figure 73 : Impact de la fertilisation azotée sur l'expression des gènes de défense représentatifs de la voie JA 48 heures après le traitement avec des éliciteurs. Trois niveaux de nitrate sont utilisés pour cultiver les plantes et l'impact de la fertilisation et du traitement par l'éliciteur sur l'expression des gènes de défense est mesuré par RT-qPCR aux quatre stades de développement étudiés. Ces résultats représentent le niveau de transcription dans une unité arbitraire normalisée par le niveau de transcription du gène constitutif Clathrine et mesurés sur un échantillon de poudre provenant de 10 plantes d'une expérience biologique représentative des résultats obtenus dans deux autres expériences biologiques. Les résultats sont similaires entre chaque expérience biologique. A : niveau de transcription normalisé du gène *PDF1.2* 48h après le traitement Bion[®]. B : Niveau de transcription normalisé du gène *PDF1.2* 48h après traitement Bion[®]. D : Niveau de transcription normalisé du gène *LOX2* 48 h après le traitement MeJA. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois réplicas techniques.

Au stade 1 et stade 2, les profils d'expression de *PDF1.2* et *LOX2* varient en fonction de la dose en nitrate et du stade de développement. Tout d'abord, le niveau d'expression des gènes *LOX2* et *PDF1.2* dans le contrôle négatif (traité à l'eau) varie en fonction de la fertilisation azotée, à la différence des gènes impliqués dans la voie du SA (cf. graphe *PR1/PR5*). Ainsi, il est remarqué que le comportement est différent entre les 2 stades étudiés au niveau de l'expression de *PDF1.2* alors que l'expression de *LOX2* est similaire aux 2 stades. Concernant l'expression de *LOX2* dans les témoins (eau), il est clairement démontré que l'expression de base de ce gène est maximale à l'optimum de fertilisation azotée (10 mM), légèrement réduite en conditions de sur-fertilisation (26 mM) mais clairement limitée en conditions de sous-fertilisation (2 mM). Cela suggère que la voie de biosynthèse de JA (via *LOX2*) serait modulée par le statut azoté de la plante et en particulier en condition de carence azotée. Ce profil d'expression dans les témoins est également retrouvé au niveau de *PDF1.2* au stade rosette (stade 2) avec une différence entre la condition de sous-fertilisation et les conditions azotées optimale ou en excès. L'ensemble des résultats observés sur les témoins (eau) suggèrent une régulation fine de la voie impliquant le JA par l'azote, cette hormone étant impliquée dans de nombreux processus physiologiques du développement des plantes.

Le traitement au Bion[®] réprime l'expression de *LOX2* pour les conditions azotées non limitantes (10 et 26 mM) alors que le niveau de transcrit de ce gène n'est pas modifié en condition de carence azotée. D'autre part, le traitement Bion[®] réprime l'expression de *PDF1.2* dans toutes les conditions de fertilisation azotée testées. Ces résultats suggèrent que le traitement au Bion[®] (un analogue du SA) peut compromettre la voie JA quel que soit le stade et le statut azoté.

En réponse au traitement MeJA, les profils d'expression de *PDF1.2* et de *LOX2* dépendent des stades et du niveau de fertilisation azotée. Le gène *LOX2* répond mieux au MeJA que le gène *PDF1.2* indiquant que c'est un meilleur marqueur de la voie JA. En effet, l'expression du gène *LOX2* est induite dans un plus grand nombre de situations que l'expression du gène *PDF1.2*.

Ainsi, le traitement au MeJA conduit à une augmentation coordonnée de l'expression de *PDF1.2* et *LOX2* en condition de sous-fertilisation au stade 2. Par ailleurs, le traitement au MeJA conduit à une répression coordonnée de l'expression de *PDF1.2* et *LOX2* en condition de sur-fertilisation au stade 2. L'expression de *LOX2* est induite dans les stades 1 et 2 sous régime de 2 mM nitrate et au stade 1 sous régime de 26 mM nitrate.

Ensemble, ces données indiquent que la capacité des éliciteurs à activer les gènes de défense dépend à la fois du stade et de l'apport en nitrates. Ainsi, l'expression des gènes de défense SAdépendant (*PR1* et *PR5*) est conditionnée par le statut azoté de la plante avec un maximum d'induction à l'optimum nutritionnel de 10 mM de nitrate. L'expression des gènes impliqués dans la voie du JA semble particulièrement affectée par le stade de la plante. La forte variabilité entre les 3 expériences biologiques aux stades avancés (stade 3 et stade 4) indique qu'à ces stades, la réponse aux éliciteurs sur la voie JA est peu robuste.

Ainsi, ces résultats obtenus par analyse transcriptionnelle du suivi des gènes marqueurs des voies de défense dépendant du SA ou du JA, donnent une indication sur l'impact de la fertilisation en nitrate et du stade de développement de la plante sur l'activation possible de ces mécanismes de

113

défense. Néanmoins, il apparait intéressant de suivre un marqueur protéique des défenses. Pour ce faire, l'anticorps développé au cours de cette thèse (ciblant la protéine NPR1, Chap 2) a été utilisé.

4.3 Influence de la fertilisation en nitrates et des stades de développement sur la capacité des éliciteurs à induire l'accumulation d'une protéine de défense en <u>conditions contrôlées</u>

Dans le chapitre 2, nous avons identifié un marqueur protéique dont l'accumulation est fortement corrélée avec l'activation des défenses. Nos résultats suggèrent fortement que ce marqueur protéique correspond à la protéine NPR1 sous une forme active clivée détectée par l'antipep0 et l'antipep1. Cependant, par souci de rigueur, nous utiliserons le terme de marqueur protéique de défense « PDNL38 » dans la suite du manuscrit.

Afin de déterminer si ce marqueur protéique de défense s'accumule de manière différentielle selon les stades de développement et la fertilisation, l'antipeptide antipep0 ciblant PDNL38 a été utilisé en western blot sur des plantes, traitées ou non avec les éliciteurs (Bion[®] ou MeJA) et sous les différentes conditions de culture (Figure 74).

Les résultats obtenus ont montré une variabilité importante aux stades 1 et 4. Ces stades correspondent critiques du développement de la plante, ce qui pourrait expliquer une variabilité de leur réponse au stress. L'accumulation du marqueur protéique de défense ne sera analysée qu'au cours des stades 2 et 3.

Suite à un traitement au Bion[®], le niveau d'accumulation du marqueur protéique PDNL38 augmente par rapport au témoin eau sous les 3 régimes azotés. Le niveau d'accumulation de PDNL38 est plus élevé à 10 mM de nitrate qu'aux deux autres régimes azotés.

Suite à un traitement au MeJA, le niveau d'accumulation du marqueur protéique PDNL38 augmente par rapport au témoin eau sous les 3 régimes azotés. Cependant, l'intensité de l'accumulation de PDNL38 en réponse au MeJA est un peu plus faible à 10 mM de nitrate qu'aux deux autres régimes azotés.

Sous le régime de fertilisation optimal (10 mM nitrate), le marqueur PDNL38 s'accumule avec une plus faible intensité après un traitement MeJA qu'après un traitement Bion[®].

Globalement, l'accumulation de PDNL38 suite aux traitements éliciteurs est similaire aux stades 2 et 3.

Ces résultats indiquent que le marqueur PDNL38 répond aux traitements éliciteurs quand la plante est aux stades végétatifs mais n'est pas robuste aux stades de développement précoce ou floraison.



Figure 74 : Impact de la fertilisation azotée et du stade de développement sur l'accumulation PDNL38, la protéine détectée par antipep 0. A : Détection de PDNL38 en western blot par antipep 0 et coloration au bleu de Coomassie de la membrane correspondante sur des extraits de plante d'*A.thaliana* cultivées en terre et traitées avec de l'eau, du Bion® ou du MeJA aux stades de développement 2 et 3. B : Intensité relative des bandes détectées en western blot (PDNL38) normalisée par l'intensité de la bande correspondant à la RuBisCo à l'aide du logiciel ImageJ. Les barres bleues correspondent aux plantes traitées à l'eau, les barres violettes aux plantes traitées avec du Bion et les barres vertes aux plantes traitées avec du MeJA.

4.4 Influence de l'apport en nitrate sur l'efficacité de protection des SDP <u>en conditions</u> <u>contrôlées</u>

Après avoir vérifié que les éliciteurs utilisés (Bion® et MeJA) engendrent une réponse au niveau de l'expression des gènes marqueurs des voies de défense SA et JA/ET dépendantes, un test d'efficacité de protection *in planta* a été réalisé sur un pathosystème modèle *Dickeya dadantii / Arabidospsis thaliana*. *D. dadantii* est une bactérie nécrotrophe pathogène d'A. thaliana. Les mécanismes de défense impliqués dans la tolérance d'*A. thaliana* impliquent la voie de défense JA/ET et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (Fagard et al., 2007). Pour savoir si la fertilisation en nitrates influence l'activité protectrice des éliciteurs, nous avons décidé d'utiliser des plantes au stade 2 (stade rosette) car il correspond au stade d'infection de la bactérie sur ses hôtes naturels. En

effet, *D. dadantii* est décrite pour infecter les plantes durant leur stade végétatif au champ (Reverchon et al., 2016). Ce stade est également celui exploité dans les études utilisant ce pathosystème (Fagard et al., 2007; Rigault et al., 2017). De plus, au stade 2 que les mécanismes de défense décrits plus haut sont influencés par la nutrition azotée.

Comme précédemment, les deux éliciteurs employés ont été: le MeJA et le Bion[®], l'eau a été utilisée comme le contrôle négatif. Deux jours après le traitement avec l'éliciteur ou l'eau, les plantes ont été inoculées avec une suspension bactérienne de *D. dadantii*. Les symptômes de la maladie ont été mesurés 48 heures pos- inoculation (p.i), de deux manières différentes : le pourcentage de succès d'infection (fréquence de maladie) qui reflète le pouvoir pathogène et la proportion de surface macérée dans chaque feuille (intensité de la maladie) qui reflète l'agressivité de la bactérie.

Pour savoir si l'apport en nitrate affecte la sensibilité basale d'*A. thaliana* aux bactéries en absence d'éliciteurs, la quantification des symptômes des plantes témoin (traitées à l'eau) a été comparée dans les 3 conditions de fertilisation en nitrate (2, 10 et 26 mM). Le niveau de fertilisation en nitrate n'a pas d'impact sur le pourcentage de succès de l'infection, ni sur la proportion de surface macérée (Figure 75 A, C). Ces résultats indiquent que le niveau d'infection des plantes est similaire dans les trois conditions nutritionnelles appliquées et montrent que l'agressivité de cette bactérie phytopathogène n'est pas influencée par la fertilisation azotée dans nos conditions de culture.

Le traitement au Bion[®] provoque une augmentation de la fréquence d'infection par *D. dadantii* aux 3 régimes de fertilisation azotée. Le traitement au Bion[®] provoque une augmentation de l'intensité de la maladie uniquement en condition de carence azotée (Figure 75 B, D).

Le traitement MeJA n'a pas d'effet sur la fréquence d'infection par *D. dadantii* aux 3 régimes de fertilisation azotée. Le traitement au MeJA induit une diminution de l'intensité de la maladie uniquement en condition de nutrition optimale en nitrates (Figure 75 B, D).

L'ensemble de ces données montrent que, selon l'éliciteur utilisé, le niveau de fertilisation en nitrate peut influencer la capacité des éliciteurs à protéger la plante contre un agent pathogène donné, dans notre cas *D. dadantii*. Selon ces premières observations, il existerait un optimum de fertilisation en nitrate pour lequel la plante peut mettre en place des défenses effectives.

Néanmoins, il est clairement démontré dans nos travaux sur le pathosystème *D. dadantii/A.thaliana* que l'application du Bion[®] peut être préjudiciable lorsque les plantes sont confrontées à un agent pathogène nécrotrophe (plus de feuilles infectées) et plus particulièrement lorsqu'elles sont soumises à une carence en azote.



Figure 75 : Impact de la fertilisation azotée sur la protection contre la bactérie pathogène *D. dadantii***48 heures après I'application d'éliciteurs (Bion® et MeJA).** Trois niveaux de nitrate sont utilisés pour cultiver les plantes et l'impact de la fertilisation et du traitement SDP est mesuré au stade2 végétatif « rosette » 48 heures après le traitement. Les résultats sont obtenus à partir de 32 feuilles inoculées sur 4 expériences biologiques indépendantes. A : Proportion de feuilles inoculées présentant des symptômes 48 h après inoculation pour les plantes traitées à l'eau. B : Proportion de feuilles présentant des symptômes 48 h après inoculation pour les plantes traitées à l'eau. B : Proportion de feuilles présentant des symptômes 48 h après inoculation. C : Pourcentage de macération de la surface foliaire mesuré à l'aide du logiciel ImageJ provenant de plantes traitées à l'eau. D : Pourcentage de macération de la surface foliaire mesuré à l'aide du logiciel ImageJ. A & B : Les barres d'erreur représentent l'écart type, les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons des différents niveaux de fertilisation azotée, stade par stade, avec p <0,05 calculé par test Khi² de la proportion. C & D : les barres d'erreur représentent l'erreur standard et les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons avec différents niveaux de fertilisation azotée analysés stade par stade, avec p <0,05 calculé par le test T. Les barres bleues correspondent aux plantes traitées à l'eau, les barres violettes aux plantes traitées avec du Bion et les barres vertes aux plantes traitées avec du MeJA.

4.5 Implication de la protéine clef NPR1 dans l'activité des éliciteurs en <u>conditions</u> <u>contrôlées</u>

Afin de savoir si les différences d'immunité observées sous les 3 régimes nutritionnels étudiés impliquent des mécanismes de signalisation dépendants du SA et/ ou du couple JA/ET, il est apparu intéressant d'étudier l'immunité déclenchée par les deux éliciteurs en fonction de la fertilisation azotée chez un mutant affecté dans la régulation des voies SA et JA/ET. En tant qu'acteur clef de l'immunité des plantes, la protéine NPR1 est impliquée à la fois dans les voies de signalisation SA et JA (Mao et al., 2007; Pieterse and Van Loon, 2004; Spoel, 2003). Nous avons donc utilisé le mutant *nPR1.1*.

Pour savoir si la mutation *npr1.1* affecte la sensibilité de base d'*A. thaliana* à la bactérie *D. dadantii* en fonction de l'apport en nitrate, les symptômes des plantes témoin (traitées à l'eau) ont été

plantes sur la réponse aux éliciteurs

quantifiés dans les 3 conditions de fertilisation en nitrate (2, 10 et 26 mM). Une fertilisation excessive cause une augmentation de la fréquence de l'infection chez le mutant *npr1.1*. Dans les conditions de carence ou de sur-fertilisation, l'intensité de la maladie augmente chez le mutant *npr1.1* (Figure 76). Ces résultats suggèrent l'intervention de cette protéine clef au niveau des mécanismes de défenses en cas de carence ou d'apport excessif en nitrate.



Figure 76 : Impact de la mutation *npr1* **sur le niveau de protection** *d'A. thaliana* **vis-à-vis de la bactérie pathogène** *D. dadantii* **en fonction de la fertilisation azotée.** A : Proportion de feuilles inoculées présentant des symptômes chez les plantes traitées à l'eau en fonction de la fertilisation azotée. Les barres d'erreur représentent l'écart type, les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons provenant de la plante sauvage par rapport à la plante mutante analysée taux de fertilisation par taux de fertilisation, avec p <0,05 calculé par le test Khi² sur les proportions. B : Pourcentage de surface de feuilles macérées mesuré à l'aide du logiciel ImageJ, provenant de plantes traitées à l'eau en fonction de la fertilisation en nitrates. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard et les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons provenant de la plante sauvage par rapport à la plante mutante analysée par niveau de fertilisation, avec p <0,05 calculé à l'aide d'un test T.

L'impact du Bion[®] et du MeJA sur la protection effective a ensuite été analysé dans le fond mutant *npr1.1* afin de savoir si la protéine *NPR1* est impliquée dans la réponse de la plante aux éliciteurs dans les différentes conditions nutritionnelles en nitrate. Pour cela, le mutant *npr1.1* a été cultivé dans les trois conditions de fertilisation azotées différentes, traité avec du Bion[®], du MeJA ou de l'eau, puis inoculé avec *D. dadantii* 48 h après le traitement. Il est intéressant de noter que les traitements avec les deux éliciteurs n'ont montré aucun effet significatif sur les symptômes ni en terme de fréquence d'infection ni en terme d'intensité de la maladie chez le mutant *npr1.1* quel que soit le niveau de fertilisation utilisé (Figure 77).

Le traitement au Bion[®] cause une augmentation de la fréquence des infections sur Col0 mais ne provoque aucun effet chez le mutant *npr1.1* sous les 3 régimes de nutrition azotée (Figure 75 & 77). Ceci suggère que le gène *NPR1* est impliqué dans le contrôle du succès des infections par *D. dadantii* en réponse au Bion[®] indépendamment de la nutrition azotée. En condition de carence azotée, le traitement au Bion[®] cause une augmentation de l'intensité de la maladie sur Col0 mais ne provoque aucun effet chez le mutant *npr1.1*. Ceci suggère que le gène *NPR1* est impliqué dans le contrôle du développement des symptômes en réponse au Bion[®] de manière dépendante de la nutrition azotée.

Le traitement au MeJA induit une protection en termes d'intensité de maladie sur Col0 uniquement en condition de nutrition azotée optimale. Ce traitement ne provoque aucun effet chez le mutant *npr1.1* (Figure 75 & 77). Ceci suggère que le gène *NPR1* est impliqué dans le contrôle du développement des symptômes en réponse au MeJA de manière dépendante de la nutrition azotée.



Figure 77 : Impact de la fertilisation en nitrates sur la protection contre la bactérie pathogène *D. dadantii***48 heures après l'application d'éliciteurs sur le mutant** *npr1.1.* Trois niveaux de nitrate sont utilisés pour cultiver les plantes et l'impact de la fertilisation et du traitement SDP est mesuré au stade végétatif 48 heures après l'inoculation. Les résultats sont obtenus à partir de 32 feuilles inoculées sur 2 expériences biologiques. A : Proportion des feuilles inoculées présentant des symptômes. Les barres d'erreur représentent l'écart type, les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons selon les niveaux de fertilisation azotée, analysés stade par stade, avec p <0,05 calculé par le test Khi² de proportion B : Pourcentage de surface de feuilles présentant une macération mesurée à l'aide du Logiciel ImageJ. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard et les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons selon le niveau de fertilisation en nitrate, analysés stade par stade, avec p <0,05 calculé à l'aide d'un test T. Les barres bleues correspondent aux plantes traitées à l'eau, les barres violettes aux plantes traitées avec du Bion et les barres vertes aux plantes traitées avec du MeJA.

4.6 Influence de l'apport en nitrate sur l'efficacité de protection des SDP au champ

Afin de voir si les différences d'efficacité des SDP dépendante de la fertilisation azotée détectée au laboratoire sur l'espèce modèle *A. thaliana* sont aussi observées au champ avec des plantes d'intérêts agronomiques, des essais préliminaires en plein champ ont été réalisés en parcelle expérimentale sur grande culture. Ces tests ont été réalisés en interne par les équipes de Staphyt dans le cadre des stages de M1 et M2 de Chloé Vanniere. J'ai traité les données brutes dans le cadre de cette thèse. Des essais ont été effectués sur vigne et sur blé.

4.6.1 Essai vigne

Une expérimentation en plein champ a été réalisée sur vignes cultivées en présence de trois niveaux d'azote (ON sous fertilisation, 30N fertilisation optimale et 60N sur-fertilisation) et traitées avec deux SDP commerciaux, le Stifenia connu pour activer la voie du JA/ET et le Messager connu pour activer la voie du SA. L'impact du traitement en fonction de la fertilisation est analysé en mesurant la sévérité et l'incidence du Mildiou (*Plasmopara viticola*), organisme biotrophe, sur les parcelles étudiées (voir matériel et méthodes). Aucune différence significative entre les traitements témoins et les traitements éliciteurs n'a été observée. Cependant, certaines tendances sont détectables et nécessitent d'effectuer des essais à plus grande échelle pour être confirmés. Ces tendances indiquent que le Stifenia et le Messager protègent la vigne contre le mildiou (Figure 78).

L'efficacité de protection est impactée par la fertilisation apportée. En effet, on constate que quel que soit le SDP utilisé et la manière de noter, il s'avère que ces SDP sont plus efficaces lorsque l'optimum de fertilisation est utilisé. Pour les plantes traitées au Stifenia l'efficacité de protection est la plus forte à l'optimum de fertilisation. Lorsque les plantes sont traitées avec du Messager, la plus forte efficacité de protection est également visible à l'optimum de fertilisation.



Figure 78 : Impact de la fertilisation azotée sur l'effet du Stifenia et du Messager® sur l'interaction vigne - *Plasmopara viticola***.** A : Photographie de vignes non traitées aux 3 niveaux de fertilisation. B : Incidence de la maladie. C : Sévérité des symptômes. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard et les différentes lettres représentent une différence significative entre les échantillons, avec *p* <0,05 calculé à l'aide d'un test t.

Les résultats préliminaires obtenus avec le Messager seraient en accord avec la littérature, à savoir une activation de la voie de défense impliquant le SA et induisant une protection contre les agents pathogènes biotrophes (Pieterse et al., 2012). Par contre, les résultats obtenus lorsque les plantes ont été traitées avec du Stifenia ne sont pas accord avec la littérature, en effet le Stifenia est sensé induire la voie de défense contre les agents pathogènes nécrotrophes et réprimer celle contre les agents pathogènes biotrophes. Si ces résultats sont confirmés dans des essais ultérieurs, ils

indiqueraient que l'effet des éliciteurs sur les agents pathogènes biotrophes et nécrotrophe varient en fonction de l'espèce végétale considérée.

Nous avons donc vu que la fertilisation azotée influe aussi sur la capacité des SDP à induire une protection chez la vigne, face au Mildiou, toujours avec un optimum de protection lorsque les plantes sont fertilisées de manière optimale.



4.6.2 Essai blé



Une expérience préliminaire a été réalisée sur culture de blé. Des micro-parcelles de blé ont été cultivées en absence de fertilisation azotée ainsi qu'avec l'apport optimum de nitrate (200kg/ha d'ammonium nitrate et 150l/ha de N39). Ces différentes parcelles ont alors été soit traitées avec du Bion[®] (0.5kg/ha), soit non traitées. L'impact du traitement en fonction de la fertilisation est analysé en mesurant la sévérité (% de surface de feuille) et l'incidence de la septoriose (*Septoria tritici*), un champignon hémibiotrophe. Les symptômes ont été analysés au stade épiaison sur la troisième feuille. Le traitement avec du Bion[®] induit une plus forte sévérité de la maladie lorsque les plantes sont fertilisées alors que cet impact n'est pas statistiquement significatif lorsque les plantes ne sont pas fertilisées (Figure 79). Ces résultats indiquent que la fertilisation azotée a un impact sur l'effet du Bion[®] sur le blé face à la septoriose. La fertilisation azotée a donc aussi un impact sur l'activité des SDP en agriculture, comme montré précédemment dans des conditions de laboratoire.

4.7 DISCUSSION

Nous nous sommes tout d'abord intéressé à l'impact de la fertilisation azotée et du stade de la plante sur l'activité des SDP chez l'espèce modèle *A. thaliana* en conditions contrôlées et chez la vigne et le blé au champ. Dans la partie réalisée en conditions contrôlées, l'impact de la fertilisation azotée et du stade de développement sur l'efficacité des SDP à a été analysée à différents niveaux biologiques, à savoir au niveau protéique avec l'analyse de la protéine PDNL38, au niveau transcriptionnel avec l'analyse des gènes de défense et au niveau physiologique en étudiant le niveau de protection vis-à-vis d'un agent pathogène nécrotrophe. Dans la partie réalisée en plein champ, l'impact de la fertilisation azotée sur l'efficacité des SDP a été analysé.

Une mise au point a été réalisée pour mettre en place un système expérimental permettant de cultiver *A. thaliana* sous 3 statuts azotés différents. Les analyses physiologiques et métaboliques ont confirmé l'impact des 3 conditions de culture 2 mM, 10 mM et 26 mM nitrate sur la physiologie de la plante correspondant respectivement à une carence, une nutrition optimale et une sur-fertilisation en azote.

Afin de savoir si les différents statuts azotés et les stades de développement conduisent à une régulation différentielle des défenses induites par les SDP, deux voies de défense ont été étudiées : la voie SA et la voie JA/ET. Afin de mimer un SDP qui active la voie SA, nous avons choisi d'utiliser un SDP commercial, le Bion[®]. Afin de mimer un SDP qui active la voie JA, nous avons choisi l'éliciteur MeJA car nous ne disposions pas de SDP capable d'activer cette voie de manière robuste.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes marqueurs de défense connus *PR1*, *PR5* (voie SA), *LOX2* et *PDF1.2* (voie JA) a été quantifiée.

Le Bion[®] induit dans toutes les conditions l'expression de *PR1* et *PR5* et ce niveau d'expression est plus élevé lorsque les plantes sont cultivées avec un optimum de fertilisation en nitrate. Le Bion[®] réprime également le niveau d'expression de *LOX2* et *PDF1.2* dans toutes les conditions de fertilisation. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les voies de défense impliquant le SA ou le JA sont antagonistes. L'action du Bion[®] sur les défenses dépend donc de la fertilisation mais ne dépend pas du stade de développement. L'utilisation du Bion[®] doit tenir compte de la fertilisation qui doit être optimale et du type d'agent pathogène ciblé.

L'expression des deux marqueurs utilisés pour la voie JA/ET, *PDF1.2* et *LOX2* n'est pas toujours similaire dans les différentes conditions étudiées (Tableau 4). Par exemple, au stade 1 en condition de sur-fertilisation, l'expression de *LOX2* est activée alors que celle de *PDF1.2* est réprimée par un

traitement MeJA. Nos résultats suggèrent que LOX2 est un meilleur marqueur de la voie JA que *PDF1.2*. En effet, l'expression de *LOX2* est activée dans presque tous les échantillons traités au MeJA.

De manière intéressante, le MeJA active l'expression des gènes de défense de la voie SA. Cette activation est détectable uniquement en conditions de nutrition azotée optimale. Cela suggère que les deux voies SA et JA peuvent être activées par certains SDP.

Contrairement au Bion[®] qui active les marqueurs de la voie SA de manière indépendante du stade de développement, l'effet du MeJA sur les marqueurs des deux voies de défense étudiées dépend du stade et de la fertilisation. Le JA étant une hormone impliquée dans le développement, sa concentration dans la plante varie en fonction du développement. Ainsi, un traitement MeJA peut interférer avec la balance hormonale et activer différentiellement les défenses selon le stade de développement (Tableau 4).



Stade	de développ	ement	Pri	e mières feuil	les		Rosette		In	duction flora	le		Floraison	
Fertilisation azoté e		2 mM	10 m M	20 m M	2 mM	10 mM	20 mM	2 mM	10 mM	20 mM	2 mM	10 mM	20 mM	
		expression de PR1												
	Expresion des	expression de PR5												
Traitement Bion®	gènes de défense	expression de PDF1.2												
		expression de <i>LOX2</i>												
	Niveau d'a Ni	ctivation de PR1												
		expression de PR1												
	Expresion des	expression de PR5												
Traitement Me-JA	gènes de défense	expression de PDF1.2												
		expression de <i>LOX2</i>												
Nive au d'activation de NPR1														

Ratio d'induction/répression du paramètre considéré : traité éliciteur/témoin eau. Chaque couleur représente une gamme de ratios.

Nous avons voulu savoir s'il existait une corrélation entre l'expression des gènes de défenses et la protection effective des SDP contre *D. dadantii a*fin de savoir si l'impact de la fertilisation azotée sur la protection des plantes par les SDP est dû à l'expression de ces gènes.

Le traitement au MeJA n'a pas diminué la fréquence d'infection mais a réduit le développement de la macération uniquement en condition optimale de fertilisation azotée. La

protection induite par le MeJA nécessite une fertilisation optimale. Le MeJA n'est pas impliqué dans les étapes précoces de l'infection mais permet de limiter la colonisation. Cet effet protecteur du MeJA en condition de fertilisation optimale coïncide avec une activation de l'expression des gènes *PR1*, *PR5* et *LOX2*.

Le traitement au Bion[®] a favorisé la fréquence d'infection, quel que soit le niveau de fertilisation appliqué (Tableau 5). Ces résultats suggèrent que l'application de Bion[®] favoriserait le processus d'introduction de la bactérie dans les feuilles d'*A. thaliana*. Par contre, seule la condition de sous-fertilisation en nitrates (2 mM) présente une intensité de symptômes significativement plus importante par rapport au témoin suite à un traitement Bion[®] (Tableau 4). Ceci peut être expliqué par le fait que le Bion[®] activerait la voie de défense impliquant le SA et que cette voie est connue pour réprimer la voie de défense impliquant l'acide Jasmonique et l'éthylène (Pieterse et al., 2012) impliquées dans la défense contre *D. dadantii* (Fagard et al., 2007). Cette hypothèse est en accord avec les profils d'expression des gènes de défense de la voie SA qui sont activés par le Bion et ceux de la voie JA qui sont réprimés par le Bion dans nos essais.

Globalement nos résultats montrent qu'il n'y a pas une corrélation stricte entre l'expression des marqueurs de défense étudiés et le niveau de protection contre *D. dadantii*. Par exemple, l'expression de *PDF1.2* et *LOX2* est activée en condition de carence en azote en réponse au MeJA mais cela ne se traduit pas par une protection vis-à-vis de la bactérie.

Ces résultats indiquent qu'il est important d'ajuster la fertilisation azotée pour protéger les cultures en cas de stratégie de protection à l'aide de SDP.

Le niveau d'immunité différentiel des plantes dans les 3 régimes de nutrition azotée ne peut être expliqué qu'en partie par les marqueurs des deux voies de défense étudiés. Il est possible qu'un effet nutritionnel/métabolique soit aussi en partie responsable des différences immunitaires constatées. Par exemple, la photopériode a un effet très important sur les défenses des plantes. Une étude menée dans notre équipe a montré un effet de la fertilisation azotée sur la sensibilité d'*A. thaliana* cultivée en jours courts vis-à-vis de *D. dadantii* (Dellagi A. données non publiées), alors que dans nos conditions de jours longs aucun effet de la fertilisation azotée n'a été observé.

Afin de déterminer l'impact des deux voies de défense SA et JA dans le statut immunitaire de plantes cultivées sous les 3 régimes azotés, un mutant de signalisation affecté dans les voies SA et JA, le mutant *npr1.1*. Ainsi il est possible de découpler l'effet signalisation hormonale de l'effet nutritionnel/métabolique.

En utilisant le mutant *npr1.1*, nous avons montré que cette protéine est importante pour la protection naturelle contre Dickeya en fonction de la fertilisation par les nitrates; en effet, le nombre d'infections augmente avec 26 mM de nitrate et la surface de macération également lorsque les plantes sont sous- ou sur-fertilisées. Nous montrons également que la différence d'augmentation ou

124

de diminution de la maladie dépendante du nitrate après le traitement avec un éliciteur est due à une activation des défenses qui implique la protéine NPR1 et que cette protéine, impliquée dans la signalisation des défenses a un rôle dans la capacité des SDP à induire une protection d'*A. thaliana*. En effet, les différences observées avec les plantes de type sauvage (Col0) ne sont plus observées chez ce mutant. De plus, en utilisant notre antipeptide, nous avons constaté que la quantité de la PDNL38 varie en fonction des conditions de fertilisation et du stade de la plante.

Ces résultats indiquent que les différences de protection constatées vis-à-vis de *D. dadantii* impliquent NPR1 et donc les voies de signalisation SA et JA. De plus, ces résultats montrent que la protéine NPR1 est impliquée dans la mise en place des défenses de manière dépendante de la nutrition azotée.

Nous nous sommes intéressés à l'impact de la fertilisation azotée sur l'activité des SDP dans des conditions réelles de production agricole. Les résultats préliminaires obtenus sur blé vont dans le même sens que ceux obtenus avec le couple Arabidopsis/Dickeya, à savoir que le traitement Bion[®] induit une infection plus élevée par la septoriose lorsque les plantes sont fertilisées de manière optimale.

Les résultats préliminaires obtenus sur vigne suggèrent également que la fertilisation azotée a un impact sur l'efficacité des SDP. En effet nous avons pu constater que, bien qu'ils n'induisent qu'une faible protection face au mildiou, les SDP utilisés (Stifenia et Messager) auraient l'efficacité la plus élevée lorsque les plantes de vigne sont fertilisées avec un optimum d'apport en nitrate. Cette efficacité chuterait lorsque ces plantes sont fertilisées de manière inadéquate (sur ou sousfertilisation).

Globalement, nous avons donc montré que le stade de la plante et la fertilisation par les nitrates ont un impact sur l'activation des défenses naturelles des plantes médiées par les éliciteurs. L'effet de la fertilisation en nitrates semble être plus important que l'effet du stade de développement des plantes. Nous faisons l'hypothèse que les plantes allouent préférentiellement leur énergie pour se développer correctement et ainsi se multiplier avant de l'allouer aux défenses contre les agents pathogènes. Par contre nous n'avons par contre pas pu corréler les résultats de l'expression des gènes de défense avec les résultats sur la protection des plantes. Les mécanismes sous-jacents impliqués dans la sous- et sur-fertilisation doivent être davantage étudiés. Si nous transférons ces résultats dans un concept agricole, nous pouvons dire que le développement d'une protection des cultures par les SDP peut être un moyen intéressant de réduire l'utilisation des pesticides conventionnels, mais que ces produits doivent être utilisés en tenant compte du niveau de nitrates présents dans le sol ou apportés. Nous avons ainsi montré avec l'ensemble de nos résultats que ces produits ont une efficacité

125

maximale quand les plantes sont fertilisées de manière optimum et qu'un manque ou un apport trop

important de nitrate a un impact négatif sur l'efficacité des SDP.

 Tableau 5 : Bilan des résultats obtenus en termes d'expression de gènes, de quantité de PDNL38, et de protection chez

 A. thaliana et de protection pour les essais au champ.

		F	ertilisat azoté	tion e	-	+	+++	-	+	+++
	Arabidopsis	Trait	ement é	liciteur	Bion®			MeJA		
		Activation des gènes de défense	expre	ssion de PR1						
			expre	ssion de PR5						
			expression de PDF1.2							
Laboratoire			expres	ssion de <i>LOX2</i>						
Laboratoric		Protection contre Dickeya	Col0	Fréquence d'infection						
				Intensité des symptômes						
			npr1.1	Fréquence d'infection						
				Intensité des symptômes						
		Niveau d'activation de NPR1								
	Vigne	Traitement éliciteur			Messager			Stifenia		
Champ		Protection contre le Mildiou		Incidence						
				Sévérité						
	Blé	Traitement éliciteur			Bio	on®				
		Protection contre la septoriose		Incidence						
				Sévérité						

Ratio d'induction/répression du paramètre considéré : traité éliciteur/témoin eau. Chaque couleur représente une gamme de ratios.

<x1.5<x2 = tendance <x2<x10 <x10 <x-1.5<x-2 =tendance <x-2<x-10

Partie 3. Matériel et méthodes

Chapitre 5. Matériel et méthodes pour mise au point de test immunologique

5.1 Matériel végétal et conditions de culture

Les graines de l'accession Col0 et Ler d'*A. thaliana* ont été obtenues auprès du Versailles Arabidopsis Stock Center (INRA Versailles France), les graines des mutants *npr1.1* (N3726) dans un fond Col0 (Cao et al., 1994) ont été obtenues auprès de NASC (<u>http://www.arabidopsis.info). Ce</u> mutant est issu d'une mutation EMS (ethyl-méthyl-sulfonate). Les graines du mutant *npr1-71* (Sundaresan et al., 1995) dans un fond Ler ont été obtenus auprès du professeur Pablo Tornero (Unerversidad politectnica de Valencia. Ce mutant contient une insertion d'un transposon dans le premier exon.

Les graines sont stérilisées sous agitation douce pendant 8 min dans une solution à 0,35% d'hypochlorite de sodium dans de l'éthanol 85,5%. Elles sont ensuite rincées 3 fois à l'eau stérile puis incubées 3 fois 15min dans l'éthanol 95% avant d'être de nouveau rincées dans l'eau stérile 3 fois et séchées pendant la nuit sous hotte à flux laminaire.

Concernant les plantes cultivées en terre, les graines ont été semées dans un terreau non fertilisé avec différentes conditions de fertilisation en nitrates (2, 10 et 26 mM de nitrates) dans une chambre de culture dans les conditions suivantes : 18h de lumière 21 ° C, 6h d'obscurité 19 ° C, 70% d'humidité relative). Les plantes ont été cultivées pour obtenir 4 stades différents : Stade 1: plantule (2 semaines après le semis (AS)), stade 2: stade végétatif (3 semaines AS), stade 3: induction florale (4 semaines AS), stade 4: période de floraison (5 semaines AS).

La solution de fertilisation à 2 mM de nitrate contient 0,0034% de KH_2PO_4 , 0,00615% de $MgSO_4$, 0.01768% de KNO_3 , 0,00295% de CaN_2O_6 , 0.001848% de $CaCl_2$, 0.001% de Sequestrene et 0.01% d'oligos. La solution de fertilisation à 10 mM de nitrate contient 0,0034% de KH_2PO_4 , 0,00615% de $MgSO_4$, 0.05058% de KNO_3 , 0,059% de CaN_2O_6 , 0.00117% de NaCl, 0.001% de Sequestrene et 0.01% d'oligos. La solution de fertilisation à 26 mM de nitrate contient 0,0034% de KH_2PO_4 , 0,00615% de $MgSO_4$, 0.05058% de KNO_3 , 0,059% de CaN_2O_6 , 0.00117% de NaCl, 0.162% de KNO_3 , 0.001% de Sequestrene et 0.01% d'oligos.

Concernant les plantes cultivées in vitro, six à huit graines sont semées dans des boites de Pétri de 9 cm de diamètre pour 2,4 cm de hauteur sur milieu MS 1/2 contenant 1,5% de sucrose et 0,8%

d'agar. Les graines sont cultivées en chambre de culture en conditions de jour long (18h de lumière, 6h d'obscurité).

Les graines de tomates de la variété Montfavet 63-5 HF1 AB Bio ont été obtenues par le site https://www.botanic.com. Les graines de *Medicago truncatula* accession R108 a été obtenue auprès de B. Alunni (I2BC, Gif sur Yvette). Les graines de *Brachypodium distachyon* accession Bd21.3 ont été obtenues auprès de l'INRA de Versailles au *Brachypodium distachyon* Resource Centre for Genomics.

Les graines de tomates, de *M. truncatula* et de *B. distachyon* ont été stérilisées en utilisant le même protocole de stérilisation que celui utilisé pour *A. thaliana*. Elles ont été semées en terreau PELTRACOM agrofino LP 307 et cultivées pendant 4 semaines en serre avec luminosité complémentée. Les conditions de culture sont les suivantes : 16h de jours et 8h d'obscurité, température maintenue autour de 21°C.

Les vignes de la variété Cabernet ont été obtenues à partir de sarments de 10 cm de longueur récoltés en vignobles. Les sarments ont été plantés dans des barquettes de 60 cm x25 cm à raison de 200 sarments par barquette dans du terreau PELTRACOM agrofino LP 525 pendant une semaine et arrosés à l'aide de 4g/L de Rhizopon® AA2% (>50% Mg₃H₂(SiO₃)4 ; 2% 4-(indol-3-butyric acid). Ceux qui ont développé des racines sont transférés en pots individuels contenant du terreau. Les plants de vigne sont cultivés en terreau PELTRACOM agrofino LP 307pendant 4 semaines en serre avec luminosité complémentée. Les conditions de culture sont les suivantes : 16h de jours et 8h d'obscurité, température maintenue autour de 21°C.

5.2 Anticorps utilisés

Un anticorps dirigé contre la protéine NPR1 d'*A. thaliana* (désigné par antiNPR1.X.D) nous a été gentiment donné par le professeur X. Dong (Duke University) (Mou et al., 2003a). Cet anticorps polyclonal a été obtenu chez le lapin après immunisation avec une protéine recombinante couvrant les 465 acides aminés N-terminaux de la protéine NPR1.

Un anticorps dirigé contre la protéine NPR1 d'*A. thaliana* (désigné par antiNPR1.com) a été obtenu chez Agrisera (Agrisera n° AS12 1854). Cet anticorps polyclonal a été obtenu chez le lapin après immunisation avec une protéine recombinante couvrant les 250 acides aminés N-terminaux de la protéine NPR1.

La différence entre ces deux anticorps réside dans la séquence de la protéine recombinante immunogène.

128

Deux anticorps polyclonaux ont été obtenus dans le cadre de cette thèse à partir de peptides et seront appelés dans la suite « antipeptides ». La méthode mise en œuvre pour leur obtention est décrite ci-dessous.

5.3 Production des antipeptides

La production des peptides dégénérés consensus et des anticorps a été effectuée par l'entreprise GENEPEP (Saint-Jean de Védas, France). Une séquence peptidique dégénérée (peptide 0) a été créée en se basant sur l'alignement des séquences de la protéine NPR1 de 22 espèces végétales de manière à couvrir le plus de séquences différentes possibles de NPR1. Ce peptide, constitué de 14 résidus, possède deux acides aminés (aa) variables en position 6 (V ou I) et 12 (S ou P) qui lui permettent de correspondre aux séquences des 22 séquences protéiques utilisées de manière suffisante pour permettre de développer des anticorps polyclonaux spécifiques de ces protéines. Une deuxième séquence peptidique a été développée de la même manière (peptide 1) Les séquences e ces peptides sont détaillées dans le tableau 6.

	dégénéré	HVHRC X LSARS Z FF			
		HVHRC V LSARS S FF			
pep0	différents	HVHRCILSARS S FF			
	variants	HVHRC V LSARS P FF			
		HVHRCILSARS P FF			
	dégénéré	HALQLLSNS X ES SS			
		HALQLLSNS V ES SS			
		HALQLLSNS V ES PS			
		HALQLLSNS V ES PP			
pep1	différents	HALQLLSNS V ES SP			
	variants	HALQLLSNSIES SS			
		HALQLLSNSIES PS			
		HALQLLSNSIESPP			
		HALQLLSNSIES SP			

Tableau 6 : séquences des deux peptides utilisés

Ces peptides de synthèse ont ensuite été utilisés afin d'induire une réaction immunitaire dirigée chez le lapin et obtenir des anticorps polyclonaux. Les 2 peptides de synthèse ont été injectés à une concentration de 1mg/ml dans 2 lapins chacun et cela, à 4 reprises au cours de la vie des lapins (j0, j14, j28 et j42). Une exsanguination (j63) a été réalisée afin d'en extraire le sérum contenant les anticorps polyclonaux.

5.4 Purification et concentration des antipeptides

Afin d'obtenir les antipeptides antipep 0 et antipep 1 spécifiques des peptides immunogènes peptide 0 et peptide 1 respectivement, les sérums de lapin obtenus ont été purifiés.

Cinquante microlitres de solution de peptides synthétiques peptide 0 ou peptide 1 à 0,5mg/mL sont déposés sur une membrane de Polyvinylidene difluoride (PVFD) de 1,5 cm x5 cm préalablement activée pendant 10min dans l'éthanol absolu puis séchée. Cette membrane est ensuite transférée dans un tube à hémolyse puis saturée à l'aide de 1mL de tampon phosphate tween 0,1% (PBST) + 5% de lait (lait en poudre Régilait® écrémé) sous agitation durant 1h à 4°C. Un millilitre de sérum y est ajouté avant incubation sous agitation pendant la nuit à 4°C. La membrane est alors lavée 4 fois avec 2mL de PBST sous agitation pendant15min à 4°C. Les antipeptides sont ensuite élués par choc acide (1mL d'une solution contenant 50 mM glycine, 500 mM NaCl, 0,1%Tween 20, 1% BSA, pH 3) durant 1min sous agitation à 4°C. L'éluât de 1mL est récupéré et neutralisé avec 100µL de Tris Base 1M. Cette élution est répétée 5 fois, et les éluas n°2 et n°3 (les plus concentrés en antipeptides) sont récupérés pour être concentrés. La concentration en anticorps des solutions utilisées a été estimée en utilisant le 2D-quantkit (GE Healthcare, 80-6483-56)

Cette opération est effectuée sur 10 membranes en parallèle et chaque membrane est utilisée 2 fois. Dix millilitres de solution d'antipeptides sont donc obtenus pour les deux éluas d'intérêt. Quatre millilitres de chaque solution sont concentrés deux fois à l'aide du système d'ultrafiltration Amicon 10kDa (10 000 g, 10 min, 4°C). Entre 500 et 600µL de solutions d'antipeptides concentrées sont ainsi produites pour chaque éluât (n°2 et n°3).

5.5 Extraction des protéines de plante

5.5.1 Extraction des protéines d'A. thaliana

Les parties aériennes des plantes sont récoltées 48 h après application de MeJA, SA, Bion ou eau puis réduites en poudre dans l'azote liquide et utilisées pour en extraire les protéines.

Les protéines totales des plantes sont extraites dans un tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 10 mM MgCl₂ ; 5 mM EDTA ; 10% glycerol ; 4% lodoacétamide, antiprotéase 1X (cOmpleteTM, Mini, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail, ROCHE) à raison de 1 μ L de tampon d'extraction par mg de poudre congelée. Les échantillons sont décongelés dans le tampon en agitant régulièrement à l'aide d'un vortex puis sont centrifugés (10 min, 14 000g, 4°C). Le surnageant est de

nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Les surnageants finaux obtenus constituent les extraits protéiques de plantes utilisés pour les différentes analyses.

Lorsque les extraits de plantes sont traités au dithiothréitol (DTT) afin de forcer la monomérisation de NPR1, 1 µl de DTT à 1 M est ajouté à 30 µl d'extrait protéique et 15 µl de Laemmli 2 fois concentré puis incubés 10 min à 65°C. Ces extraits sont utilisés tels quels afin d'effectuer des westerns blots.

5.5.2 Extraction des protéines de tomate, vigne, M. truncatula et B. distachyon

Les parties aériennes de ces plantes sont récoltées 48h après application de MeJA, SA ou eau puis réduites en poudre dans l'azote liquide et utilisées pour en extraire les protéines.

Les protéines totales de ces plantes sont extraites dans un tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl pH7,5 ; 150 mM NaCl ; 0,5 mM EDTA, 0,1% Triton 100X ; nP40 0,2% antiprotéase 1X (cOmplete[™], Mini, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail, ROCHE)) à raison de 2µL de tampon d'extraction par mg de poudre. Les échantillons sont repris dans le tampon en vortexant régulièrement puis la suspension est centrifugée (10 min, 14 000g, 4°C). Le surnageant est de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Les surnageants finaux sont récupérés et constituent les extraits protéiques de plantes utilisés pour les différentes analyses.

5.6 Production de protéines recombinantes

5.6.1 Clonage des différentes parties du gène NPR1

Trois différentes constructions ont été effectuées afin de produire la protéine totale NPR1 et deux fragments de celle-ci (Figure 30). Les séquences d'ADN correspondantes ont été clonées dans la bactérie *Escherichia coli* par la technique de clonage Gateway[®]. La première construction permet de produire la protéine NPR1 totale (prot T dans le reste du document) soit une protéine de 560 acides aminés. La seconde construction permet de produire une protéine partielle (prot P) correspondant aux 260 acides aminés en extrémité N-terminale (Nter) de NPR1. La troisième construction permet de produire une protéine partielle correspondant aux 139 acides aminés situés entre la cystéine 82 et la lysine 220 de la protéine NPR1. Ce fragment correspond à la partie de la protéine NPR1 décrite comme étant impliquée dans la dimérisation via la formation de ponts disulfure entre la Cys82 et la Cys216 (voir Partie résultats, Chapitre 2, §2-1). Ce fragment de protéine recombinante est appelé prot I pour protéine d'intérêt.

Pour obtenir ces constructions, des PCR ont été effectuées en utilisant comme matrice les ADNc d'*A. thaliana* à l'aide des amorces décrites en FigureXX. Ces amorces permettent d'amplifier les séquences d'ADN codant pour les trois protéines sus citées en y intégrant en 5' une séquence Tobacco Etch Virus (TEV) pour le clivage ultérieur des protéines par la protéase TEV. Les séquences *attB1* et *attB2* ont aussi été ajoutées aux amorces afin de les intégrer respectivement en 5' et en 3' des produits de PCR afin de les assembler dans le vecteur pDONR207 par réaction de recombinaison avec le mix BP clonase (étape BP du protocole Gateway[®]). Les clones obtenus ont été validés par séquençage (GATC biotech) puis utilisés pour purifier les plasmides donneurs (pDONR207 + insert correspondant aux 3 constructions). Les plasmides donneurs ont ensuite été utilisés pour la réaction de recombinaison avec le mix LR clonase (étape LR du protocole Gateway[®]) avec les plasmides d'expression (PetG10-A). Ces plasmides permettent de rajouter une séquence codant pour une étiquette histidine (His-Tag) en 5' des différentes constructions et de traduire ces séquences en protéine, de manière inductible (par ajout d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)). Les plasmides d'expression obtenus ont ensuite été clonés et introduits dans la souche *DH5* α d'*E. coli* afin de les amplifier et de les purifier. Enfin, ils ont été clonés dans la souche *Rosetta E. coli* afin de produire les protéines avec leur étiquette histidine.

5.6.2 Extraction des protéines recombinantes à partir de E. coli

Les différentes souches bactériennes possédant les 3 constructions ont été cultivées à 37°C dans 2 L de milieu LB + Ampicilline 100 µg/mL + Chloramphénicol 34 µg/mL, jusqu'à avoir une densité optique de 0,6 à 600 nm. Plusieurs concentrations d'IPTG et de temps d'incubation ont été testés afin d'optimiser la production de protéines. La production de protéines est alors déclenchée par ajout d'IPTG (0,5 mM pour prot T et prot P et 1mM pour prot I). Les bactéries sont prélevées 3h plus tard pour T et P et 4h plus tard pour I. Les cultures sont séparées en 6 fois 40 mL chacune et centrifugées (12000g 15min à 4°C). Les culots sont congelés dans l'azote liquide pour les étapes suivantes.

Les culots sont remis en suspension dans un tampon de lyse dénaturant car les protéines recombinantes sont dans des corps d'inclusion (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris pH8, 250 mM NaCl, urée 8M, 1mM DTT, 250mM imidazole, antiprotéase 1X (cOmplete[™], Mini, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail, ROCHE)) puis lysés par sonication (12 pulses de 20sec à 50% d'amplitude entrecoupés de pause de 30 sec, sur glace 2°). Les extraits sont ensuite centrifugés (20 000g, 15min 4°C) pour agréger les débris cellulaires au fond des tubes. Les surnageants sont récupérés et utilisés pour les différentes expérimentations nécessitant l'utilisation de ces protéines recombinantes.

5.7 Immunoprécipitation (IP)

L'immunoprécipitation a été réalisée en deux étapes. La première consiste à lier de manière covalente les anticorps à des billes magnétiques. La deuxième étape consiste à capturer puis purifier les protéines reconnues par l'anticorps.

Des billes magnétiques couplées à des protéines A (Dynabeads[™] Protein A, ThermoFisher n°10001D) sont utilisées afin d'effectuer une immunoprécipitation (IP) des protéines d'*A. thaliana* ou de protéines recombinantes à l'aide de l'antipeptide antipep 0 ou de l'antiNPR1.com.

Des billes sont préparées pour chaque IP. Pour cela 100 µL de solution de billes sont déposés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL puis placées sur portoir magnétique durant 2 min. Le surnageant est jeté et les billes sont lavées 2 fois avec 500 mL de PBST. Les tubes sont de nouveau placés sur le portoir magnétique pendant 2 min. Le surnageant est enlevé puis 90 µL de PBST sont déposés sur les billes. Six microlitres de l'antiNPR1.com (6 µg) et 0,5 µL de l'antipep0 purifié (25 µg) sont ajoutés par tube (qsp 100 μ L PBST) puis le tout est incubé pendant 1h30 à température ambiante sous agitation sur une roue tournante. Le surnageant est enlevé et les billes couplées aux anticorps sont lavées 3 fois avec 500 μL de PBST sous agitation (5 min) sur roue. L'ensemble est ensuite repris dans 100 μL de PBST. Les anticorps sont ensuite liés de manière covalente aux protéines A des billes sous l'action du dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP). Les billes sont d'abord lavées 2 fois 10 min sous agitation avec 1 mL de tampon de cross-link (200 mM triethanolamine pH 8,2). Les tubes sont de nouveau placés sur le support magnétique (2 min) puis le surnagent est éliminé. Un millilitre de tampon de cross-link + DMP (200mM triethanolamine pH 8,2 + 26 mM DMP) est ajouté, puis les tubes sont incubés 30 min sous agitation sur roue tournante à température ambiante. La réaction de liaison covalente est interrompue en enlevant le surnageant (sur portoir magnétique), et en ajoutant 1 mL de 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (incubation 15 min à température ambiante sous agitation sur roue tournante) puis en lavant 3 fois 5 min avec 500 μL de PBST. Les billes liées de manière covalente aux anticorps sont alors reprises dans 100 µL de PBST et conservées à 4°C pour les IP.

Les tubes contenant les billes couplées aux anticorps sont placés sur portoir magnétique pour retirer le surnageant. Puis 1 µg d'extraits protéiques (dans un volume variant entre 150 et 800 µL) est déposé sur les billes magnétiques. Les tubes sont incubés pendant la nuit à 4°C sur roue afin d'hybrider la, ou les, protéines reconnues par les anticorps. Les billes couplées aux anticorps, eux même hybridés aux protéines, sont lavées 5 fois 5 min avec 500 µL de PBST. Les protéines reconnues par les anticorps sont alors éluées à l'aide de 50 µL solution de Laemmli + 100 mM dithiothréitol (DTT) pendant 15 min à température ambiante

133

5.8 Western blot (WB)

Des gels de SDS-PAGE à 10% d'acrylamide sont utilisés pour la séparation des protéines. Trente microlitres d'extraits de plantes ou 25 µL d'éluât d'immunoprécipitation sont incubés dans 15µL de Laemmli 2 fois concentré 10 min à 65°C sous agitation puis déposés par puits. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon RB1X à voltage constant (100 mV). Les protéines ayant été soumises à l'électrophorèse, sont alors transférées sur membranes de Polyvinylidene Difluoride (PVDF) préalablement activées 10min dans l'éthanol absolu, à l'aide du trans-blot® turbo[™] transfer system de Bio-rad. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois dans du tampon Phosphate salin + 1% Tween (PBST) puis saturées en protéines de lait dans du PBST + lait 5% (1h sous agitation 40 rpm, à température ambiante). Elles sont alors incubées pendant la durée de la nuit dans du PBST+ 5% lait à 4°C en présence de l'anticorps primaire (1/5 000^{ème}). Les membranes sont alors lavées dans du PBST (4 x 10 min + 1x 1h, sous agitation à 40 rpm, à température ambiante) puis incubées avec l'anticorps secondaire (anti-rabbit HRP de Sigma, 1/10 000^{ème}, 1h 40 rpm à température ambiante). L'opération de lavage des membranes est renouvelée avant que celles-ci ne soient séchées 2min sur papier absorbant. Les protéines hybridées par l'anticorps primaire sont alors détectées par chimioluminescence à l'aide du LAS 4000 (Fujifilm) et du substrat (luminol + peroxyde) Amersham ECL[™] Prime (GE Healthcare).

Les membranes sont ensuite colorées à l'aide de bleu de Coomassie durant 1h à température ambiante sous agitation à 35 rpm. Les profils protéiques sont alors révélés en décolorant les membranes à l'aide d'une solution de décoloration (10% acide acétique, 10% éthanol) pendant la nuit à température ambiante sous agitation à 35 rpm.

Chapitre 6. Matériel et méthodes pour le test GUSTAVE

6.1 Matériel végétal et conditions de culture

Des graines d'A. thaliana Col0 exprimant différentes constructions de fusions transcriptionelles ont été obtenues auprès de NASC (<u>http://www.arabidopsis.info</u>) et sont utilisées : *pPR1 ::GUS* (NASC ID N6357) ; *pPDF1.2 ::GUS* (NASC ID N6506) et *pLOX2 ::GUS* (NASC ID N57953).

Les graines sont stérilisées sous agitation douce pendant 8 min dans une solution à 0,35% d'hypochlorite de sodium dans de l'éthanol 85,5%. Elles sont ensuite rincées 3 fois à l'eau stérile puis incubées 3 fois 15min dans l'éthanol 95% avant d'être de nouveau rincées dans l'eau stérile 3 fois et séchées pendant la nuit sous hotte à flux laminaire. Six à huit graines sont semées dans des boites de Pétri de 9 cm de diamètre pour 2,4 cm de hauteur sur milieu MS 1/2 contenant 1,5% de sucrose et 0,8% d'agar. Les graines sont cultivées en chambre de culture en conditions de jour long (18h de lumière, 6h d'obscurité).

6.2 Traitement des plantes

Les pulvérisateurs utilisés pour les traitements sont stérilisés en utilisant le protocole suivant. Ils sont remplis de javel à 0.35% d'hypochlorite de sodium, puis quelques pulvérisations sont effectuées afin de remplir la buse de javel, ils sont alors laissés 15 min à incuber avec la solution de Javel. Les pulvérisateurs sont ensuite rincés 3 fois avec de l'eau stérile avant d'être de nouveau incubés avec de l'éthanol 70% buse comprise durant 15 min. Ils sont finalement rincés 3 fois à l'eau stérile avant d'être rebouchés et conservés pour les traitements.

Les plantes d'*A. thaliana* sont pulvérisées jusqu'au point de ruissellement avec chacun des éliciteurs ou des trois traitements témoin. Douze éliciteurs ont été utilisés sur *A . thaliana*.

Les éliciteurs commerciaux Bion[®], Stifenia, Messager[®] et Vacciplant sont utilisés dilués dans l'eau à hauteur de 0,015% ; 1% ; 0,6% et 0,333% respectivement. La dose recommandée pour ces produits au champ ont été convertie en concentration volumique (poids/volume pour Bion[®] et Stifenia et volume/volume pour Messager[®] et Vacciplant) en considérant une pulvérisation de 330 L / ha au champ.

L'éliciteur commercial Vacciplant de Goëmar est un concentré soluble composé de 37g de laminarine par litre. C'est un stimulateur de défense des plantes, homologué sur blé contre la septoriose, l'oïdium et le piétin verse et sur orge contre l'helminthosporiose.

Le SA (Sigma) a été utilisé à une concentration de 1mM dans de l'eau.

Le méthyl-jasmonate (MeJA, Sigma) a été utilisé à une concentration de 0,1 mM dans 0,5% de DMSO).

L'acide abscissique (ABA, Sigma) a été utilisé à une concentration de 50 μ M dans de l'eau.

L'acide indole acétique (IAA, un précurseur de l'auxine, gentiment donné par Léo Serra, INRA Versailles) a été utilisé à une concentration de 10 µM dans de l'eau.

Le 6-Benzyl aminopurine, une cytokinine (BAP, Sigma) a été utilisé à une concentration de 50 μ M dans de l'eau.

Le 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, un précurseur de l'éthylène (ACC, Sigma) a été utilisé à une concentration de 2 μ M dans de l'eau.

Le peptide flg22 (gentiment donné par L. Navarro ENS, Paris), un épitope de la flagelline a été utilisé à une concentration de 0,1 mM dans 0.5% de DMSO.

Le Chitosan (Sigma) a été utilisé à une concentration de 1% dans une solution à 0,5% de DMSO et 0,05% d'acide acétique.

De l'eau, du DMSO à 0,5% et une solution contenant 0,5% de DMSO et 0,05% d'acide acétique ont été utilisés comme témoins négatifs des traitements correspondants.

6.3 Test d'activité GUS

Les plantes sont pulvérisées selon le traitement envisagé jusqu'au point de ruissellement puis remises en culture durant un temps donné (selon expérience) avant le prélèvement. Six rosettes sont alors prélevées puis trempées dans 10 mL de tampon GUS (28,8 mM Na₂HPO₄; 21mM NaH₂PO₄; 2% de 0,5 M d'EDTA pH 8 ; 1% DMF, 0.01% X-Gluc) dans un puits d'une plaque 6 puits. La plaque 6 puits est ensuite incubée 3 fois 10 min sous vide (-0.095 MPa) dans une cloche à vide pour faire pénétrer le tampon dans les tissus. Les plantules sont incubées pendant la nuit à 37°C pour révéler l'activité GUS. Les rosettes sont alors rincées à l'eau puis décolorées dans l'éthanol jusqu'à ce qu'il ne reste plus de chlorophylle. Les rosettes sont alors étalées dans un fond d'eau dans une boite de Pétri posée sur un fond noir puis prises en photo. Les photos sont organisées en figures grâce au plugin figureJ du logiciel ImageJ. Chapitre 7. Matériel et méthodes pour l'étude de l'impact de développement et de la fertilisation sur l'activation des défenses.

7.1 Matériel végétal et conditions de culture

7.1.1 Expérimentations sur A. thaliana en conditions contrôlées

Les graines de l'accession Col0 d'*Arabidopsis thaliana* ont été obtenues auprès du Versailles Arabidopsis Stock Center (INRA Versailles France) et les graines du mutant *npr1.1* (N3726) ont été obtenues auprès de NASC (<u>http://www.arabidopsis.info</u>).

Les graines d'*A. thaliana* ont été semées dans un terreau non fertilisé avec différentes conditions de fertilisation en nitrates (2, 10 et 26 mM de nitrates) dans une chambre de culture dans les conditions suivantes : 18h de lumière 21 ° C, 6h d'obscurité 19 ° C, 70% d'humidité relative). Les plantes ont été cultivées pour obtenir 4 stades différents : Stade 1: plantule (2 semaines après le semis (AS)), stade 2 : stade végétatif (3 semaines AS), stade 3: induction florale (4 semaines AS), stade 4: période de floraison (5 semaines AS).

7.1.2 Expérimentations en plein champ sur blé et vigne.

Les graines de blé (*Triticum æstivum*) d'hiver ont été cultivées en suivant un calendrier de culture classique en micro-parcelles. Plusieurs niveaux de fertilisation ont été utilisés. Un lot de plante a été cultivé en absence de fertilisation azotée, l'autre lot a été cultivé avec l'apport optimum de nitrate (200 kg/ha d'ammonium nitrate et 150 l/ha de N39) apporté en début de culture. Le dispositif expérimental appliqué à ces essais est un dispositif à 2 facteurs (Fertilisation et SDP) avec 4 blocs randomisés considérés comme des répétitions biologiques.

Une parcelle de Muscat planté en 2008 est utilisée pour l'essai vigne. Cette parcelle est plantée à une densité de 5 050 pieds à l'hectare sur la commune de Rieux-Minervois (11160).

Le sol est identifié comme étant argilo-calcaire. Sa composition en azote total est de 0,102 %, avec un coefficient de minéralisation (k2) à 1,20 %, ce qui donne une estimation de l'azote minéralisable à 48 kg/ha. Il contient également 1,8% de matière organique et un rapport C/N de 10. L'indice C/N permet de déterminer le degré d'évolution de la matière organique.

Le dispositif expérimental appliqué à ces essais est un dispositif à 2 facteurs (Fertilisation et SDP) avec 4 blocs randomisés considérés comme des répétitions biologiques. Les dimensions d'une parcelle élémentaire sont de 12,15 m² (5,4 m x 2,25 m), six ceps sont compris par parcelle. Trois niveaux de fertilisation azotée sont utilisés à 0, 30 et 60 Unité d'azote par hectare. L'engrais utilisé est

de l'ammonitrate 33,5 BOREALIS-LAT [©] : N-P-K 33.5-0-0. Il s'agit d'un engrais granulé composé de 33,5% d'azote total, dont 16,7% d'azote nitrique (NO₃⁻) et 16,8% d'azote ammoniacal (NH₄⁺).

7.2 Dosage de l'azote et des acides aminés sur A. thaliana

Afin de quantifier la teneur en azote et en acides aminés des plantes étudiées, des feuilles d'A. thaliana ont été récoltées 48 heures après le traitement par les éliciteurs, et immédiatement broyées dans de l'azote liquide, puis stockées à -80 ° C. La teneur en azote est évaluée via la quantification du nitrate et nitrite dans les tissus de la plante à l'aide d'une méthode spectrophotométrique par comparaison avec une échelle de NaNO₃ (Miranda et al., 2001). Dix milligrammes de poudre de feuilles congelées sont incubés dans 300 µL d'eau distillée stérile pendant 20 min sur de la glace. Les échantillons sont centrifugés à 15 000 tr / min à 4 ° C pendant 20 min et le surnageant est récolté deux fois. Dix microlitres de surnageant sont mélangés avec 90 µL d'eau et 100 µL de réactif de Miranda (0,5 M HCl; 0,25% chlorure de vanadium; N-1-naphtyéthylendiamine à 0,005%, sulfanilamide 0,1%) et incubés pendant 2 heures à 60 ° C. La concentration en nitrite est ensuite calculée sur la base d'une courbe standard obtenue avec des solutions étalons de NaNO₃ par lecture spectrophotométrique à la longueur d'onde de 540 nm. La teneur en acides aminés est également quantifiée par une méthode spectrophotométrique adaptée de (Rosen). Les acides aminés sont extraits en faisant incuber 150 mg de poudre de feuilles congelée avec 1 mL de 2% d'acide 5-sulfosalicylique (p / v dans l'eau). Les échantillons sont alors centrifugés à 12000 g pendant 10 min et le surnageant est récolté pour les étapes suivantes. Cinquante microlitres d'échantillons sont mélangés avec 150 μL d'eau, 100 μL de solution d'acétate de cyanure (0,2 mL de 10 mM KCN ; 9,8 mL de 2,65 M acétate de sodium ; 8% acide acétique pH 5,35) et 100µL de solution de ninhydrine dans l'éther monométhylique d'éthylène glycol) puis incubés pendant 15 min à 100 ° C sous hotte, avant d'ajouter 1 mL d'isopropanol à 50%. Les échantillons sont placés sur glace pour réduire la température à la température ambiante. Deux cent microlitres d'échantillons sont utilisés pour quantifier la teneur en acides aminés par comparaison avec les solutions standard de L-glutamine par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 570nm.

7.3 Traitements d'A. thaliana avec des éliciteurs en conditions contrôlées

Les plantes d'A. thaliana cultivées aux 4 stades sont pulvérisées jusqu'au point de ruissellement avec chacun des éliciteurs ou du traitement témoin. Trois éliciteurs ont été utilisés sur A. thaliana.

Le SDP commercial Bion[®] est composé de 50% d'acibenzolar-S-Méthyl et de 50% silice. Afin de déterminer la dose utilisée au laboratoire sur A. thaliana, nous nous sommes basés sur la dose de Bion[®] recommandée pour la tomate au champ (0,05 kg / ha). Celle-ci a été convertie en concentration volumique (g / L) en considérant une pulvérisation de 330 L / ha. Cela amène à une concentration de 0,015% de Bion[®] dans de l'eau (poids/volume) pour les traitements d'*A. thaliana*.

Le SA (Sigma) a été utilisé à une concentration de 1mM dans de l'eau.

Le méthyl-jasmonate (Sigma) a été utilisé à une concentration de 0,1 mM MeJA dans 0,5% de DMSO). Une expérience préalable a montré que la solution 0,5% DMSO n'affectait pas l'expression des gènes de défense (données non montrées).

Compte tenu des contraintes d'espace disponible pour les expérimentations, le témoin négatif utilisé pour les traitements MeJA, SA et Bion est le traitement avec de l'eau.

7.4 Traitements de blé et vigne par des éliciteurs en plein champ.

Les plantes de blé des différentes parcelles sont pulvérisées à l'aide d'un pulvérisateur à dos jusqu'au point de ruissellement avec le Bion[®] (0,5kg/ha), ou avec de l'eau comme traitement témoin.

Les pieds de vigne des différente parcelles ont été pulvérisés à l'aide d'un pulvérisateur à dos jusqu'au point de ruissellement avec chacun des éliciteurs ou avec de l'eau comme traitement témoin aux stades BBCH 15 (3 feuilles) et BBCH55 (inflorescence). Deux éliciteurs ont été utilisés sur vigne : Messager et Stifenia.

Le SDP commercial Messager (ou COS-OGA) de JOUFFRAY-DRILLAUD© est un concentré soluble composé de : 12,5 g/L de COS = Chitosan (issu de l'exosquelette des crustacés) et de OGA = pectine (issu de la peau des agrumes et des pommes).

Le SDP commercial Stifénia de SOFT[©] est une poudre soluble composée de 100% d'extrait de graines fenugrec dont les principes actifs sont des saponines stéroïdiques et des peptides à faible poids moléculaire. C'est un stimulateur de défense des plantes, homologué sur la vigne contre l'oïdium. Le Stifenia et de l'eau comme témoin négatif.

7.5 Tests de sensibilité aux agents pathogènes

Différents éliciteurs sont utilisés selon le pathosystème considéré (Tableau 7)

Tableau 7 : Protection théorique induite par les SDP utilisés contre les pathogènes observés en fonction des voies de défense activées

Voie de défense impliquée	SA	JA/Et			
	Bion®				
Elisitour	Messager®				
Eliciteur		Stifenia			
		MeJA			
Protection théorique	Contre les agents pathogènes biotrophes	Contre les agents pathogènes nécrotrophes			
	Mildiou <i>Plasmopara</i> <i>viticola</i> (biotrophe)				
Agent Pathogène	Septoriose S (hémibio	<i>eptoria tritici</i> otrophe)			
		Dickeya dadantii (nécrotrophe)			

7.5.1 Tests de sensibilité d'A. thaliana

L'efficacité de la protection conférée par les éliciteurs a été évaluée à l'aide du pathosystème modèle de laboratoire impliquant la bactérie *Dickeya dadantii* sur la plante modèle, *A. thaliana* au Stade 3 (voir Chapitre 5). La souche *Dickeya dadantii* 3937 est issue du stock de l'INRA Versailles. Les bactéries ont été cultivées en milieu Luria-Bertani. Pour l'inoculation des plantes d'*A. thaliana*, une suspension bactérienne à une DO₆₀₀ de 0,1 (5x10⁸ UFC/mL) préparée dans un tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7) est utilisée. Les plantes sont recouvertes avec un couvercle plastique pour obtenir une humidité saturante et faciliter l'infection 24 heures avant l'inoculation et pendant toute la durée de lecture des symptômes. Pour inoculer les plantes, une piqûre artificielle des feuilles a été réalisée à l'aide d'une aiguille stérile, puis 5 µL d'une suspension bactérienne ont été déposés au niveau de la piqûre. Les symptômes ont été quantifiés par deux méthodes différentes. La première méthode consiste à mesurer la proportion de surface de macération grâce à ImageJ (sévérité de la maladie). La deuxième méthode consiste à calculer le pourcentage de succès d'infection (fréquence de la maladie). Ces mesures ont été effectuées sur 4 expériences indépendantes pour les plantes sauvages, et 2 concernant les mutants *npr1.1*. Dans chaque expérience, 16 plantes ont été inoculées pour chaque condition et deux feuilles par plante ont été inoculées selon la procédure décrite ci-dessus.

7.5.2 Tests de sensibilité du blé et de la vigne.

L'efficacité de protection conférée par les éliciteurs a été évaluée sur le pathosystème impliquant la septoriose (*Zimoseptoria triticci*) et le blé d'hiver. La présence de symptômes de septoriose naturellement présente sur la parcelle est estimée visuellement en pourcentage de sévérité d'attaque de la maladie (PESSEV pour PESt SEVerity) et en pourcentage du nombre de feuilles touchées

(PESINC pour PESt INCidence) au stade BBCH 58 (80% de l'inflorescence présente) d'après (Zadoks et al., 1974).

L'efficacité de protection conférée par les éliciteurs a été évaluée sur le pathosystème impliquant le mildiou (*Plasmopara viticola*) et la variété de vigne Muscat. La présence de symptômes de mildiou est déterminée visuellement et estimée en pourcentage de sévérité d'attaque de la maladie (PESSEV pour PESt SEVerity) et en pourcentage du nombre de feuilles touchées (PESINC pour PESt INCidence) au stade BBCH 61 (floraison).

7.6 Analyse de l'expression des gènes par q-RT-PCR

L'eau utilisée dans toutes les étapes décrites dans ce paragraphe est traitée au DEPC afin d'inhiber les RNAses. Les ARNs sont extraits des poudres congelées par la méthode d'extraction au Trizol selon le protocole préconisé par le fournisseur (Lifetechnologies). Un microgramme d'ARN est traité à la DNAse pendant 45 minutes à 37°C (1µg d'ARN, 1µL de tampon 10X, 1µLde DNase (RNasefree DNase set de Qiagen) dans un volume total de 10 µL. L'arrêt de la réaction se fait par l'ajout de 1 µL de 50 mM d'EDTA suivi d'une incubation 10 min à 65°C afin d'inactiver la DNase. Ces ARNs traités à la DNase sont alors utilisés pour l'étape de rétro-transcription. Cinq microlitres d'ARN sont incubés à 65°C pendant 5 min avec 1 µL (10 µM) d'amorces et 6,5 µL d'eau. Puis 4 µL de tampon de RT 5X, 0,5 µL de Ribolock, 2 µL de dNTPs à 10 mM et 1 µL de transcriptase inverse M-MuLV (20 000 unit/mL, Biolab) sont ajoutés par tube avant incubation 1 h à 37°C. La transcriptase inverse est ensuite inactivée durant 10min à 70°C. Les ADNc ainsi obtenus sont alors dilués d'un facteur 10 (ajout de 180µL d'eau) pour être utilisés lors de l'étape de PCR quantitative.

La réaction de qPCR se fait dans 10 μ L, à raison de 5 μ L de mix SybrGreen (Eurogenetec) ; 0,3 μ L de mélange d'amorces à 0,3 μ M ; 2,4 μ L d'eau et 2,5 μ L d'ADNc.

Les qPCRs sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur CFX-96 Real Time PCR system de chez Bio-Rad. Les données brutes obtenues sont traitées à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX manager. La quantité de transcrits normalisée est ensuite obtenue en effectuant le rapport entre les données obtenues pour les gènes de défense d'intérêt et pour le gène constitutif utilisé (ici le gène codant pour la clathrine) en tenant compte de l'efficacité des amorces obtenues à l'aide de la gamme de dilution et de leur quantité exprimée en unité arbitraire. Le choix du gène constitutif a été effectué suite à des expériences de mise au point destinées à identifier un gène dont l'expression est stable dans les différentes conditions de stades de développement et de fertilisation. Plusieurs gènes ont été testés. Suite à ces expériences de mise au point, un seul gène a répondu au critère de stabilité d'expression,

141

le gène AT5G46630 codant pour un adaptateur du complexe clathrine. Le tableau 8 suivant reprend les séquences des différentes amorces utilisées en qPCR.

Amorce	Séquence 5'-3'
PR1-F	TCTTCACTCCTACTCGTTC
PR1-R	TCTTCCCTCGAAAGCTCAAGA
PDF1.2-F	CACCGGCAATGGTGGAA
PDF1.2-R	CCCTGACCATGTCCCACTTG
PR5-F	GCCGTGGAGCTAACGATAAG
PR5-R	GCGTAGCTATAGGCGTCAGG
Clath-F	GTTTGGGAGAAGAGCGGTTA
Clath-R	CTGATGTCACTGAACCTGAACTG
LOX2-F	AGGCATCTCAAACTCGCACT
LOX2-R	TTCTGGAGGGCATAACTTGG

Tableau 8 : Séquences des différentes amorces utilisées en qPCR.

Partie 4. Conclusion générales et perspectives

Dans la première partie de cette thèse, nous avons développé des anticorps destinés à détecter l'activation des défenses des plantes. Nos résultats ont fourni de nombreux arguments qui suggèrent que la cible des antipeptides développés au cours de cette thèse est une forme clivée de NPR1, présente chez différentes plantes. Cette forme n'a pour le moment pas été décrite dans la littérature. Cette protéine de 38kDa que nous avons appelée PDNL38 serait impliquée à la fois dans les défenses impliquant le SA et celles impliquant le JA. Afin de valider définitivement notre hypothèse sur le clivage de la protéine NPR1, et de mieux comprendre le phénomène, différentes expérimentations pourraient être réalisées. Afin de déterminer si un clivage de NPR1 peut avoir lieu *in planta*, il serait possible d'infiltrer des antiprotéases directement dans les plantes avant de les pulvériser avec différents éliciteurs. Si aucune bande de 38kDa n'est détectée avec l'anticorps antipep0, alors cela indiquerait que le clivage de la protéine a bien lieu *in-planta* et est induit par le traitement avec un éliciteur de défense. De plus, il serait possible d'infiltrer la protéine recombinante totale dans les plantes avant de les pulvériser avec différents éliciteurs. Si une bande de 38kDa est détectée avec les anticorps antipep0 et anti-étiquette-histidine, alors cela indiquerait qu'une activité protéase induite par les éliciteurs clive NPR1 *in-planta*.

Afin de savoir si ce mécanisme de clivage de la protéine NPR1 est conservé chez différentes espèces végétales et si nos antipeptides sont capables de détecter cette forme clivée de PDNL38 dans différentes espèces végétales, des extraits protéiques d'autres plantes pourront être utilisés. Ainsi, comme nous l'avons montré chez la vigne, différents protocoles d'extraction incluant la digestion des parois cellulaires, devront être adaptés selon l'espèce considérée.

Nous avons montré que PDNL38 est un bon marqueur de l'immunité et avons donc décidé de soumettre à la propriété intellectuelle la technique permettant d'obtenir les antipeptides antipep0 et antipep1. Nous avons déposé une enveloppe Soleau auprès de l'INPI (Annexe 7) et avons entamé les procédures afin de breveter cette invention. Le dépôt du brevet est en cours à l'heure à laquelle se finit cette thèse. Le dépôt de brevet et la négociation des parts ont été confiés par Staphyt à un cabinet d'avocats spécialisés dans la propriété intellectuelle. L'étude de brevetabilité a d'ores et déjà été effectuée et indique que l'invention est brevetable. J'ai déjà proposé un manuscrit de ce brevet (Annexe 8) à ce cabinet qui a commencé à le re-rédiger de manière à pouvoir le déposer prochainement auprès de l'INPI. Ainsi, l'utilisation de nos antipeptides dans le cadre d'ELICITEST sera protégée et les prochaines étapes sont la miniaturisation du test WB en test ELISA ou en test « bandelette ». Afin de savoir s'il est intéressant financièrement d'effectuer cette miniaturisation, une
étude de marché a été initiée dans le cadre du stage de fin d'études de Claire Boisleux au sein de Staphyt.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons développé le test GUSTAVE qui permet de montrer de manière simple si un produit est capable d'activer les défenses des plantes et de déterminer la voie hormonale de défenses (SA ou JA) qui est impliquée. La lignée possédant la construction pPR1::GUS permet de détecter l'activation de la voie de défense impliquant le SA. La lignée possédant la construction pLOX2::GUS permet de détecter l'activation des voies impliquant le JA. Le gène LOX2 est impliqué dans la voie de biosynthèse du JA et est donc un marqueur de la production de cette hormone. Ainsi la lignée possédant cette construction permet de montrer l'activation des voies impliquant le JA, soit en synergie avec l'ET, soit en synergie avec l'ABA. Afin de savoir si un produit qui induit une réponse de cette lignée active la voie impliquant le JA et l'ET ou celle impliquant le JA et l'ABA, il est possible de tester une lignée impliquant le promoteur d'un gène marqueur de la voie impliquant le JA et l'ABA. Ainsi il serait intéressant d'utiliser une lignée pVSP2::GUS par exemple. Ainsi un produit capable d'induire l'expression du gène GUS dans les lignée pLOX2::GUS et pVSP2::GUS activerait la voie de défense impliquant le JA et l'ABA. Un produit capable d'induire l'expression du gène GUS dans la lignée pLOX2::GUS mais pas dans la lignée pVSP2::GUS activerait la voie de défense impliquant le JA et l'ET. De plus, il pourrait être intéressant de croiser toutes ces lignées entre elles afin d'obtenir une lignée contenant les différentes fusions qui permettrait de détecter l'activation d'au moins une des voies de défenses.

Ce test nous permet aussi de montrer l'effet potentialisateur d'un produit. Il permet également de déterminer si l'activation des défenses par un produit requiert plusieurs pulvérisations consécutives. Ceci est en accord avec l'utilisation effective des SDP sur le terrain qui nécessitent plusieurs pulvérisations au cours d'un itinéraire cultural afin de montrer une efficacité. Nous avons pu ainsi adapter le test plein champ d'un produit développé par un des clients de Staphyt grâce aux résultats obtenus avec le test GUSTAVE. (Paragraphe 3.9)

Le test de laboratoire GUSTAVE développé durant cette thèse, est donc un test instructif sur la voie de défense activée, simple et peu couteux, permettant de détecter l'effet d'activation direct ou de potentialisation d'un produit client. D'autres utilisations de ce test pourront aussi être envisagées, afin, par exemple, d'effectuer un criblage à moyen/haut débit de produits potentiellement SDP à partir d'un panel de molécules.

Différentes méthodes de détection de l'activation des défenses des plantes par les SDP sont déjà disponibles sur le marché :

Un émetteur / récepteur optique, développé par la société Force A et appelé Multiplex[®] permet le "dosage" de molécules, type anthocyanes, flavonols, etc. Cet outil portatif permet l'acquisition rapide de données, facilement utilisables. De plus, les mesures non destructives permettent la réalisation de plusieurs mesures sur le même organe, apportant ainsi des informations sur l'évolution temporelle des réponses. Cependant, les marqueurs dosés sont peu spécifiques. Il s'agit de composés du métabolisme secondaire propres à chaque variété de plante qui ont des rôles très divers au niveau de la physiologie et du développement de ces plantes.

Il existe également un outil de diagnostic moléculaire développé par l'INRA d'Angers, appelé "qPFD" (Puce à Faible Densité Quantitative : RT-PCR quantitative en microplaque / puce à ADN de faible densité) qui permet d'évaluer des gènes cibles dont l'expression, seule ou en combinaison, renseigne sur l'état de stimulation des défenses naturelles des plantes (brevet INRA WO 2011/161388). Cette méthode est proposée dans un cadre commercial par la société Vegenov. A ce jour, une puce est disponible pour le pommier, la tomate, la pomme de terre, la vigne et le blé et le coût d'analyse est assez onéreux pour une éventuelle utilisation de recherche de stimulation des défenses des plantes en conditions naturelles.

Des tests de protection sont proposés par de multiples entreprises. Ces tests permettent d'observer en conditions contrôlées ou au terrain l'efficacité d'un SDP en terme de protection vis-à-vis des agents pathogènes. Ces tests permettent donc de montrer l'efficacité d'un SDP mais ne montrent aucunement le type de défenses activées par ce produit.

Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons constaté que le stade de développement de la plante a globalement moins d'impact que la fertilisation azotée sur la mise en place des défenses induites par un éliciteur. Ceci est constaté pour la voie SA et la voie JA. Par contre, l'effet du stade de développement est plus fort sur l'activation de la voie dépendant du JA que sur celle dépendant du SA. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le JA est aussi impliqué dans le développement (Wasternack and Hause, 2013). Il y aurait donc des interférences avec d'autres voies hormonales du développement et la mise en place des défenses. Il a été montré que les différentes voies hormonales impliquées dans le développement et les défenses interagissent de manière à allouer préférentiellement l'énergie dans le développement ou les défenses. Les interactions entre SA/auxines, SA/brassinostéroïdes ou gibbérellines, JA/auxines ou brassinostéroïdes et JA/gibbérellines, ont été bien décrites (Huot et al., 2014).

Dans les cas où les plantes ne sont pas assez ou trop fertilisées, l'expression des gènes marqueurs des voies de défense, le niveau d'induction de notre marqueur protéique PDNL38 et la

145

protection induite face à des agents pathogènes sont affectés par rapport à des plantes dont la fertilisation est optimale. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation stricte entre l'expression des gènes de défense, l'induction de PDNL38 et la protection. Ceci nous suggère que le test le plus conclusif pour évaluer un SDP demeure le test de protection car il reflète réellement l'efficacité du SDP.

Nous avons montré que la protéine NPR1 est impliquée dans le différentiel des réponses induites par un SDP en fonction de la fertilisation azotée. En effet les différences constatées dans la protection face à *D. dadantii* en fonction de la fertilisation ne sont pas retrouvées lorsqu'un mutant *npr1.1* est utilisé. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la nutrition azotée est impliquée dans la régulation de l'activité de NPR1. Sachant que la nutrition azotée peut avoir un impact sur la production de NO (Sthör et al., 2006), et que le NO peut agir sur l'activité de NPR1 via sa S-nitrosylation, la nutrition azotée peut donc affecter la S-nitrosylation de NPR1. Il a notamment été montré que la S-nitrosylation de NPR1 affecte son statut d'oligomérisation et de ce fait peut affecter son activité (Oliveira et al., 2010; Tada et al., 2008a).

Nous avons aussi montré que selon le SDP utilisé, il est possible d'induire une protection ou bien, au contraire, de favoriser l'infection. Cet effet est exacerbé par une fertilisation inadaptée. Par ailleurs, les voies de défense peuvent avoir des interactions antagonistes, il est donc important de considérer le type de maladie contre laquelle on veut induire une protection afin de choisir le SDP adéquat. Ainsi l'utilisation d'un SDP induisant la voie de défense contre les nécrotrophes peut favoriser l'infection par des biotrophes ou l'attaque par des insectes (Vos et al., 2013). Il faut donc considérer le stade de développement, le pathosystème, la voie de défense impliquée et le niveau de fertilisation azotée (Dietrich et al., 2005).

Les résultats obtenus dans cette troisième partie seront valorisés dans le cadre d'une publication scientifique en cours de rédaction (Annexe 9). Nous voulons effectuer d'autres tests de protection en utilisant le pathosystème *A. thaliana/P. syringae* (en cours) avant de soumettre cette publication.

Cette thèse CIFRE s'est donc située à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. J'ai pu exploiter les connaissances, concepts, et techniques moléculaires connus en recherche fondamentale pour aboutir à des résultats exploitables par les industriels de l'agronomie.

Dans le cadre de cette thèse j'ai développé deux nouveaux tests qui seront proposés par Staphyt : ELICITEST et GUSTAVE. Ces deux nouveaux outils seront intégrés au pipeline de tests déjà proposés par cette entreprise (test d'activité directe sur l'agent pathogène, test plein champ ...) afin de permettre l'évaluation et l'homologation de nouveaux SDP. En effet, ELICITEST et GUSTAVE

Partie 4. Conclusion générales et perspectives

permettent de montrer l'activation des défenses à deux niveaux moléculaires différents (respectivement aux niveaux protéique et transcriptionnel) comme il est recommandé dans la méthode d'évaluation des SDP (MG14) proposée par le CEB. Les résultats obtenus permettent aussi de mieux appréhender les différents facteurs influant sur l'efficacité des SDP et ainsi à Staphyt d'adapter ses protocoles pour les tests plein champ proposés à leurs clients.

Partie 4. Conclusion générales et perspectives

Partie 5. Bibliographie

- Acevedo, F. E., Rivera-Vega, L. J., Chung, S. H., Ray, S., and Felton, G. W. (2015). Cues from chewing insects — the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 80–86. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.029.
- Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Pickett, J., and Ton, J. (2010). Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation: Natural variation in priming of basal resistance. *Mol. Plant Pathol.*, no-no. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00645.x.
- Ahn, I.-P., Lee, S.-W., and Suh, S.-C. (2007). Rhizobacteria-Induced Priming in *Arabidopsis* Is Dependent on Ethylene, Jasmonic Acid, and *NPR1*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 759–768. doi:10.1094/MPMI-20-7-0759.
- Albert, I., Böhm, H., Albert, M., Feiler, C. E., Imkampe, J., Wallmeroth, N., et al. (2015). An RLP23– SOBIR1–BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nat. Plants* 1, 15140. doi:10.1038/nplants.2015.140.
- Ananieva, E. A., Christov, K. N., and Popova, L. P. (2004). Exogenous treatment with Salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to Paraquat. J. Plant Physiol. 161, 319–328. doi:10.1078/0176-1617-01022.
- Andargie, M., and Li, J. (2016). Arabidopsis thaliana: A Model Host Plant to Study Plant–Pathogen Interaction Using Rice False Smut Isolates of Ustilaginoidea virens. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.00192.
- Andersson, M. X., Kourtchenko, O., Dangl, J. L., Mackey, D., and Ellerström, M. (2006). Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 47, 947–959. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02844.x.
- Araya, T., Miyamoto, M., Wibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y. N., et al. (2014). CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2029–2034. doi:10.1073/pnas.1319953111.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., et al. (2003). Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant. Microbe Interact*. 16, 1118–1128. doi:10.1094/MPMI.2003.16.12.1118.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., and Vernet, G. (2006). Chitosan Oligomers and Copper Sulfate Induce Grapevine Defense Reactions and Resistance to Gray Mold and Downy Mildew. *Phytopathology* 96, 1188–1194. doi:10.1094/PHYTO-96-1188.
- Aznar, A., Chen, N. W. G., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaele, D., et al. (2014). Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. *PLANT Physiol.* 164, 2167–2183. doi:10.1104/pp.113.233585.
- Aznar, A., Chen, N. W. G., Thomine, S., and Dellagi, A. (2015). Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Sci.* 240, 90–97. doi:10.1016/j.plantsci.2015.08.022.
- Bari, R., and Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488. doi:10.1007/s11103-008-9435-0.

- Barker, C. (2018). "Systemic Acquired Resistance," in Annual Plant Reviews, eds. J. A. Roberts, D. Evan, M. T. McManus, and J. K. C. Rose (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 209–229. doi:10.1002/9781119312994.apr0032.
- Barsalobres-Cavallari, C. F., Petitot, A. S., Severino, F. E., Maia, I. G., and Fernandez, D. (2013). Host response profiling to fungal infection: molecular cloning, characterization and expression analysis of NPR1 gene from coffee (Coffea arabica). 8.
- Beilmann, A., Albrecht, K., Schultze, S., Wanner, G., and Pfitzner, U. M. (1992). Activation of a truncated PR-1 promoter by endogenous enhancers in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 18, 65–78. doi:10.1007/BF00018457.
- Benhamou, N., and Rey, P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable.: I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection* 92, 1. doi:10.7202/1012399ar.
- Berens, M. L., Berry, H. M., Mine, A., Argueso, C. T., and Tsuda, K. (2017). Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 401–425. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035544.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., and Fukuda, H. (2018). Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*. 59, 8–16. doi:10.1093/pcp/pcx181.
- Blumenthal, D., Mitchell, C. E., Pysek, P., and Jarosik, V. (2009a). Synergy between pathogen release and resource availability in plant invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7899–7904. doi:10.1073/pnas.0812607106.
- Blumenthal, D., Mitchell, C. E., Pyšek, P., and Jarošík, V. (2009b). Synergy between pathogen release and resource availability in plant invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7899–7904.
- Boatwright, J. L., Mukhtar, K., Coker, J., Mukhtar, S., and Ramonell, K. Regulatory mechanisms of pathogen-mediated cellular stress signaling in arabidopsis thaliana. 218.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., et al. (2001). Growth stage–based phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13, 1499–1510.
- Boyle, P., Le Su, E., Rochon, A., Shearer, H. L., Murmu, J., Chu, J. Y., et al. (2009). The BTB/POZ Domain of the Arabidopsis Disease Resistance Protein NPR1 Interacts with the Repression Domain of TGA2 to Negate Its Function. *Plant Cell* 21, 3700–3713. doi:10.1105/tpc.109.069971.
- Breiden, M., and Simon, R. (2016). Q&A: How does peptide signaling direct plant development? *BMC Biol.* 14. doi:10.1186/s12915-016-0280-3.
- Caarls, L., Pieterse, C. M. J., and Van Wees, S. C. M. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00170.

- Caarls, L., Van der Does, D., Hickman, R., Jansen, W., Verk, M. C. V., Proietti, S., et al. (2016). Assessing the Role of ETHYLENE RESPONSE FACTOR Transcriptional Repressors in Salicylic Acid-Mediated Suppression of Jasmonic Acid-Responsive Genes. *Plant Cell Physiol.*, pcw187. doi:10.1093/pcp/pcw187.
- Campbell, W. H. (1999). NITRATE REDUCTASE STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 277–303. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.277.
- Canet, J. V., Dobón, A., Fajmonová, J., and Tornero, P. (2012). The BLADE-ON-PETIOLE genes of Arabidopsis are essential for resistance induced by methyl jasmonate. *BMC Plant Biol.* 12, 199. doi:10.1186/1471-2229-12-199.
- Canet, J. V., DobóN, A., Roig, A., and Tornero, P. (2010). Structure-function analysis of npr1 alleles in Arabidopsis reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid: NPR1 alleles and NPR1 paralogs. *Plant Cell Environ.* 33, 1911–1922. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02194.x.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., and Dong, X. (1994). Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1583–1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. *Cell* 88, 57–63. doi:10.1016/S0092-8674(00)81858-9.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6531–6536. doi:10.1073/pnas.95.11.6531.
- Carella, P., Wilson, D. C., and Cameron, R. K. (2015). Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00775.
- Chahtane, H., Nogueira Füller, T., Allard, P.-M., Marcourt, L., Ferreira Queiroz, E., Shanmugabalaji, V., et al. (2018). The plant pathogen Pseudomonas aeruginosa triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in Arabidopsis. *eLife* 7. doi:10.7554/eLife.37082.
- Chan, Z. (2013). Proteomic responses of fruits to environmental stresses. *Front. Plant Sci.* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00311.
- Chen, C. (2002). Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced Arabidopsis Transcription Factor. *PLANT Physiol.* 129, 706–716. doi:10.1104/pp.001057.
- Chen, G.-S., Zhou, Y.-F., Lin, S., Zhang, Z., and Pan, D.-R. (2009). Isolation and Characterization of IbNPR1 Gene from Sweet Potato (Ipomoea batatas). *Acta Agron. Sin.* 35, 2218–2224. doi:10.1016/S1875-2780(08)60118-2.
- Chen, J.-C., Lu, H.-C., Chen, C.-E., Hsu, H.-F., Chen, H.-H., and Yeh, H.-H. (2013a). The NPR1 ortholog PhaNPR1 is required for the induction of PhaPR1 in Phalaenopsis aphrodite. *Bot. Stud.* 54, 31. doi:10.1186/1999-3110-54-31.
- Chen, J.-W., Kuang, J.-F., Peng, G., Wan, S.-B., Liu, R., Yang, Z.-D., et al. Molecular cloning and expression analysis of a npr1 gene from sugarcane. 8.

- Chen, X., Barnaby, J. Y., Sreedharan, A., Huang, X., Orbović, V., Grosser, J. W., et al. (2013b). Overexpression of the citrus gene CtNH1 confers resistance to bacterial canker disease. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 84, 115–122. doi:10.1016/j.pmpp.2013.07.002.
- Chen, X.-K., Zhang, J.-Y., Zhang, Z., Du, X.-L., Du, B.-B., and Qu, S.-C. (2012). Overexpressing MhNPR1 in transgenic Fuji apples enhances resistance to apple powdery mildew. *Mol. Biol. Rep.* 39, 8083–8089. doi:10.1007/s11033-012-1655-3.
- Cheng, Y. T., Germain, H., Wiermer, M., Bi, D., Xu, F., Garcia, A. V., et al. (2009). Nuclear Pore Complex Component MOS7/Nup88 Is Required for Innate Immunity and Nuclear Accumulation of Defense Regulators in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* 21, 2503–2516. doi:10.1105/tpc.108.064519.
- Chern, M., Canlas, P. E., and Ronald, P. C. (2008). Strong Suppression of Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis by NRR is Dependent on its Ability to Interact with NPR1and its Putative Repression Domain. *Mol. Plant* 1, 552–559. doi:10.1093/mp/ssn017.
- Chern, M.-S., Fitzgerald, H. A., Yadav, R. C., Canlas, P. E., Dong, X., and Ronald, P. C. (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis: NPR1 in rice and rice bZIP interactor. *Plant J.* 27, 101–113. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01070.x.
- Chinchilla, D. (2006). The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *PLANT CELL ONLINE* 18, 465–476. doi:10.1105/tpc.105.036574.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., et al. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497–500. doi:10.1038/nature05999.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124, 803–814. doi:10.1016/j.cell.2006.02.008.
- Choi, H. W., and Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol.* 16. doi:10.1186/s12870-016-0921-2.
- Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., et al. (2014). Identification of a Plant Receptor for Extracellular ATP. *Science* 343, 290–294. doi:10.1126/science.343.6168.290.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., et al. (2006). Priming: Getting Ready for Battle. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 1062–1071. doi:10.1094/MPMI-19-1062.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., and Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 97–119. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120132.
- Couto, D., and Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 537–552. doi:10.1038/nri.2016.77.

- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J. E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 487–511. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-040012.
- Daniel-Vedele, F., Filleur, S., and Caboche, M. (1998). Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 235–239. doi:10.1016/S1369-5266(98)80110-6.
- De Wit, M., Spoel, S. H., Sanchez-Perez, G. F., Gommers, C. M. M., Pieterse, C. M. J., Voesenek, L. A. C. J., et al. (2013). Perception of low red:far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in Arabidopsis. *Plant J.* 75, 90–103. doi:10.1111/tpj.12203.
- Delaney, T. P. (2000). New mutants provide clues into regulation of systemic acquired resistance. *Trends Plant Sci.* 5, 49–51. doi:10.1016/S1360-1385(99)01552-6.
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., et al. (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* 266, 1247–1250. doi:10.1126/science.266.5188.1247.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., and Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00155.
- Deng-wei, J., liu, Y., ce, S., Min, C., and Qing, Y. (2014). Cloning and characterization of a Solanum torvum NPR1 gene involved in regulating plant resistance to Verticillium dahliae. Acta Physiol. Plant. 36, 2999–3011. doi:10.1007/s11738-014-1671-0.
- Deslandes, L., and Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.* 17, 644–655. doi:10.1016/j.tplants.2012.06.011.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P. R. The Arabidopsis NPR1/NIM1 Protein Enhances the DNA Binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors. 13.
- Develey-Rivière, M.-P., and Galiana, E. (2007). Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytol.* 175, 405–416. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02130.x.
- Dietrich, R., Ploss, K., and Heil, M. (2005). Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. *Plant Cell Environ.* 28, 211–222. doi:10.1111/j.1365-3040.2004.01265.x.
- Dixon, M. S., Jones, D. A., Keddie, J. S., Thomas, C. M., Harrison, K., and Jones, J. D. . (1996). The Tomato Cf-2 Disease Resistance Locus Comprises Two Functional Genes Encoding Leucine-Rich Repeat Proteins. *Cell* 84, 451–459. doi:10.1016/S0092-8674(00)81290-8.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 547–552. doi:10.1016/j.pbi.2004.07.005.
- Dordas, C. (2008). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 33–46. doi:10.1051/agro:2007051.

- Dracatos, P. M., Haghdoust, R., Singh, D., and Park, R. F. (2018). Exploring and exploiting the boundaries of host specificity using the cereal rust and mildew models. *New Phytol.* 218, 453–462. doi:10.1111/nph.15044.
- Durrant, W. E., and Dong, X. (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. Annu. Rev. Phytopathol. 42, 185–209. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.
- Dutt, M., Barthe, G., Irey, M., and Grosser, J. (2015). Transgenic Citrus Expressing an Arabidopsis NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). PLOS ONE 10, e0137134. doi:10.1371/journal.pone.0137134.
- Eckardt, N. A. (2003). A New Twist on Systemic Acquired Resistance: Redox Control of the NPR1-TGA1 Interaction by Salicylic Acid. *PLANT CELL ONLINE* 15, 1947–1949. doi:10.1105/tpc.150910.
- Endah, R., Beyene, G., Kiggundu, A., van den Berg, N., Schlüter, U., Kunert, K., et al. (2008). Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 1007–1014. doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.007.
- Erbs, G., and Newman, M.-A. (2012). The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity: Glycosylated bacterial MAMPs. *Mol. Plant Pathol.* 13, 95–104. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00730.x.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., et al. (2008). Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens Agrobacterium and Xanthomonas Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chem. Biol.* 15, 438–448. doi:10.1016/j.chembiol.2008.03.017.
- Eyles, A., Chorbadjian, R., Wallis, C., Hansen, R., Cipollini, D., Herms, D., et al. (2007a). Crossinduction of systemic induced resistance between an insect and a fungal pathogen in Austrian pine over a fertility gradient. *Oecologia* 153, 365–374. doi:10.1007/s00442-007-0741-z.
- Eyles, A., Chorbadjian, R., Wallis, C., Hansen, R., Cipollini, D., Herms, D., et al. (2007b). Crossinduction of systemic induced resistance between an insect and a fungal pathogen in Austrian pine over a fertility gradient. *Oecologia* 153, 365–374. doi:10.1007/s00442-007-0741-z.
- Fagard, M., Dellagi, A., Roux, C., Périno, C., Rigault, M., Boucher, V., et al. (2007). Arabidopsis thaliana Expresses Multiple Lines of Defense to Counterattack Erwinia chrysanthemi. Mol. Plant. Microbe Interact. 20, 794–805. doi:10.1094/MPMI-20-7-0794.
- Fagard, M., Launay, A., Clement, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., et al. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J. Exp. Bot.* 65, 5643–5656. doi:10.1093/jxb/eru323.
- Farmer, E. E., and Ryan', C. A. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. 7.
- 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: Plants perceive a conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265–276. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x.

- Ferrari, S. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00049.
- Feys, B. J., and Parker, J. E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16, 449–455. doi:10.1016/S0168-9525(00)02107-7.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arab. Book* 11, e0166. doi:10.1199/tab.0166.
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275–296. doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Flors, V., Ton, J., Van Doorn, R., Jakab, G., García-Agustín, P., and Mauch-Mani, B. (2007). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against Pseudomonas syringae and Alternaria brassicicola: Role of callose and ABA in resistance. *Plant J.* 54, 81–92. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03397.x.
- Flury, P., Klauser, D., Schulze, B., Boller, T., and Bartels, S. (2013). The Anticipation of Danger: Microbe-Associated Molecular Pattern Perception Enhances AtPep-Triggered Oxidative Burst. *PLANT Physiol.* 161, 2023–2035. doi:10.1104/pp.113.216077.
- Franceschetti, M., Maqbool, A., Jiménez-Dalmaroni, M. J., Pennington, H. G., Kamoun, S., and Banfield, M. J. (2017). Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid Diversity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81. doi:10.1128/MMBR.00066-16.
- Fritz-Laylin, L. K. (2005). Phylogenomic Analysis of the Receptor-Like Proteins of Rice and Arabidopsis. *PLANT Physiol.* 138, 611–623. doi:10.1104/pp.104.054452.
- Fu, Z. Q., and Dong, X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 839–863. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105606.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., et al. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486, 228–232. doi:10.1038/nature11162.
- Furniss, J. J., and Spoel, S. H. (2015). Cullin-RING ubiquitin ligases in salicylic acid-mediated plant immune signaling. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00154.
- Gamir, J., Sánchez-Bel, P., and Flors, V. (2014). Molecular and physiological stages of priming: how plants prepare for environmental challenges. *Plant Cell Rep.* 33, 1935–1949. doi:10.1007/s00299-014-1665-9.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., et al. (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 711–724. doi:10.1094/MPMI-19-0711.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodiere, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., et al. (2008). Characterization and Biological Function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of Arabidopsis. *PLANT Physiol.* 147, 1279–1287. doi:10.1104/pp.108.119420.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-κB AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225–260. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225.

- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954.
- Gkizi, D., Lehmann, S., L'Haridon, F., Serrano, M., Paplomatas, E. J., Métraux, J.-P., et al. (2016). The Innate Immune Signaling System as a Regulator of Disease Resistance and Induced Systemic Resistance Activity Against *Verticillium dahliae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 29, 313–323. doi:10.1094/MPMI-11-15-0261-R.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Glazebrook, J. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis 2001 status. 8.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Metraux, J.-P., et al. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* 34, 217–228. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01717.x.
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., et al. (2008). Plant Pattern-Recognition Receptor FLS2 Is Directed for Degradation by the Bacterial Ubiquitin Ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* 18, 1824–1832. doi:10.1016/j.cub.2008.10.063.
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7, 251–256. doi:10.1016/S1360-1385(02)02261-6.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana: Sensitivity of A. thaliana to bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 277–284. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00451.x.
- Granado, J., Felix, G., and Boller, T. (1995). Perception of Fungal Sterols in Plants'. 107, 6.
- Greeff, C., Roux, M., Mundy, J., and Petersen, M. (2012). Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Front. Plant Sci.* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00209.
- Guillemette, T., Iacomi-Vasilescu, B., and Simoneau, P. (2004). Conventional and Real-Time PCR-Based Assay for Detecting Pathogenic *Alternaria brassicae* in Cruciferous Seed. *Plant Dis.* 88, 490–496. doi:10.1094/PDIS.2004.88.5.490.
- Guo, X., and Stotz, H. U. (2007). Defense Against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* Is Dependent on Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Ethylene Signaling. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 1384–1395. doi:10.1094/MPMI-20-11-1384.
- Gust, A. A., Pruitt, R., and Nürnberger, T. (2017). Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends Plant Sci.* 22, 779–791. doi:10.1016/j.tplants.2017.07.005.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M., and Nürnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci.* 17, 495–502. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.003.
- Häffner, E., Konietzki, S., and Diederichsen, E. (2015). Keeping Control: The Role of Senescence and Development in Plant Pathogenesis and Defense. *Plants* 4, 449–488. doi:10.3390/plants4030449.

- Han, Y., Mhamdi, A., Chaouch, S., and Noctor, G. (2013). Regulation of basal and oxidative stresstriggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione: Glutathione status and jasmonic acid. *Plant Cell Environ*. 36, 1135–1146. doi:10.1111/pce.12048.
- Hatcher, P. E. (1995). THREE-WAY INTERACTIONS BETWEEN PLANT PATHOGENIC FUNGI, HERBIVOROUS INSECTS AND THEIR HOST PLANTS. *Biol. Rev.* 70, 639–694. doi:10.1111/j.1469-185X.1995.tb01655.x.
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M. E., He, K., Li, J., et al. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12217–12222. doi:10.1073/pnas.0705306104.
- Heil, M. (2001). The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 137–146.
- Heil, M. (2002). Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Ann. Bot.* 89, 503–512. doi:10.1093/aob/mcf076.
- Heil, M., and Bostock, R. M. (2002). Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Ann. Bot.* 89, 503–512. doi:10.1093/aob/mcf076.
- Hein, I., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., and Birch, P. R. J. (2009). The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* 10, 547–562. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00547.x.
- Henry, G., Thonart, P., and Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol Agron Soc Env.*, 12.
- Herman, M. A. B., Restrepo, S., and Smart, C. D. (2007). Defense gene expression patterns of three SAR-induced tomato cultivars in the field. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 192–200. doi:10.1016/j.pmpp.2008.02.002.
- Hermann, M., Maier, F., Masroor, A., Hirth, S., Pfitzner, A. J. P., and Pfitzner, U. M. (2013). The Arabidopsis NIMIN proteins affect NPR1 differentially. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00088.
- Herrera-VÃisquez, A., Salinas, P., and Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00171.
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. J. Exp. Bot. 58, 2369–2387. doi:10.1093/jxb/erm097.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., and He, S. Y. (2014). Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol. Plant* 7, 1267–1287. doi:10.1093/mp/ssu049.
- Janda, M., Navrátil, O., Haisel, D., Jindřichová, B., Fousek, J., Burketová, L., et al. (2015). Growth and stress response in Arabidopsis thaliana, Nicotiana benthamiana, Glycine max, Solanum tuberosum and Brassica napus cultivated under polychromatic LEDs. *Plant Methods* 11. doi:10.1186/s13007-015-0076-4.
- Jensen, A. B., Raventos, D., and Mundy, J. (2002). Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in Arabidopsis. *Plant J.* 29, 595–606. doi:10.1046/j.0960-7412.2001.01241.x.

- Jeppesen, M. G., Navratil, T., Spremulli, L. L., and Nyborg, J. (2005). Crystal Structure of the Bovine Mitochondrial Elongation Factor Tu·Ts Complex. *J. Biol. Chem.* 280, 5071–5081. doi:10.1074/jbc.M411782200.
- Johnson, C. (2003). Salicylic Acid and NPR1 Induce the Recruitment of trans-Activating TGA Factors to a Defense Gene Promoter in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* 15, 1846–1858. doi:10.1105/tpc.012211.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi:10.1038/nature05286.
- Jourdan, E., Ongena, M., and Thonart, P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol Agron Soc Env.*, 13.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., et al. (2006).
 Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11086–11091. doi:10.1073/pnas.0508882103.
- Kallenbach, M., Alagna, F., Baldwin, I. T., and Bonaventure, G. (2010). Nicotiana attenuata SIPK, WIPK, NPR1, and Fatty Acid-Amino Acid Conjugates Participate in the Induction of Jasmonic Acid Biosynthesis by Affecting Early Enzymatic Steps in the Pathway. *PLANT Physiol.* 152, 96– 106. doi:10.1104/pp.109.149013.
- Karasov, T. L., Horton, M. W., and Bergelson, J. (2014). Genomic variability as a driver of plant– pathogen coevolution? *Curr. Opin. Plant Biol.* 18, 24–30. doi:10.1016/j.pbi.2013.12.003.
- Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., and Suzuki, S. (2015). Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in Arabidopsis plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 1015–1020. doi:10.1016/j.bbrc.2015.03.143.
- Kazan, K., and Lyons, R. (2014). Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *Plant Cell* 26, 2285–2309. doi:10.1105/tpc.114.125419.
- Kazan, K., and Manners, J. M. (2008). Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. *PLANT Physiol.* 146, 1459–1468. doi:10.1104/pp.107.115717.
- Kazan, K., and Manners, J. M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *J. Exp. Bot.* 62, 4087–4100. doi:10.1093/jxb/err142.
- Kesanakurti, D., Sareddy, G. R., Babu, P. P., and Kirti, P. B. (2009). Mustard NPR1, a mammalian IκB homologue inhibits NF-κB activation in human GBM cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 427–433. doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.046.
- Kesarwani, M., Yoo, J., and Dong, X. (2007). Genetic Interactions of TGA Transcription Factors in the Regulation of Pathogenesis-Related Genes and Disease Resistance in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* 144, 336–346. doi:10.1104/pp.106.095299.
- Khan, G. A., Vogiatzaki, E., Glauser, G., and Poirier, Y. (2016). Phosphate Deficiency Induces the Jasmonate Pathway and Enhances Resistance to Insect Herbivory. *Plant Physiol.* 171, 632– 644. doi:10.1104/pp.16.00278.

- Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., and Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00462.
- Kiba, T., and Krapp, A. (2016). Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant Cell Physiol.* 57, 707–714. doi:10.1093/pcp/pcw052.
- Kieu, N. P., Aznar, A., Segond, D., Rigault, M., Simond-CôTe, E., Kunz, C., et al. (2012). Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to Dickeya dadantii and Botrytis cinerea: Plant iron deficiency and resistance to pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 13, 816–827. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x.
- Kim, H. S., and Delaney, T. P. (2002). Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in Arabidopsis thaliana to Peronospora parasitica. Plant J. 32, 151–163. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01411.x.
- Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* 12, 2339–2350.
- Kissoudis, C., van de Wiel, C., Visser, R. G. F., and van der Linden, G. (2014). Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00207.
- Klemptner, R. L., Sherwood, J. S., Tugizimana, F., Dubery, I. A., and Piater, L. A. (2014). Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP): Ergosterol as a MAMP. *Mol. Plant Pathol.* 15, 747–761. doi:10.1111/mpp.12127.
- Kong, L., Xie, Y., Hu, L., Si, J., and Wang, Z. (2017). Excessive nitrogen application dampens antioxidant capacity and grain filling in wheat as revealed by metabolic and physiological analyses. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/srep43363.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F. C., Van Loon, L. C., et al. (2008). Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *PLANT Physiol.* 147, 1358–1368. doi:10.1104/pp.108.121392.
- Koornneef, A., and Pieterse, C. M. J. (2008). Cross Talk in Defense Signaling. *PLANT Physiol.* 146, 839–844. doi:10.1104/pp.107.112029.
- Korves, T. M. (2003). A Developmental Response to Pathogen Infection in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* 133, 339–347. doi:10.1104/pp.103.027094.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., et al. (2010). Perception of the *Arabidopsis* Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor At PEPR1 and Its Close Homologue At PEPR2. J. Biol. Chem. 285, 13471–13479. doi:10.1074/jbc.M109.097394.
- Kruger, J. (2002). A Tomato Cysteine Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance and Suppression of Autonecrosis. *Science* 296, 744–747. doi:10.1126/science.1069288.
- Kuai, X., Barraco, C., and Després, C. (2017). Combining Fungicides and Prospective NPR1-Based "Just-in-Time" Immunomodulating Chemistries for Crop Protection. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.01715.

- Kuai, X., and Després, C. (2016). Defining Arabidopsis NPR1 orthologues in crops for translational plant immunity. *Can. J. Plant Pathol.* 38, 25–30. doi:10.1080/07060661.2016.1149106.
- Kuai, X., MacLeod, B. J., and Després, C. (2015). Integrating data on the Arabidopsis NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00235.
- Kunze, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *PLANT CELL ONLINE* 16, 3496–3507. doi:10.1105/tpc.104.026765.
- Kutyniok, M., and Müller, C. (2013). Plant-mediated interactions between shoot-feeding aphids and root-feeding nematodes depend on nitrate fertilization. *Oecologia* 173, 1367–1377. doi:10.1007/s00442-013-2712-x.
- Kuykendall, L. D., Murphy, T. S., Shao, J., and McGrath, J. M. (2007). Nucleotide Sequence Analyses of a Sugarbeet Genomic NPR1-Class Disease Resistance Gene. *J. Sugar Beet Res.* 44, 15.
- Le Henanff, G., Farine, S., Kieffer-Mazet, F., Miclot, A.-S., Heitz, T., Mestre, P., et al. (2011). Vitis vinifera VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. *Planta* 234, 405–417. doi:10.1007/s00425-011-1412-1.
- Le Henanff, G., Heitz, T., Mestre, P., Mutterer, J., Walter, B., and Chong, J. (2009). Characterization of Vitis vinifera NPR1 homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *BMC Plant Biol.* 9, 54. doi:10.1186/1471-2229-9-54.
- Lee, H. J., Park, Y. J., Kwak, K. J., Kim, D., Park, J. H., Lim, J. Y., et al. (2015). MicroRNA844-Guided Downregulation of Cytidinephosphate Diacylglycerol Synthase3 (CDS3) mRNA Affects the Response of Arabidopsis thaliana to Bacteria and Fungi. Mol. Plant. Microbe Interact. 28, 892–900. doi:10.1094/MPMI-02-15-0028-R.
- Lemaitre, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., and Masclaux-Daubresse, C. (2008). Enzymatic and Metabolic Diagnostic of Nitrogen Deficiency in Arabidopsis thaliana Wassileskija Accession. *Plant Cell Physiol.* 49, 1056–1065. doi:10.1093/pcp/pcn081.
- Leon-Reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Körbes, A. P., Memelink, J., et al. (2010a). Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of *Arabidopsis* Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 23, 187–197. doi:10.1094/MPMI-23-2-0187.
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S. C. M., et al. (2010b). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232, 1423–1432. doi:10.1007/s00425-010-1265-z.
- Li, Q., and Verma, I. M. (2002). NF-κB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 975–975. doi:10.1038/nri968.
- Li, Y., and Loake, G. J. (2016). "Redox-Regulated Plant Transcription Factors," in *Plant Transcription Factors* (Elsevier), 373–384. doi:10.1016/B978-0-12-800854-6.00024-5.
- Lindermayr, C., Sell, S., Muller, B., Leister, D., and Durner, J. (2010). Redox Regulation of the NPR1-TGA1 System of Arabidopsis thaliana by Nitric Oxide. *Plant Cell* 22, 2894–2907. doi:10.1105/tpc.109.066464.

- Liu, G., Holub, E. B., Alonso, J. M., Ecker, J. R., and Fobert, P. R. (2004). An Arabidopsis NPR1like gene, NPR4, is required for disease resistance. *Plant J.*, 15.
- Liu, S., Wu, J., Zhang, P., Hasi, G., Huang, Y., Lu, J., et al. (2016). Response of phytohormones and correlation of SAR signal pathway genes to the different resistance levels of grapevine against Plasmopara viticola infection. *Plant Physiol. Biochem.* 107, 56–66. doi:10.1016/j.plaphy.2016.05.020.
- Loake, G., and Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 466–472. doi:10.1016/j.pbi.2007.08.008.
- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H. P., Gawronski, P., Boshoven, J. C., Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J. H. G., et al. (2012). Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10119–10124. doi:10.1073/pnas.1202867109.
- Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., and Ton, J. (2012). Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *PLANT Physiol.* 158, 844–853. doi:10.1104/pp.111.187468.
- Luna, E., and Ton, J. (2012). The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant Signal. Behav.* 7, 615–618. doi:10.4161/psb.20155.
- Lund, S. T., Stall, R. E., and Klee, H. J. Ethylene Regulates the Susceptible Response to Pathogen Infection in Tomato. 13.
- Ma, S., and Bohnert, H. J. (2007). Integration of Arabidopsis thaliana stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biol.* 8, R49. doi:10.1186/gb-2007-8-4-r49.
- Macho, A. P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Mol. Cell* 54, 263–272. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.028.
- Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick, H. N., and Shah, J. (2006). Genetically Engineered Resistance to Fusarium Head Blight in Wheat by Expression of *Arabidopsis NPR1*. *Mol. Plant*. *Microbe Interact*. 19, 123–129. doi:10.1094/MPMI-19-0123.
- Maleck, K. (1999). Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4, 215–219. doi:10.1016/S1360-1385(99)01415-6.
- Malnoy, M., Jin, Q., Borejsza-Wysocka, E. E., He, S. Y., and Aldwinckle, H. S. (2007). Overexpression of the Apple *MpNPR1* Gene Confers Increased Disease Resistance in *Malus × domestica*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 1568–1580. doi:10.1094/MPMI-20-12-1568.
- Manners, J. M., Penninckx, I. A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., et al. (1998). The promoter of the plant defensin gene PDF1. 2 from Arabidopsis is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol. Biol.* 38, 1071–1080.
- Manohar, M., Tian, M., Moreau, M., Park, S.-W., Choi, H. W., Fei, Z., et al. (2015). Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Front. Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00777.

- Manosalva, P., Manohar, M., von Reuss, S. H., Chen, S., Koch, A., Kaplan, F., et al. (2015). Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nat. Commun.* 6. doi:10.1038/ncomms8795.
- Mao, P., Duan, M., Wei, C., and Li, Y. (2007). WRKY62 Transcription Factor Acts Downstream of Cytosolic NPR1 and Negatively Regulates Jasmonate-Responsive Gene Expression. *Plant Cell Physiol.* 48, 833–842. doi:10.1093/pcp/pcm058.
- Marolleau, B., Gaucher, M., Heintz, C., Degrave, A., Warneys, R., Orain, G., et al. (2017). When a Plant Resistance Inducer Leaves the Lab for the Field: Integrating ASM into Routine Apple Protection Practices. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.01938.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M. ., Pozo, M. J., et al. (2016). Recognizing Plant Defense Priming. *Trends Plant Sci.* 21, 818–822. doi:10.1016/j.tplants.2016.07.009.
- Maruta, T., Inoue, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., et al. (2011). Arabidopsis NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant Sci.* 180, 655–660. doi:10.1016/j.plantsci.2011.01.014.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105, 1141–1157. doi:10.1093/aob/mcq028.
- Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., Van Kerckhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M., et al. (2012). Genome-Wide Characterization of ISR Induced in Arabidopsis thaliana by Trichoderma hamatum T382 Against Botrytis cinerea Infection. *Front. Plant Sci.* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00108.
- Matzinger, P. (2007). Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat. Immunol.* 8, 11–13. doi:10.1038/ni0107-11.
- Mauch-Mani, B. (1998). Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Ann. Bot.* 82, 535–540. doi:10.1006/anbo.1998.0726.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* 91, 295–298. doi:10.1016/S0092-8674(00)80412-2.
- Mengiste, T. (2012a). Plant Immunity to Necrotrophs. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 267–294. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172955.
- Mengiste, T. (2012b). Plant Immunity to Necrotrophs. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 267–294. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172955.
- Meur, G., Budatha, M., Dutta Gupta, A., Prakash, S., and Kirti, P. B. (2006). Differential induction of NPR1 during defense responses in Brassica juncea. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68, 128–137. doi:10.1016/j.pmpp.2006.09.003.
- Mintoff, S. J. L., Rookes, J. E., and Cahill, D. M. (2015). Sub-lethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*. 17, 703–711. doi:10.1111/plb.12286.

- Miranda, K. M., Espey, M. G., and Wink, D. A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71. doi:10.1006/niox.2000.0319.
- Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., and Karley, A. J. (2016). Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01132.
- Mithofer, A., and Boland, W. (2008). Recognition of Herbivory-Associated Molecular Patterns. *PLANT Physiol.* 146, 825–831. doi:10.1104/pp.107.113118.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., et al. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19613–19618. doi:10.1073/pnas.0705147104.
- Moreau, M., Westlake, T., Zampogna, G., Popescu, G., Tian, M., Noutsos, C., et al. (2013). The Arabidopsis oligopeptidases TOP1 and TOP2 are salicylic acid targets that modulate SAmediated signaling and the immune response. *Plant J.* 76, 603–614. doi:10.1111/tpj.12320.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003a). Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell* 113, 935–944. doi:10.1016/S0092-8674(03)00429-X.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003b). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935–944.
- Mozafar, A. (1993). Nitrogen fertilizers and the amount of vitamins in plants: A review. J. Plant Nutr. 16, 2479–2506. doi:10.1080/01904169309364698.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N., and Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of Collectorichum species. J. Plant Physiol. 165, 41–51. doi:10.1016/j.jplph.2007.06.008.
- Mur, L. A. J. (2005). The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *PLANT Physiol.* 140, 249–262. doi:10.1104/pp.105.072348.
- Mur, L. A. J., Laarhoven, L. J. J., Harren, F. J. M., Hall, M. A., and Smith, A. R. (2008). Nitric Oxide Interacts with Salicylate to Regulate Biphasic Ethylene Production during the Hypersensitive Response. *PLANT Physiol.* 148, 1537–1546. doi:10.1104/pp.108.124404.
- Muthamilarasan, M., and Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *J. Biosci.* 38, 433–449. doi:10.1007/s12038-013-9302-2.
- Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., et al. (2008). Amino Acid Sequence of Bacterial Microbe-Associated Molecular Pattern flg22 Is Required for Virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 21, 1165–1174. doi:10.1094/MPMI-21-9-1165.
- Nic-Matos, G., Narváez, M., Peraza-Echeverría, S., Sáenz, L., and Oropeza, C. (2017). Molecular cloning of two novel NPR1 homologue genes in coconut palm and analysis of their expression in response to the plant defense hormone salicylic acid. *Genes Genomics* 39, 1007–1019. doi:10.1007/s13258-017-0566-z.

- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., and Niu, D. (2017). Induced Systemic Resistance against Botrytis cinerea by Bacillus cereus AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent Signaling Pathway and Activates PAMP-Triggered Immunity in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00238.
- Nurnberger, 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. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x.
- Oliveira, H. C., Saviani, E. E., Oliveira, J. F. P., and Salgado, I. (2010). Nitrate reductase-dependent nitric oxide synthesis in the defense response of Arabidopsis thaliana against Pseudomonas syringae. *Trop. Plant Pathol.* 35, 104–107. doi:10.1590/S1982-56762010000200005.
- Orzaez, D., and Granell, A. (1997). DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in Pisum sativum. *Plant J.* 11, 137–144. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11010137.x.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., et al. Ozone-Sensitive Arabidopsis rcd1 Mutant Reveals Opposite Roles for Ethylene and Jasmonate Signaling Pathways in Regulating Superoxide-Dependent Cell Death. 15.
- Pajerowska-Mukhtar, K. M., Emerine, D. K., and Mukhtar, M. S. (2013). Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 18, 402–411. doi:10.1016/j.tplants.2013.04.004.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D. F. (2007). Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* 318, 113–116. doi:10.1126/science.1147113.
- Parkhi, V., Kumar, V., Campbell, L. A. M., Bell, A. A., and Rathore, K. S. (2010). Expression of Arabidopsis NPR1 in Transgenic Cotton Confers Resistance to Non-defoliating Isolates of Verticillium dahliae but not the Defoliating Isolates: NPR1-Mediated Resistance to Verticillium dahliae in Cotton. J. Phytopathol. 158, 822–825. doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01714.x.
- Pato, J., and Obeso, J. R. (2013). Effects of clipping and N fertilization on insect herbivory and infestation by pathogenic fungi on bilberry. *Basic Appl. Ecol.* 14, 347–356. doi:10.1016/j.baae.2013.02.005.
- Peraza-Echeverria, S., Santamaría, J. M., Fuentes, G., de los Ángeles Menéndez-Cerón, M., Vallejo-Reyna, M. Á., and Herrera-Valencia, V. A. (2012). The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. *Genes Genomics* 34, 379– 390. doi:10.1007/s13258-011-0218-7.
- Percival, G. C. (2001). INDUCTION OF SYSTEMIC ACQUIRED DISEASE RESISTANCE IN PLANTS: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR DISEASE MANAGEMENT IN URBAN FORESTRY. 12.
- Pieterse, C. M. ., and van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52–58. doi:10.1016/S1360-1385(98)01364-8.
- Pieterse, C. M. J. (2012). Prime Time for Transgenerational Defense. *PLANT Physiol.* 158, 545–545. doi:10.1104/pp.112.900430.

- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.
- Pieterse, C. M., and Van Loon, L. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 456–464. doi:10.1016/j.pbi.2004.05.006.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., et al. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1571–1580.
- Pochon, S., Terrasson, E., Guillemette, T., Iacomi-Vasilescu, B., Georgeault, S., Juchaux, M., et al. (2012). The Arabidopsis thaliana-Alternaria brassicicola pathosystem: A model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant Methods* 8, 16. doi:10.1186/1746-4811-8-16.
- Poschenrieder, C., Tolrà, R., and Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* 11, 288–295. doi:10.1016/j.tplants.2006.04.007.
- Pusztahelyi, T. (2018). Chitin and chitin-related compounds in plant–fungal interactions. *Mycology* 9, 189–201. doi:10.1080/21501203.2018.1473299.
- Quintero, C., and Bowers, M. D. (2011). Plant Induced Defenses Depend More on Plant Age than Previous History of Damage: Implications for Plant-Herbivore Interactions. *J. Chem. Ecol.* 37, 992–1001. doi:10.1007/s10886-011-0007-4.
- R Khan, M. I., and A Khan, N. (2013). Salicylic Acid and Jasmonates: Approaches in Abiotic Stress Tolerance. J. Plant Biochem. Physiol. 1. doi:10.4172/2329-9029.1000e113.
- Radwan, O., Mouzeyar, S., Venisse, J. S., Nicolas, P., and Bouzidi, M. F. (2005). Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete Plasmopara halstedii is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 56, 2683–2693. doi:10.1093/jxb/eri261.
- Rajjou, L. (2006). Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. *PLANT Physiol.* 141, 910–923. doi:10.1104/pp.106.082057.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20, 1–11. doi:10.1016/S0261-2194(00)00056-9.
- Ramírez, V., Van der Ent, S., García-Andrade, J., Coego, A., Pieterse, C. M., and Vera, P. (2010). OCP3 is an important modulator of NPR1-mediated jasmonic acid-dependent induced defenses in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 10, 199. doi:10.1186/1471-2229-10-199.
- Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y. A., et al. (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in Arabidopsis thaliana. *Nat. Immunol.* 16, 426–433. doi:10.1038/ni.3124.
- Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F., Durand, R., and Reignault, P. (2007). Iodus 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence

targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68, 1156–1164. doi:10.1016/j.phytochem.2007.02.011.

- Reverchon, S., Muskhelisvili, G., and Nasser, W. (2016). "Virulence Program of a Bacterial Plant Pathogen: The Dickeya Model," in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Elsevier), 51–92. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.05.005.
- Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme: Dickeya dadantii pathogenicity. Environ. Microbiol. Rep., n/a-n/a. doi:10.1111/1758-2229.12073.
- Rigault, M., Buellet, A., Masclaux-Daubresse, C., Fagard, M., Chardon, F., and Dellagi, A. (2017). Quantitative Methods to Assess Differential Susceptibility of Arabidopsis thaliana Natural Accessions to Dickeya dadantii. *Front. Plant Sci.* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00394.
- Robert, C., Bancal, M.-O., and Lannou, C. (2004). Wheat Leaf Rust Uredospore Production on Adult Plants: Influence of Leaf Nitrogen Content and Septoria tritici Blotch. *Phytopathology* 94, 712–721. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.7.712.
- 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. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114447.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P. R., and Despres, C. (2006). The Coactivator Function of Arabidopsis NPR1 Requires the Core of Its BTB/POZ Domain and the Oxidation of C-Terminal Cysteines. *PLANT CELL ONLINE* 18, 3670–3685. doi:10.1105/tpc.106.046953.
- Rosen, H. A ModSed Ninhydrin Calorimetric Analysis for Amino Acids. 6.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., et al. (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* 23, 2440–2455. doi:10.1105/tpc.111.084301.
- Sandhu, D., Tasma, I. M., Frasch, R., and Bhattacharyya, M. K. (2009). Systemic acquired resistance in soybean is regulated by two proteins, Orthologous to Arabidopsis NPR1. *BMC Plant Biol.* 9, 105. doi:10.1186/1471-2229-9-105.
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., et al. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep.* 32, 1085–1098. doi:10.1007/s00299-013-1441-2.
- Sauge, M.-H., Grechi, I., and Poëssel, J.-L. (2010). Nitrogen fertilization effects on Myzus persicae aphid dynamics on peach: vegetative growth allocation or chemical defence?: Peach nitrogen fertilization andMyzus persicaedynamics. *Entomol. Exp. Appl.* 136, 123–133. doi:10.1111/j.1570-7458.2010.01008.x.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., et al. (2000). Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11655–11660. doi:10.1073/pnas.97.21.11655.
- Schmelz, E. A. (2015). Impacts of insect oral secretions on defoliation-induced plant defense. *Curr. Opin. Insect Sci.* 9, 7–15. doi:10.1016/j.cois.2015.04.002.

- Schmilz, M. L. (1995). Function and activation of the transcription factor NF-KB in the response to toxins and pathogens. *Toxicol. Lett.* 82–83, 407–411. doi:10.1016/0378-4274(95)03491-9.
- Schwessinger, B., Bart, R., Krasileva, K. V., and Coaker, G. (2015). Focus issue on plant immunity: from model systems to crop species. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00195.
- Segonzac, C., and Zipfel, C. (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 54–61. doi:10.1016/j.mib.2010.12.005.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., et al. (2008). Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *PLANT CELL ONLINE* 20, 1169–1183. doi:10.1105/tpc.107.056325.
- Shah, J., Tsui, F., and Klessig, D. F. (1997). Characterization of a S alicylic A cid- I nsensitive Mutant (sai1) of Arabidopsis thaliana, Identified in a Selective Screen Utilizing the SA-Inducible Expression of the tms2 Gene. Mol. Plant. Microbe Interact. 10, 69–78. doi:10.1094/MPMI.1997.10.1.69.
- Shaner, G., and Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slowmildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051–1056.
- Shao, Y., Zhang, H., He, H., Cheng, B., and Xiang, Y. (2013). Molecular Cloning and Characterization of Orthologues of *NPR1* Gene from Poplar. *J. Phytopathol.* 161, 35–42. doi:10.1111/jph.12002.
- Sharp, R. (2013). A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy* 3, 757–793. doi:10.3390/agronomy3040757.
- Shi, Z., Maximova, S., Liu, Y., Verica, J., and Guiltinan, M. J. (2013). The Salicylic Acid Receptor NPR3 Is a Negative Regulator of the Transcriptional Defense Response during Early Flower Development in Arabidopsis. *Mol. Plant* 6, 802–816. doi:10.1093/mp/sss091.
- Shi, Z., Maximova, S. N., Liu, Y., Verica, J., and Guiltinan, M. J. (2010). Functional analysis of the theobroma cacao NPR1 gene in arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 10, 248. doi:10.1186/1471-2229-10-248.
- Shibuya, N., and Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59, 223–233. doi:10.1006/pmpp.2001.0364.
- Shiu, S.-H., and Bleecker, A. B. (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10763–10768. doi:10.1073/pnas.181141598.
- Silva, K. J. P., Mahna, N., Mou, Z., and Folta, K. M. (2018). NPR1 as a transgenic crop protection strategy in horticultural species. *Hortic. Res.* 5. doi:10.1038/s41438-018-0026-1.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., and Saranraj, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis: A review. *Afr J Agric Res*, 13.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L. R., et al. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4, 1247–1253. doi:10.1038/ni1011.

- Spoel, S. H. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *PLANT CELL ONLINE* 15, 760–770. doi:10.1105/tpc.009159.
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 18842–18847. doi:10.1073/pnas.0708139104.
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V. T., Govind, G., Seiler, C., and Kohli, A. (2012). Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506, 265–273. doi:10.1016/j.gene.2012.06.076.
- Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M., et al. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against Plasmopara viticola. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 79, 89–96. doi:10.1016/j.pmpp.2012.05.004.
- Sugano, S., Jiang, C.-J., Miyazawa, S.-I., Masumoto, C., Yazawa, K., Hayashi, N., et al. (2010). Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. *Plant Mol. Biol.* 74, 549–562. doi:10.1007/s11103-010-9695-3.
- Sun, C., Shao, Y., Vahabi, K., Lu, J., Bhattacharya, S., Dong, S., et al. (2014). The beneficial fungus Piriformospora indica protects Arabidopsis from Verticillium dahliaeinfection by downregulation plant defense responses. *BMC Plant Biol.* 14. doi:10.1186/s12870-014-0268-5.
- Sun, S.-C. (2017). The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 545–558. doi:10.1038/nri.2017.52.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., et al. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* 9, 1797–1810. doi:10.1101/gad.9.14.1797.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008a). Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321, 952–956. doi:10.1126/science.1156970.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008b). Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321, 952–956. doi:10.1126/science.1156970.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2002). *Plant physiology*. 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates.
- Thaler, J. S., Karban, R., Ullman, D. E., Boege, K., and Bostock, R. M. (2002). Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* 131, 227–235. doi:10.1007/s00442-002-0885-9.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., et al. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 15107–15111. doi:10.1073/pnas.95.25.15107.

- Tian, Q., Chen, F., Liu, J., Zhang, F., and Mi, G. (2008). Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *J. Plant Physiol.* 165, 942–951. doi:10.1016/j.jplph.2007.02.011.
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M. C., Rodenburg, N., Pauwels, L., et al. (2013). Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCOI1-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *Plant Cell* 25, 744–761. doi:10.1105/tpc.112.108548.
- van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J., and Ton, J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5602–5607. doi:10.1073/pnas.0510213103.
- Van Wees, S. C. M. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. 13.
- Veresoglou, S. D., Barto, E. K., Menexes, G., and Rillig, M. C. (2013a). Fertilization affects severity of disease caused by fungal plant pathogens. *Plant Pathol.* 62, 961–969. doi:10.1111/ppa.12014.
- Veresoglou, S. D., Barto, E. K., Menexes, G., and Rillig, M. C. (2013b). Fertilization affects severity of disease caused by fungal plant pathogens. *Plant Pathol.* 62, 961–969. doi:10.1111/ppa.12014.
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J. (2004). The Transcriptome of Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17, 895–908. doi:10.1094/MPMI.2004.17.8.895.
- Verma, I. M., Stevenson, J., Schwarz, E. M., and iyarnoto', S. R ~ ~ / N F K/IKBB familv: intimate tales of association and dissociation. 14.
- Verma, V., Ravindran, P., and Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16. doi:10.1186/s12870-016-0771-y.
- Vincentz, M., Moureaux, T., Leydecker, M.-T., Vaucheret, H., and Caboche, M. (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* 3, 315–324. doi:10.1111/j.1365-313X.1993.tb00183.x.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F., and Park, S.-W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 436–442. doi:10.1016/j.pbi.2008.05.003.
- Vos, I. A., Moritz, L., Pieterse, C. M. J., and Van Wees, S. C. M. (2015). Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00639.
- Vos, I. A., Pieterse, C. M. J., and van Wees, S. C. M. (2013). Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathol.* 62, 43–55. doi:10.1111/ppa.12105.
- Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A. M., and Close, T. J. (2007). Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress. *Plant Cell Environ*. 30, 410–421. doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01628.x.

- Walley, J. W., and Dehesh, K. (2010). Molecular Mechanisms Regulating Rapid Stress Signaling Networks in *Arabidopsis*. J. Integr. Plant Biol. 52, 354–359. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00940.x.
- Walters, D. R. (2009). Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. *Crop Prot.* 28, 459–465. doi:10.1016/j.cropro.2009.01.009.
- Walters, D. R., Havis, N. D., Paterson, L., Taylor, J., and Walsh, D. J. (2011). Cultivar Effects on the Expression of Induced Resistance in Spring Barley. *Plant Dis.* 95, 595–600. doi:10.1094/PDIS-08-10-0577.
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., and Lyon, G. (2005). Induced Resistance for Plant Disease Control: Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. *Phytopathology* 95, 1368–1373. doi:10.1094/PHYTO-95-1368.
- Wang, D., Xu, Z., Zhao, J., Wang, Y., and Yu, Z. (2011). Excessive nitrogen application decreases grain yield and increases nitrogen loss in a wheat—soil system. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 61, 681–692. doi:10.1080/09064710.2010.534108.
- Wasternack, C., and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann. Bot.* 111, 1021–1058. doi:10.1093/aob/mct067.
- Weigel, R. R., Bäuscher, C., Pfitzner, A. J. P., and Pfitzner, U. M. (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from Arabidopsis that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. 18.
- Westlake, T. J., Ricci, W. A., Popescu, G. V., and Popescu, S. C. (2015). Dimerization and thiol sensitivity of the salicylic acid binding thimet oligopeptidases TOP1 and TOP2 define their functions in redox-sensitive cellular pathways. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00327.
- Wi, S. J., Ji, N. R., and Park, K. Y. (2012). Synergistic Biosynthesis of Biphasic Ethylene and Reactive Oxygen Species in Response to Hemibiotrophic Phytophthora parasitica in Tobacco Plants. *PLANT Physiol.* 159, 251–265. doi:10.1104/pp.112.194654.
- 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. doi:10.1038/35107108.
- Williams', S. A., Weatherwax, S. C., Bray, E. A., and Tobin, E. M. (1994). NPR Genes, Which Are Negatively Regulated by Phytochrome Action in Lemna gibba 1. G-3, Can Also Be Positively Regulated by Abscisic Acid'. 105, 6.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and Van Kan, J. A. L. (2007). Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8, 561–580. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.
- Withers, J., and Dong, X. (2017). Post-translational regulation of plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 124–132. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.004.
- Worrall, D., Holroyd, G. H., Moore, J. P., Glowacz, M., Croft, P., Taylor, J. E., et al. (2012). Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytol.* 193, 770–778. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03987.x.

- Wu, Q., Wang, X. Z., Tang, Y. Y., Yu, H. T., Ding, Y. F., De Yang, C., et al. (2014). Molecular cloning and characterization of NPR1 gene from Arachis hypogaea. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5247–5256. doi:10.1007/s11033-014-3395-z.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., et al. (2012). The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Rep.* 1, 639–647. doi:10.1016/j.celrep.2012.05.008.
- Xu, G., Fan, X., and Miller, A. J. (2012). Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 153–182. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105532.
- Yamada, K., Yamashita-Yamada, M., Hirase, T., Fujiwara, T., Tsuda, K., Hiruma, K., et al. (2016). Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. *EMBO J.* 35, 46–61. doi:10.15252/embj.201591807.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A. C., Tax, F. E., and Ryan, C. A. (2010). PEPR2 Is a Second Receptor for the Pep1 and Pep2 Peptides and Contributes to Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 508–522. doi:10.1105/tpc.109.068874.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). TRANSCRIPTIONAL REGULATORY NETWORKS IN CELLULAR RESPONSES AND TOLERANCE TO DEHYDRATION AND COLD STRESSES. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781–803. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444.
- Yocgo, R. E., Creissen, G., Kunert, K., and Chikwamba, R. (2012). Two Different Banana NPR1-Like Coding Sequences Confer Similar Protection Against Pathogens in Arabidopsis. *Trop. Plant Biol.* 5, 309–316. doi:10.1007/s12042-012-9112-y.
- Yu, D., Chen, C., and Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* 13, 1527–1540.
- Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., et al. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol. J.* 5, 313–324. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00243.x.
- Zabel, M., and Baeuerle, P. A. Purified Human IKB Can Rapidly Dissociate the Complex of the NF-KB Transcription Factor with Its Cognate DNA. 11.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., and Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14, 415–421. doi:10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x.
- Zampogna, G. Arabidopsis Salicylic Acid-Binding Metalloendopeptidases TOP1 and TOP2 Regulate H2O2 Accumulation and Programmed Cell Death during the Immune Response against the Bacterial Pathogen Pseudomonas syringae. 98.
- Zarattini, M., Launay, A., Farjad, M., Wénès, E., Taconnat, L., Boutet, S., et al. (2017). The bile acid deoxycholate elicits defences in Arabidopsis and reduces bacterial infection: Deoxycholate elicits defences in Arabidopsis. *Mol. Plant Pathol.* 18, 540–554. doi:10.1111/mpp.12416.
- Zhang, G.-B., Yi, H.-Y., and Gong, J.-M. (2014). The Arabidopsis Ethylene/Jasmonic Acid-NRT Signaling Module Coordinates Nitrate Reallocation and the Trade-Off between Growth and Environmental Adaptation. *Plant Cell* 26, 3984–3998. doi:10.1105/tpc.114.129296.

- Zhang, Y., Cheng, Y. T., Qu, N., Zhao, Q., Bi, D., and Li, X. (2006). Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two *NPR1* paralogs. *Plant J.* 48, 647–656. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02903.x.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., and Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6523–6528. doi:10.1073/pnas.96.11.6523.
- Zhang, Y., Ni, X., Ma, H., and Qiu, W. (2013). Characterization of NPR1 Genes from Norton and Cabernet Sauvignon Grapevine. J. Integr. Agric. 12, 1152–1161. doi:10.1016/S2095-3119(13)60432-3.
- Zhang, Y., Shi, J., Liu, J.-Y., Zhang, Y., Zhang, J.-D., and Guo, X.-Q. (2010). Identification of a novel NPR1-like gene from Nicotiana glutinosa and its role in resistance to fungal, bacterial and viral pathogens: Identification of a novel NPR1-like gene from N. glutinosa. *Plant Biol.* 12, 23–34. doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00210.x.
- Zhang, Y., Wang, X., Cheng, C., Gao, Q., Liu, J., and Guo, X. (2008). Molecular cloning and characterization of GhNPR1, a gene implicated in pathogen responses from cotton (Gossypium hirsutum L.). *Biosci. Rep.* 28, 7. doi:10.1042/BSR20070028.
- Zhao, J.-T., Huang, X., Chen, Y.-P., Chen, Y.-F., and Huang, X.-L. (2009). Molecular Cloning and Characterization of an Ortholog of NPR1 Gene from Dongguan Dajiao (Musa spp. ABB). *Plant Mol. Biol. Report.* 27, 243–249. doi:10.1007/s11105-008-0074-z.
- Zhong, X., Xi, L., Lian, Q., Luo, X., Wu, Z., Seng, S., et al. (2015). The NPR1 homolog GhNPR1 plays an important role in the defense response of Gladiolus hybridus. *Plant Cell Rep.* 34, 1063–1074. doi:10.1007/s00299-015-1765-1.
- Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., et al. NPR1 Differentially Interacts with Members of the TGA/OBF Family of Transcription Factors That Bind an Element of the PR-1 Gene Required for Induction by Salicylic Acid. 12.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 10–16. doi:10.1016/j.coi.2007.11.003.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351. doi:10.1016/j.it.2014.05.004.
- Zipfel, C., and Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 353–360. doi:10.1016/j.pbi.2005.05.004.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., et al. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell* 125, 749–760. doi:10.1016/j.cell.2006.03.037.

Partie 6. Annexe

Annexe 1. Identification de NPR1

Afin de montrer que la bande détectée correspond bien à la protéine NPR1, une identification a été effectuée par spectrométrie de masse sur des bandes découpées sur un gel d'acrylamide réalisé en parallèle avec un Western blot, par la plateforme PAPPSO (UMR Génétique Quantitative et Evolution - le Moulon, PAPPSO, Ferme du Moulon, 91190 Gif sur Yvette). Huit bandes ont ainsi été découpées puis les protéines retrouvées sous ces bandes ont été digérée avec de la trypsine avant analyse Figure 80.





NPR1 est retrouvée parmi les protéines identifiées au niveau des bandes 6, 7 et 8 et ce sont les mêmes peptides qui sont détectés quel que soit l'échantillon et en quantité équivalente (la limite de détection) Tableau 8. Ces peptides couvrent 4% de la protéine totale mais sont suffisants pour affirmer que c'est bien NPR1. Ces peptides retrouvés se situent juste en amont de la séquence qui nous a permis de développer l'anticorps (en N ter) Figure 81. Aucun peptide n'est retrouvé en C ter. On ne peut donc pas dire si la protéine détectée en western est la protéine complète ou alors une protéine clivée quelque pars en C ter.



Figure 81 : Schéma de la protéine NPR1 montrant ou se situe les peptides séquencés ainsi que le peptide utilisé pour la conception de l'anticorps

Tableau 8 : Résultats montrant la détection de la protéine NPR1 pour les bandes 6 7 et 8 ainsi que les peptides correspondant à cette protéine détectés dans ces échantillons.

Bande 6								
MS Sample 20160602_cueff_160_6								
Group ID	Sub-group	Protein ID	Description	log(E value)	Coverage	MW	size	Spectra
c106	c106.a1	c106.a1.a1	AT1G64280.1 Symbols: NPR1,	-24.05389214	4	65.90000153	593	3
MS Sample	20160602_0	cueff_160_6						
Group ID	Peptide ID	SequenceLI	Modifs	Charge	MH+ theo	Number of subgroup	Subgroup ids	Number of spectra
c106	pepc106a1	ISNSFESVFDSPDDFYSDAK		2	2269.978	1	c106.a1	1
c106	pepc106a2	IVISDGR		2	759.4364	1	c106.a1	1
c106	pepc106a3	SFESVFDSPDDFYSDAK		2	1955.8186	1	c106.a1	1
Bande 7								
MS Sample	MS Sample 20160602_cueff_160_7							
Group ID	Sub-group	Protein ID	Description	log(E value)	Coverage	MW	size	Spectra
c132	c132.a1	c132.a1.a1	AT1G64280.1 Symbols: NPR1,	-21.37599564	4	65.90000153	593	3
MS Sample 20160602_cueff_160_7		cueff_160_7						
Group ID	Peptide ID	SequenceLI	Modifs	Charge	MH+ theo	Number of subgroup	Subgroup ids	Number of spectra
c132	pepc132a1	ISNSFESVFDSPDDFYSDAK		2	2269.978	1	c132.a1	1
c132	pepc132a2	IVISDGR		2	759.4364	1	c132.a1	1
c132	pepc132a3	SFESVFDSPDDFYSDAK		2	1955.8186	1	c132.a1	1
Bande 8								
MS Sample 20160602_cueff_160_8								
Group ID	Sub-group	Protein ID	Description	log(E value)	Coverage	MW	size	Spectra
c126	c126.a1	c126.a1.a1	AT1G64280.1 Symbols: NPR1,	-27.72769547	4	65.90000153	593	3
MS Sample 20160602_cueff_160_8								
Group ID	Peptide ID	SequenceLI	Modifs	Charge	MH+ theo	Number of subgroup	Subgroup ids	Number of spectra
pepc126a1	ISNSFESVFD		2	2269.9776	1	c126.a1	1	
pepc126a2	IVISDGR		2	759.4364	1	c126.a1	1	
pepc126a3	SFESVFDSPD		2	1955.8186	1	c126.a1	1	

Annexe 2 Protocole GUSTAVE au format interne de Staphyt

			DROCEDURE (DOA)		Version :
14 -			PROCEDURE (POS)	Référence :	Version :
Staphyt			Test GUS d'élicitation/po	tentialisation des défe	nses des plantes
Objectif :	Ce docume défense de	ent exp s plante	ilque comment réaliser un test (as par des SDN.	SUS d'élicitation et/ou potent	ialisation des voies de
Conditions :	Toutes les matériel sté La culture	s étape érile. è est efi	s jusqu'à la récoite se dérouient e lectuée en chambre climatique à :	n milieu stérile sous la hotte a 22°C en condition jours longs	a flux laminaire avec du (16h d'éclairement par
Matériel :	jour) • Graines d	A. thail	ana PR1::GUS et/ou PDF1.2::GUS	3	
	Boltes de Urgopore Boutelles Ependorfs Cure dent Pulvérisat Eprouvett GUS) Plaques 6 Cônes de Plpettes 2 pinces 3 Aluminium Fond noir Logiciel in	Pétri ro stériles s 1.5ml is stérile eurs es grac i puits 1ml sté a dissec n alimer (photoc nageJ e	ondes d x h : 9cm x 2,5cm s (50, 100, 500ml et 11) es duées stériles (50, 100 et 500ml p ériles dion fines ntaire copie de sac poubelle par ex) et son plugin FigureJ	our préparation des élément	s d'essai et du tampon
Apparells :	 Hotte à flu Cloche à v Agitateur r Barreau m Propipette Etuve à 35 Appareil p 	ux lamin vide magnéti nagnétik ?*C vhoto et	ique que chambre de photographie		
Produits :	Eau perm Eléments Témoin po Milieu MS Sucrose Agar Comprimé Ethanol 9 Na2HPO4 NaH2PO4 EDTA 0.5i X-Gluc DMF	utée à f d'essai ositif : S (Muras è de Ba 5% 1 1M 1 1M M pH 8	température ambiante stérile A (pour PR1) Me-JA dans DMSO shige et Skoog + vitamines) yrochlore (Javel)	(pour PDF1)	
Responsable	s de l'action		Aotions / Opéra	tions	Documents associés

Responsables de l'action	Actions / Opérations	(processus, procédures, fiches)

Ce document est la propriété de Staphyt - Reproduction interdite sans autorisation

page 1/7



page 2/7



14	PROCEDURE (POS)	Référence :	Version :	
Staphyt	Test GUS d'élicitation/potentialisation des défenses des plantes			
Sem	er :			
Dépoi tapoiz l'autre bolte)	er une quinzaine de graines par boi nt l'épendorf et les disposer à 2-3cm : à l'aide d'un cure-dent stérie (cha Fermer les boltes à l'aide d'urgo-pore	tes sous hote à flux laminaire en le distance du bord et l'une de inger de cure-dent pour chaque		
Dispo	stion approximative des graines			
Emm sema	ener les boltes en chambre de culture nes.	(22°C,16h d'éclairement) pour 3		
Enle	ver les contaminations :]		
Pass S11 ch S1 ch S1 ch S1 ch S1 ch Dans dévei S1 la pince	r régulièrement vérifier qu'il n'y a pas o est un ohampignon : jeter la boîte. st une baotérie (colonie), l'enlever sou : utiliser le cône comme un emporte er le cône avec le doigt et prélever. ce cas vérifier la boîte le lendemain et oppe de nouveau, jeter la boîte. bactérie se situe à côté d'une plante, stérile) ou jeter la boîte.	de contaminations. Is hotte à l'aide d'un cône de 1mi pièce en centrant la colonie puis le suriendemain. Si la bactérie se enlever la plante (à l'aide d'une		
Dan gradu lamin	arer les solutions à puivenser : (s des boutelles stèriles avec de l' ées stèriles. Préparer minimum 15-20 aire.	je matin) 'eau stérile et des éprouvettes i mi de solution sous hotte à flux		
- SA 100m 100 n 25m	1mM : faire une solution mère à 2 n avec un barreau aimenté stérile (frot i puis une fois dissoute en filtrer 30 m et y rajouter 25 mi d'eau stérile et obter	nM dans une boutelle stérie de té à l'éthanol 70%) : 0.276g pour i avec un filtre 22µm. En prélever nir du 1mM.	101-803	
-MeJ/ - Elér	NO.1mM : 1µi de MeJA et 50µi de DMS nents d'essai à tester : faire seion le	iO dans 50mi d'eau protocole 101-803 en respectant		
les do	ses prévues avec le client			
I			I I	

page 4/7

	PROCEDURE (POS)	Référence :	Version :
Staphut	Total Cille Principal	- I	
	Test GUS d'elicitation	n/potentialisation des defen	ses des plantes
Pulv	Pulvériser les boltes : (raprès-mid) sous hotte à flux laminaire.		
Utils	Utiliser le calendrier de manipulation pour déterminer le jour de la ou des pulvérisation(s).		
Dans dans date	Dans le cas d'un test d'élicitation, une seule puivérisation sera effectuée; dans le cas d'un test de potentialisation cette étape sera renouvelée à la date prévue seion le calendrier de manipulatuion.		
A ce cond allou	tte étape, il est important de b tion(s) de pulvérisation sur chaq é à chaque condition dans le plan d	calcuHGUS.xisx	
Ouvr fois) cultu stérik	ir les boltes, les pulvériser en pulv puis les refermer à l'aide d'urgo re. Entre chaque pulvérisation, ri e 2 à 3X en pulvérisant une dizai		
vide	pour bien rincer la buse.		
cond	barer le tampon GUS : ()e matr tion.	n) à raison de 10ml de tampon par	
:: Atte mom Tumle	ention !! Solution photosensible : N ent et garder le DMF+X-Gluc ainsi re (entourer d'aluminium alimentai		
Tamp	pon GUS pour 500ml :		
-Na2 -EDT	HPO4 1M : 14,4ml -NaH2PO4 A 0,5 M pH8 : 10ml -H2O miliq	4 1 M : 10,5ml : qsp 495ml	
-Dilu solut	er 250mg de X-Gluc dans 5 mi de l ion précédente.	DMF puis rajouter le tout dans la	
Prép marg d'étu	arer des plaques 6 puits (un puits p ueur, en se référant au numéro ali de.		
Réc	olter les plantes : (l'après-mid)	en utilsant deux pinces fines.	
Utils	er le calendrier de manipulation po	ur déterminer le jour de la récoite.	
Préle	ver 8 rosettes représentatives de	la boîte réparties aléatoirement sur la	
bolte tamp	et les déposer dans le puits o on GUS. Pour cela, attraper so	correspondant contenant 9-10 mi de ous la base de la rosette avec une	calcul-GUS.xisx
prem prem coup	ière pince (au niveau de l'hypocot ière en faisant attention à prend sec pour enjever les racines.	yle), glisser la deuxième pince sous la re toutes les racines, puis tirer d'un	
Colo	pration GUS :		
Une	Une fois les plantes prélevées et mises dans des pults avec du tampon GUS,		
les s entre	les soumettre au vide (3X 10-15min), à l'aide d'une cloche à vide, pour faire entrer la solution.		
Pour	Pour cela ouvrir les plaques 5 puits (en repérant bien quelle plaque va avec quel couvercie), les placer dans la cloche à vide et descendre à -0.095 MPA		
(lecture)	(lecture sur le vacuomètre). Une fois cette étape réalisée, refermer les plaques, les entourer d'aluminium alimentaire et les incuber sur la nutt à		
37°C			

page 5/7
12 Ctashut	PROCEDURE (POS) Refe	trence :	Version :
Costaphyt	Test GUS d'élicitation/potent	tialisation des défens	es des plantes
Déco	loration : (le matin)		
Enley	er le tampon GUS des puits (Optionnel: en	prélever 1,6 ml dans des	
pipett	e 10ml, décaler les plantes vers le haut du p	puits et prélever vers le bas	
douce	ment (pour ne pas abîmer les plantules). noi 95% puis laisser incuber lusqu'à de	. Remplacer l'eau par de	
plants	les (Il est parfois nécessaire de changer l'éth	anol une fois).	
Phot	ographie : (raprès midi)		
Optio	nnel: Etaler les ependonts contenant le tamp	oon prélevé précédemment	
dess dans	s de chaque tube en se référant au numéro e plan d'étude.	o aloué à chaque condition	
Prépa	rer une plaque 8 putts avec 2-3mi d'eau copie de sac poubelle par ext sur lequel la	par puits, et un fond noir a plaque sera posée (pour	
bon c	ontraste des photos).	a bodie sein brace (bra	
Lorsq (cond	ue les plantes sont bien décolorées (plus o tion après condition) et séparer les 6 pla	de vert visible) les prélever antes de chaque condition	
chacu en en	ne dans un puits (contenant de l'eau) et les der, à l'aide de deux pinces fines.	étaier de manière à les voir	
Prend	ire en photo (mode macro) chaque plant ant bien ce que représente chaque photo.	e de chaque condition en . Pour cela, entre chaque	
condi Ainsi, chaqu	ion prendre en photo l'annotation du couvero l'appareil photo restituant les photos dans e photo pourra ôtre identifiée.	cie de la condition sulvarte. Fordre des prises de vue,	
Prim	o notation (Optionnel) :		
Alloue des t	r une note (de 0 à 5) à chaque condition e ibes de tampon. Pour cela, constituer une	en utilisant la photographie écheile avec les témoins	
négat notaž	fs, positifs et des tubes avec une coloration on permet d'avoir un premier avis sur les résu	Intermédiaire. Cette primo ultats obtenus.	
	truction de la flaure de résultat :		
Con	r las obstos à l'aide du slucie Elsure I du las	oldel Image I. Midling our	
6 pho	tographies par condition (les 5 les plus s s en los puis les mettre dans un fichier Mic	semblables) Enregistrer les	
Le fic detuc	her peux ôtre alors enregistré en pdf pour e.	intégration dans le rapport	
Trait	ement des résultats :		
Utilise Féche	r les figures pour allouer une note à cha le de notation du plan d'étude.	aque condition en utilisant	
Const chaqu	ruire le tableau de résultat stipulant la not e condition. Pour cela utiliser le fichier Excel	e et sa signification pour : tableaux-test.xisx	tableaux-test xisx
Ce ta	pieau sera repris dans la partie résultat du ray	pport d'étude.	
	at and in presential do Objects of Departmenting inter-		0309.6/7
Ce docume	nt est la propriete de Staphyt - Meproduction Inter	une sens eutonsetion	page on

Martin Contraction	and a start	PROCEDURE (P06)	Reference :		Version :
Staphyt		Test GUS d'élici	tation/p	otentialisa	tion des déle	nses des plante
REDACTEUR		anile Very	1	APPROBAT	DUR:	

Ce document est la propriété de Staphyt - Reproduction intentité sans autorisation

Annexe 3 Tableau dynamique permettant de calculer le coût facturé de GUSTAVE en fonction du nombre de conditions



Annexe 4 Devis type GUSTAVE au format interne de Staphyt



Projet Test XXXX

Client 1

TEST DE L' CHOISISSEZ UN ELEMENT. DE LA CHOISISSEZ UN ELEMENT. Choisissez un élément.

Projet XXXXX

Ce projet consiste à évaluer l'activité de Choisissez un élément. en tant que Stimulateur de Défense des Plantes (SDP) en s'intéressant à leur effet d'Choisissez un élément. de la Choisissez un élément..

Pour Choisissez un élément. l'effet d'Choisissez un élément. sera testé pour Cliquez ici pour taper du texte. conditions en les mettant en parallèle avec 3 contrôles, pour un total de Cliquez ici pour taper du texte. conditions. Cette expérimentation sera effectuée à 2 reprises.

Ce document décrit les tests qui seront effectuées ainsi que le cout de cet essai.

Elicitation par des nouveaux SDP



Projet Test XXXX

Client 2

1 - EFFICACITE D'Choisissez un élément. DE LA Choisissez un élément.

1.1 - Système d'essai

Les essais seront conduits sur des jeunes plantes entières d'Arabidopsis thaliana Colo possédant une construction Choisissez un élément., permettant la visualisation de l'expression Choisissez un élément. Cette construction permet d'observer l'expression Choisissez un élément.(Via son promoteur couplé à un gène rapporteur (la β-glucuronidase ou GUS) dont le produit est détectable par la présence d'une couleur bleue après incubation dans un tampon spécifique).

1.2 – Test in-vitro

Une méthode de quantification relative reposant sur l'intensité de la couleur produite sera utilisée pour évaluer l'efficacité de l'activation de la Choisissez un élément. par Choisissez un élément.

Chaque produit sera testé pour Cliquez ici pour taper du texte. Choisissez un élément. uitérieurement en accord entre le client et le représentant). Un test témoin impliquant Choisissez un élément, conditions sera réalisé en parailèle. Cliquez ici pour taper du texte, conditions différentes seront donc testées par expérimentation et ces Cliquez ici pour taper du texte, conditions seront testées 2 fois dans le cadre de l'essai. La méthode d'expérimentation est décrite cl-dessous.

- Etude de chaque condition sur des lots de 6 plantes cv. Arabidopsis thallana Col0 Choisissez un élément,
- Germination de 6 graines in vitro puis culture 3 semaines en chambre de culture à 22°C et éclairement 16h/jour,
- Chaque produit sera testé à Choisissez un élément. ultérleurement en accord entre le client et le représentant)
- Pulvérisation soit avec de l'eau (témoin négatif), du Choisissez un élément, ou du Bion® (témoins positifs), soit avec Choisissez un élément, à tester, remise en culture pour Choisissez un élément (définis ultérieurement en accord entre le client et le représentant),
- Récolte et incubation dans tampon de coloration pendant la nuit à 37°C.
- Photographies traitées à l'aide du plugin FigureJ du logiciei ImageJ,
- Notation des conditions,

2. - REPLICATION DE L'EXPERIMENTATION

Elicitation par des nouveaux SDP



Projet Test XXXX

Client 3



Elicitation par des nouveaux SDP



Projet Test XXXX

Client 4

3. - RAPPORT ET TIMING

Les résultats préliminaires seront délivrés dès leur obtention par e-mail.

Un rapport sera rédigé à la fin de l'essal.

Ce rapport sera imprimé et une version électronique sera envoyée par e-mail.

4. - COUT

Le cout du test d'Choisissez un élément. de la Choisissez un élément. Pour Choisissez un élément. (pour x doses et x temps différents), Choisissez un élément. témoinsChoisissez un élément.est de : 11 100 € TTC

Validation	Date :	
	Signature :	
Martillac, le xxxx		
G		

Elicitation par des nouveaux SDP

Annexe 5 Plan d'étude GUSTAVE au format interne de Staphyt

PLAN D'ETUDE RELATIF AU CONTRAT N° XXXXX GUS /

(XXXXX)



TEST DE L'INDUCTION DE CHOISISSEZ UN ELEMENT.

EN CHOISISSEZ UN ELEMENT.

PREPARE PAR : CAMILLE VERLY REVU PAR : DR. MARIE EMMANUELLE SAINT MAGARY APPROUVE PAR : DR. FREDERIC GIRAUD LE : VISA : PLAND'ETUDE Nº XXXXX SOMMARE

Sommaire	
SOMMAIRE	2
APPROBATIONS ET VERIFICATIONS	3
INTERVENANTS	4
COMPOSANTES DE L'ETUDE	5
RESUME ET CODES DES CONDITIONS ETUDIEES	C
PLANNING PREVISIONNEL DE L'ETUDE	7
MATERIELS ET METHODES	8
1. Objectives	8
2. MATERIEL VEOETAL	8
3. ELEMENT(3) D'ESSAJ	8
4. SYSTEME D'ESSAU	9
5. APPLICATION DES ELEMENTS D'ESSAI	9
5.1. COMBINAISON DES ELEMENTS D'ESSAI	10
5.2. DILUTIONS	11
5.3. CONCENTRATIONS ETUDIEES	11
5.4. CONDITIONS D'APPLICATION	12
5.5. CONDITIONS D'INCUBATION	12
6. CONDITIONS DE CULTURE	12
7. NOTATIONS	12
8. RAPPORT DE SYNTHESE	12
3. DIFFUSION DU PLAN D'ETUDE	133
10. ARCHWAGE DES DOCUMENTS	133

STAPLOT XXXXXX

Intel Set II

PLAN PRIMUE NOCOCOC APPROACTIONS BY FRAMICATIONS

APPROBATIONS ET VERIFICATIONS

Le plan d'étude afférent au contrat N°15 51 01 GUS /MSY 15 21 220 est valide par :

LE DIRECTEUR D'ETUDE

Monsieur Frédéric GIRAUD BIORIZON SARL Rue François Magendie Bordeaux-Montesquieu 33550 MARTILLAC ~ France Téléphone : 05 57 95 05 00 Télécopie : 05 57 95 05 01 Date : Signature :

Dat

LE DEMANDEUR

Monsieur Freddy PIERRARD JOUFFRAY DRILLAUD Adresse

CP Ville - Pays Téléphone : Télécopie :

STADIOT XXXXX Pent 3 2 # 13

189

PLAN D'ETUDE Nº XXX INTERVENANTS

INTERVENANTS

LE DEMANDEUR

M. ou Me. XXXX Adresse

CP VIIe - Pays Téléphone : Télécopie :

LE DIRECTEUR D'ETUDE

Monsieur Frédéric GIRAUD BIORIZON SARL Rue François Magendie Bordeaux-Montesquieu 33650 MARTILLAC – France Téléphone :05 57 96 06 00 Télécopie : 05 57 96 06 01

L'EXPERIMENTATEUR

Monsieur Camilie VERLY BIORIZON SARL Rue François Magendie Bordeaux-Montesquieu 33650 MARTILLAC – France Téléphone :05 57 96 06 00 Télécopie : 05 57 96 06 01

5ТАРНУТ хооох PAGE 4 SUR 13

PLAN D'RTUDE Nº XXX COMPOSANTE DE L'ETUDE

COMPOSANTES DE L'ETUDE

L'objet de ce programme de recherche est d'évaluer l'effet Choisissez un élément. Cliquez ici pour taper du texte. comme Choisissez un élément. au niveau de la Choisissez un élément.

Cette étude sera conduite exclusivement sur un modèle expérimental sur plante entière d'Arabidopsis thaliana (Col0) possédant une construction de rapporteur transcriptionnel Choisissez un élément. Ce mutant d'A. thallana permet de sulvre l'expression Choisissez un élément.

La réalisation de travaux en conditions contrôlées au laboratoire, tel que ceux-ci permettent de maltriser l'expression de Choisissez un élément. (absence de stress ablotique et blotique).

Les principales caractéristiques de l'essal sont :

- Etude sur un modèle expérimental jeunes plantes d'A. thallana In-vitro;
- Etude des spécialités xxx, Acide salicylique (SA), Bion®, Chitosan et Flagelline ;
- Choisissez un élément. Choisissez un élément. pour Choisissez un élément. ;
 - xxx → x ml/l,

1 dose étudiée pour les spécialités ;

- SA → 1 mM,
 Bion[®] → 150 mg/l,
 Chitosan → 10 g/l dans 10 ml/l d'acide acétique,
- Flagelline → 0.1mM,
- Etude de chaque condition sur des lots de 6 plantes cv. Arabidopsis thaliana Col0 Choisissez un élément.
- Germination de 6 graines in vitro puis culture 3 semaines en chambre de culture à 22°C et éclairement 16h/jour,

- PulvérisationChoisissez un élément.solt avec de l'eau (témoin négatif), Choisissez un élément.solt avec Choisissez un élément. à tester, remise en culture pour Choisissez un élément.

- Choisissez un élément. Choisissez un élén
- Récoite et incubation dans tampon de coloration pendant la nuit à 37°C.
- Photographies traitées à l'aide du plugin FigureJ du logiciel ImageJ,
- Notation des conditions,
- Comte rendu et commentaires de l'essal.

STAPHYT 200007

Page 5 gap 13

PLAN D'ETUDE Nº XXX RESUME ET CODES DES CONDITIONS ETUDIES

RESUME ET CODES DES CONDITIONS ETUDIEES

ELICITATION

Produit	Dose	condition
H ₂ O	1	
SA	1 mM	2
XXX	x ml/l	3
Bion®	150 mg/l	4
Chitosan	10 g/l	5
Flagelline	0.1 mM	6

POTENTIALISATION

Produit	Dose	condition
H ₂ O H ₂ O		1
H ₂ O SA	1 mM	8
H ₂ O XXX	x mlA	9
H ₂ O Blon®	150 mg/l	10
H ₂ O Chitosan	10 gA	11
H ₂ O Flagelline	0.1 mM	12
XXX H ₂ O	x ml/l	13
XXX XXX	x mi/i x mi/i	14
XXX Blon®	x ml/l 150 mg/l	15
xxx Chitosan	x mi/i 10 g/i	16
xxx Flagelline	x ml/l 0.1 mM	17

STAPHYT X0000X PAGE 6 SUR 13

PLAN D'ETUDE Nº XXX RESUME ET CODES DES CONDITIONS ETUDIES

Un total de x conditions sera étudié. L'essai sera répété deux fois dans le temps Soit un total de x conditions sera étudié. Le matériel végétal nécessaire à la réalisation des essais est de x plantes d'Arabidopsis thallana Col0 Choisissez un élément.

PLANNING PREVISIONNEL DE L'ETUDE Début de l'étude Début des essais Fin des essais Analyse des résultats Remise du rapport

STAPHYT X0000X PAGE 7 SUR 13

MATERIELS ET METHODES

1. OBJECTIFS

Ces essais ont pour but de tester Choisissez un élément. de la voie de Choisissez un élément. par Choisissez un élément. par visualisation de l'expression Choisissez un élément.

Cette observation se fera à l'aide de plantes transformées génétiquement avec une construction PR1::GUS, permettant la visualisation de l'expression Choisissez un élément. Cette construction permet d'observer l'expression Choisissez un élément.(via Choisissez un élément, promoteur couplé à un gène rapporteur (la β-glucuronidase ou GUS) dont le produit est détectable par la présence d'une couleur bleue après incubation dans un tampon spécifique).

2. MATERIEL VEGETAL

Les analyses seront réalisées sur un système expérimental Arabidopsis thaliana Choisissez un élément. Ces plantes sont cultivées in-vitro sur milieu Murashige et Skoog + vitamines +1,5% de saccharose, en chambre de culture dans des conditions permettant d'assurer une maîtrise de la qualité des plantes et de leur état sanitaire tout au long de l'expérimentation (22°C, éclairement 16h/]).

3. ELEMENT(S) D'ESSAI

5 éléments d'essai seront étudiés. Ceux-ci seront codés pour leur étude au laboratoire sous les numéros 1 à 5 tout au long des essais. Les caractéristiques techniques des éléments d'essai seront fournies par le demandeur au moment de l'expédition des éléments. A réception au laboratoire, ceux-ci seront reconditionnés selon la procédure opératoire 101-812 et identifiés selon le 101-811.

Tableaux 1a. Caractéristiques techniques des éléments d'essai soumis à l'étude 15 51 / 01 GUS

CODE BIORIZON	1	2	3
NOM COMERCIAL	Adde Salicylique	XXX	Bion 50 WG®
COMPOSITIION	Adde Salicylique	NC	acibenzolar-S-méthyl
CONCENTRATION EN M.A.	99,9%	NC	50%
N* CAS	NC	NC	135158-54-2
TYPE DE FORMULATION	SP	NC	WG
DENSITE	NC	NC	NC
DATE DE RECEPTION	NC	NC	NC
N" DE LOT	NC	NC	NC
CONDITION DE STOCKAGE	15-25°C	NC	15-25°C

STAPHYT X0000X PAGE 8 SUR 13

CODE BIORIZON	4	5
NOM COMERCIAL	Chitosan	Flagelline
COMPOSITION	Chitosan	Flagelline
CONCENTRATION EN M.A.	99.90%	99,9%
N" CAS	9012-76-4	NC
TYPE DE FORMULATION	NC	SP
DENSITE	NC	NC
DATE DE RECEPTION	NC	NC
N" DE LOT	NC	NC
CONDITION DE STOCKAGE	15-25°C	-20°C

Tableaux 1b. Caractéristiques techniques des éléments d'essai soumis à l'étude 15 51 / 01 GUS

Les éléments d'essais seront gérés selon la procédure 101-813 en vigueur. A la fin de l'étude, les reliquats des éléments d'essais seront conservés pendant une période d'un an dans les archives produits de Biorizon, puis détruits, sauf mention contraire du commettant. Les données roxicologiques des éléments d'essais confiées à Biorizon devront impérativement accompagner l'échanzilion expédié. En absence de ces données, nous ne pourrions procéder aux études prévues compte tenu des dangers potentiels encourus par le personnel de notre société.

4. SYSTEME D'ESSAI

Les essais seront conduits sur des jeunes plantes entières d'Arabidopsis thaliana Colo possédant une construction Choisissez un élément, produites *In-vitro* en chambre de culture. <u>Des lots de 6 plantes</u> seront constitués pour l'étude de chaque modalité d'un essai. Les modalités seront identifiées au moment des traitements en notant le numéro de la modalité sur le fond de la bolte de pétri.

A l'Issu des notations, l'analyse des résultats sera réalisée sur les 5 plantes constituant le lot le plus homogène en considérant les critéres de vlabilité mortalité et croissance.

5. APPLICATION DES ELEMENTS D'ESSAI

L'application de l'élément d'essai pour la mise en évidence de l'activation des mécanismes de défense de type Choisissez un élément, est une pulvérisation d'H₂O (témoin négatif), d'acide salicylique (témoin positif), de Bion[®] (témoin SDN), et Choisissez un élément, sur les rosettes des plantes 3 semaines après germination. La stratégie de l'essai est présentée Figure 1.

5TAPHYT x0000x PAGE 9 SUR 13



Le principe général de l'application de l'élément d'essai pour la démonstration de potentialisation consiste en une pulvérisation de la solution de xxx ou du témoin négatif H₂O sur les rosettes des plantes 3 semaines après germination, suivie d'une pulvérisation 48h après d'eau (témoin négatif) d'acide salicyllque (témoin positif), de Bion® (témoin SDN), et Choisissez un élément. La stratègie de l'essai est détaillée Figure 2.



5.1. COMBINAISON DES ELEMENTS D'ESSAI

Les tableaux 2, 3 et 4 présentent cl-dessous les stratégies de l'essai.

Tableaux 2. Caractéristiques de l'essal d'élicitation.

Produit	Design expérimental
H ₂ 0	Témoin négatif total
SA	Témoin positif totai
XXX	Condition élicitation en 24h
Blon®	Témoin d'élicitation SDN
Chitosan	Témoin d'élicitation éliciteur 1 en 24h
Flagelline	Témoin d'élicitation éliciteur 2 en 24h

5TAPH/YT x0000x PAGE 10 SUR 13

Tableaux 2	Caractéristic	ues de l'essal	de potentialisation.
Tableaux 2.		uco uci coodi	ue potermanoauori.

Prodult J0	Prodult J0 + 48h	Design expérimental
H ₂ O	H ₂ 0	Témoin négatif total
H₂O	SA	Témoin positif total
H ₂ O	XXX	Témoin effet produit en 24h
H ₂ O	Bion®	Témoin potentialisation avec un SDN
H ₂ O	Chitosan	Témoin potentialisation avec un éliciteur 1
H ₂ O	Flageline	Témoin potentialisation avec un éliciteur 2
XXX	H ₂ O	Témoin négatif potentialisation
XXX	JDE 01	Condition « auto » potentialisation
XXX	Bion®	Condition potentialisation
XXX	Chitosan	Condition potentialisation
XXX	Flageline	Condition potentialisation

5.2. DILUTIONS

Les dilutions de l'élément d'essai s'opérent dans le laboratoire. La procédure opératoire 101-803 régit les modalités de réalisation de ces dilutions. Les solutions des éléments d'essais sont préparées à une température de 20 à 25 °C juste avant leur application sur le végétal. Les dilutions successives sont opérées dans une eau miliQ stérile à température ambiante sous hôte à flux laminaire. Le ratio dose recommandé en champ (en L ou kg/ ha) est adapté en concentration volumique (g/l, mi/l ou Molaire) en considérant une pulvérisation en champ de 500/ha.

5.3. CONCENTRATIONS ETUDIEES

Choisissez un élément. Choisissez un élément en concentration volumique (g/l, ml/l ou Molaire) adaptée en fonction de la dose recommandé en champ (en L ou kg/ ha), en considérant une pulvérisation en champ de 5001/ha.

SA . Témoin positif total	1mM solt 138 mg/l de matière active
Bion ^e . Témoln SDN	150 mg/l de matière active
Chitosan . Eliciteur 1	10 g/l de matière active + 10 mi/l d'acide acétique
Flagelline . Eliciteur 2	0,1 mM de matière active
XXX . Produit testé	x mi/l de produit formulé

NB : L'utilisation d'acide acétique a été testé dans des essais utérieurs et s'avère n'avoir aucun effet sur l'expression du gène PR1

STAPHYT X0000X PAGE 11 SUR 13

PLAN D'ITUDE N° XXX MATTRUELS ET MICTHODIS 5.4. CONDITIONS D'APPLICATION Les applications sont réalisées à l'aide de puivérisateurs manuels stériles. 5.5. CONDITIONS D'INCUBATION

Les plantes sont récoltées 24h après leurChoisissez un élément traitement et sont incubées sur la nuit dans le tampon de coloration contenant le substrat de la β-glucuronidase (X-Gluc).

6. CONDITIONS DE CULTURE

Les plantes sont cultivées en chambre climatique (22°C, éclairement 16h/j).

7. NOTATIONS

Une note de 0 à 5 est attribuée à chaque condition.

O correspondant à une absence d'expression Choisissez un élément, 5 à l'expression la plus forte.

Tableau 3. Echelle de notation.

Note	Signification
0-1	Pas d'expression du gène Choisissez un élément/ Pas d'activation de Choisissez un élément.
2	Faible expression du gêne Choisistez un élément. / Activation faible de Choisissez un élément.
3-4	Expression du gène Choisessez un élément. / Activation de Choisissez un élément:
5	Forte expression du gène Choisissez un élément. / Activation forte de Choisissez un élément.

Figure 3. Echelle visuelle de référence des notations :



8. RAPPORT DE SYNTHESE

Un rapport d'étude final sera rédigé et sera soumis à inspection auprès du Responsable Qualté de Biorizon. Ce rapport sera remis au commettant dans les délais indiqués au paragraphe 2. Toutes les données brutes, rapports et documents divers (autres que les éléments d'essai) afférents aux essais seront conservés au sein du laboratoire pendant une durée de 10 années.

STAPHYT XXXXXX PAGE 12 SUR 13

9. DIFFUSION DU PLAN D'ETUDE

TYPE		DESTINATAIRES	
	NOM	FONCTION	SOCIETE
Original 1	XXX	Responsable de projet	XXX
Original 2	Frédéric GIRAUD	DE *	BIORIZON
Cople 1	Isabelle BATT	RQ *	BIORIZON
Cople 2	Camilie Verly	Responsable de proiet	BIORIZON

* DE =Directeur d'Etude / RQ = Responsable Qualité

Toutes les zones du présent plan d'étude laissant apparaître les noms, sociétés et coordonnées du commettant seront dissimulées sur l'exemplaire remis au technicien expérimentateur afin de préserver au mieux la confidentialité de cette étude.

10. ARCHIVAGE DES DOCUMENTS

Le plan d'étude originale, les données brutes, le rapport d'étude et tous les documents relatifs à cette étude seront conservés pendant une durée de 10 années dans les archives de BIORIZON et gérées selon la procédure 13-8.

STAPHYT x0000x PAGE 13 SUR 13

Annexe 6 Résultat d'étude GUSTAVE au format interne de Staphyt

Rapport d'étude relatif au contrat N° XXX GUS /

(XXXX)



Test de l'induction de Choisissez un élément. en Choisissez un élément.

Préparé par : Camilie Veriy Revu par : Dr. Marie Emmanuelle Saint macary Approuvé par : Dr. Frédéric Giraud Le : XX/XX/XXX

Visa :

SOMMARE

PAGE DE GARDE

NUMERO DE CONTRAT	ANNÉE	DEBUT DE L'ETUDE	FIN DE L'ETUDE	NOMBRE DE PAGES
xx	xx	xx	xx	xx

TITRE DU RAPPORT

Test de l'Induction de Choisises us dément. En Choisises us élément.

AUTEUR

DR. F GIRAUD ET DR M.E SAINT MACARY-	
BIORIZON	

RESPONSABLE TECHNIQUE CAMILLE VERLY - BIORIZON

CONTRACTANTS

M XXX

MOTS CLES

Test In vitro, Arabidopsis thallana Col0 Choisissez un élément élicitation, potentialisation, SDP, Résistance systèmique acquise

RESUME

L'objet de ce programme de recherche était d'évaluer l'effet Choisissez un élément. Cliquez ici pour taper du texte. comme Choisissez un élément au niveau de la Choisissez un élément.

Cette étude a été conduite exclusivement sur un modèle expérimental sur plante entière d'Arabidopsis thaliana Col0 possédant une construction de rapporteur transcriptionnel Choisissez un élément. Ce mutant d'A. thaliana permet de sulvre l'expression Choisissez un élément.

La réalisation de travaux en conditions contrôlées au laboratoire, tel que ceux-ci ont permis de maîtriser de Choisissez un élément. (absence de stress ablotique et biotique).

RESULTATS

L'étude de JDE 01, utilisant les plantes d'A. thallana PR1::GUS, en conditions in-vitro contrôlées suggèrent que l'application unique de XXX n'induit pas l'expression du gène PR1, marqueur de l'activation des mécanismes de défense de type SAR.

Cette préparation semble en revanche avoir un effet de potentialisation de la voie de défense de type SAR, impliquant le SA. En effet, l'activation du gène PR1 n'a lieu qu'après une double puivérisation de JDE01 et/ou suivi d'une application par un autre éliciteur.

Ces résultats suggèrent qu'une double puivérisation de XXX est nécessaire pour l'activation des mécanismes de défense dans le cadre d'une utilisation *in-situ*.

RAPPORT D'ETUDE Nº XXX GUS VERSION 2 - XX/XX/XXX	SOMM-ARE
Sommaire	
SOMMAIRE	
COMPOSANTES DE L'ETUDE	4
PLANNING DE L'ETUDE	6
MATERIELS ET METHODES	7
1. OBJECTIFS	7
2. MATERIEL VEGETAL	7
3. ELEMENT(8) D'ESSAI	7
4. SYSTEME D'ESSAI	8
5. APPLICATION DES ELEMENTS D'ESSAI	8
5.1. COMBINAISON DES ELEMENTS D'ESSAI	9
5.2. DILUTIONS	9
5.3. CONCENTRATIONS ETUDIEES	10
5.4. CONDITIONS D'APPLICATION	10
5.5. CONDITIONS D'INCUBATION	10
6. CONDITIONS DE CULTURE	10
7. NOTATIONS	10
RESULTATS	11
1. ELICITATION	11
2. POTENTIALISATION	12
3. CONCLUSION	13
CONCLUSION	14

COMPOSANTES DE L'ETUDE

Composantes de l'étude

L'objet de ce programme de recherche était d'évaluer l'effet Choisissez un élément. Cliquez ici pour taper du texte. comme Choisissez un élément. au niveau de la Choisissez un élément.

Cette étude a été conduite exclusivement sur un modèle expérimental sur plante entière d'Arabidopsis thaliana Col0 possédant une construction de rapporteur rapporteur transcriptionnel Choisissez un élément. Ce mutant d'A. thaliana permet de suivre l'expression Choisissez un élément.

La réalisation de travaux en conditions contrôlées au laboratoire, tel que ceux-ci ont permis de maîtriser l'expression de Choisissez un élément. (absence de stress ablotique et blotique).

Les principales caractéristiques de l'essai étalent :

- Etude sur un modèle expérimental jeunes plantes d'A.thallana in-vitro ;

- Etude des spécialités XXX, Acide salicylique (SA), Bion®;

- Choisissez un élément. Choisissez un élément. pour Choisissez un élément. ;
 - XXX → X ml/l,
- 1 dose étudiée pour les spécialités ;
 - SA → 1 mM,
 - Bion[®] → 150 mg/l,
- Etude de chaque condition sur des lots de 6 plantes cv. Arabidopsis thaliana Col0 Choisissez un élément.
- Germination de 6 graines in vitro puis culture 3 semaines en chambre de culture rotative à 22°C et éclairement 16h/jour,
- PulvérisationChoisissez un élément soit avec de l'eau (témoin négatif), Choisissez un élément soit avec Choisissez un élément, à tester, remise en culture pour Choisissez un élément.

Choisissez un élément. Choisissez un élément.

- Récolte et incubation dans tampon de coloration pendant la nuit à 37°C.
- Photographies traitées à l'aide du plugin FigureJ du logiciei ImageJ,
- Notation des conditions,
- Comte rendu et commentaires de l'essai.

RAPPORT D'ETUDE Nº XXX GUS VERSION 2 - XX/XX/XXXX RESUME ET CODES CONDITIONS ETUDEES

RESUME ET CODES DES CONDITIONS ETUDIEES

ELICITATION

Produit	Dose	condition
H ₂ O		1
SA	1mM	2
XXX	Xml/l	3
Bion®	150mg/l	4

POTENTIALISATION

	Prodult	Dose	condition
	H ₂ O H ₂ O		5
	H₂O SA	1mM	6
	H₂O XXX	Xml/I	7
	H ₂ O Blon®	150mg/l	8
	XXX H ₂ O	Xml/I	9
ĺ	XXX XXX	Xml/I Xml/I	10
	XXX Blon®	Xml/l 150mg/l	11

RESUME ET CODES CONDITIONS ETUDIEES

Un total de 11 conditions a été étudié. L'essai a été répété deux fois dans le temps Soit un total de 22 conditions étudiées. Le matériei végétal nécessaire à la réalisation des essais a été de 132 plantes d'. Arabidopsis thaliana Col0 PR1 ::GUS

Planning de l'étude Début de l'étude

Début des essais Fin des essais Analyse des résultats Remise du rapport MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Objectifs

Ces essais avaient pour but de tester l'élicitation de la voie de la SAR par Choisissez un élément, par visualisation de l'expression Choisissez un élément.

Cette observation a été faite à l'aide de plantes transformées génétiquement avec une construction PR1::GUS. Cette construction permet d'observer l'expression Choisissez un élément. Cette construction permet d'observer l'expression Choisissez un élément.(via Choisissez un élément, promoteur couplé à un gène rapporteur (la β-glucuronidase ou GUS) dont le produit est détectable par la présence d'une couleur bieue après incubation dans un tampon spécifique).

2. Matériel végétal

Les analyses ont été réalisées sur le système végétal Arabidopsis thallana Choisissez un élément. Ces plantes ont été cultivées in-vitro sur milieu gélosé classique + vitamines +1,5% de saccharose, en chambre de culture dans des conditions permettant d'assurer une maîtrise de la qualité des plantes et de leur état sanitaire tout au long de l'expérience (22°C, éclairement 16h/j).

élément(s) d'essai

3 éléments d'essai ont été étudiés. Ceux-ci ont été codés pour leur étude au laboratoire sous les numéros 1 à 3 tout au long des essais. Les caractéristiques techniques des éléments d'essai ont été fournies par le demandeur au moment de l'expédition des éléments. A réception au laboratoire, ceux-ci ont été reconditionnés selon la procédure opératoire 101-812 et identifiés selon le 101-811.

Tableaux 1a. Caractéristiques techniques des éléments d'essai soumis à l'étude 15 51 / 01 GUS

CODE BIORIZON	° 1	2	3
NOM COMERCIAL	Adde Salicylique	XXX	Bion 50 WG®
COMPOSITIION	Adde Salicylique	NC	acibenzolar-S-méthyl
CONCENTRATION EN M.A.	99,9%	NC	50%
N" CAS	NC	NC	135158-54-2
TYPE DE FORMULATION	SP	NC	WG
DENSITE	NC	NC	NC
DATE DE RECEPTION	NC	NC	NC
N" DE LOT	NC	NC	NC
CONDITION DE STOCKAGE	15-25°C	NC	15-25°C

Les éléments d'essais ont été gérés selon la procédure 101-813 en vigueur. A la fin de l'étude, les reliquats des éléments d'essais ont été conservés pendant une période d'un an dans les archives produits de Biorizon, puis détruits, sauf mention contraire du commettant.

Les données toxicologiques des éléments d'essais conflées à Biorizon accompagnaient impérativement l'échantilion expédié. En absence de ces données, nous n'aurions pu procéder aux études prévues compte tenu des dangers potentiels encourus par le personnel de notre société.

Système d'essai

Les essais ont été conduits sur des jeunes plantes entières d'Arabidopsis thaliana Colo possédant une construction Choisissez un élément, produites in-vitro en chambre de culture. Des lots de 6 plantes ont été constitués pour l'étude de chaque modalité d'un essai. Les modalités ont été identifiées au moment des traitements en notant le numéro de la modalité sur le fond de la bolte de pétri.

A l'issu des notations, l'analyse des résultats a été réalisée sur les 5 plantes constituant le lot le plus homogène en considérant les critéres de viabilité mortalité et croissance.

Application des éléments d'essai

L'application de l'élément d'essai pour la mise en évidence de l'activation des mécanismes de défense de type Choisissez un élément, a été réalisé en une pulvérisation d'eau (témoin négatif), d'acide sallcylique (témoin positif), de Bion[®] (témoin SDN) ou Choisissez un élément, sur les rosettes des plantes 3 semaines après germination. La stratègie de l'essai est présentée Figure 1.



Le principe général de l'application de l'élément d'essai pour la démonstration de potentialisation a consisté en une puivérisation de la solution de XXX ou du témoin négatif H₂O sur les rosettes des plantes 3 semaines après germination, suivie d'une puivérisation 48h après d'eau (témoin négatif), d'acide salicylique (témoin positif), de Bion[®] (témoin SDN) ou de XXX. La stratégie de l'essai est détaillée Figure 2.



5.1. Combinaison des éléments d'essai

Les tableaux 2 et 3 (cl-dessous) présentent les modalités de traitements

Tableaux 2. Modalités de l'essal d'élicitation.

Produit	Design expérimentai	
H20	Témoin négatif totai	
SA	Témoin positif total	
XXX	Condition élicitation en 24h	
Blon®	Témoin d'elicitation SDN	

Tableaux 2. Modalités de l'essal de potentialisation.

Produit J0	Prodult J0 → 48h	Design expérimental
H ₂ O	H ₂ 0	Témoin négatif totai
H ₂ O	SA	Témoin positif total
H ₂ O	XXX	Témoin effet produit en 24h
H ₂ O	Bion®	Témoin potentialisation avec un SDI
XXX	H ₂ O	Témoin négatif potentialisation
XXX	XXX	Condition « auto » potentialisation
XXX	Bion®	Condition potentialisation

5.2. Dilutions

Les dilutions de l'élément d'essai ont été opérées dans le laboratoire. La procédure opératoire 101-803 a régit les modalités de réalisation de ces dilutions. Les solutions des éléments d'essais ont été préparées à une température de 20 à 25 °C juste avant leur application sur le végétal. Les dilutions successives sont opérées dans une eau milQ stérile à température ambiante sous hôte à flux laminaire. Le ratio dose recommandée en champ (en L ou kg/ ha) a été adapté en concentration volumique (g/l, ml/l ou Molaire) en considérant une pulvérisation en champ de 500 L/ha.

MATERIELS ET METHODES

5.3. Concentrations étudiées

Choisissez un élément. Choisissez un élément. en concentration volumique (g/l, mi/l ou Molaire) en considérant une pulvérisation en champ de 500 L/ha.

ora, remoin poon total million out roo migh do madero acur	SA.	Témoin	postif total	1mM solt	138	mg/l	de	matière	activ
--	-----	--------	--------------	----------	-----	------	----	---------	-------

Bion^e . Témoin SDN 150 mg/l de matière active

XXX . Produit testé X mi/l de produit formulé

5.4. Conditions d'application

Les applications ont été réalisées à l'aide de puivérisateurs manuels stériles.

5.5. Conditions d'incubation

Les plantes ont été récoltées 24h après leurChoisissez un élémentraitement et ont été incubées sur la nuit dans le tampon de coloration contenant le substrat de la β -glucuronidase (X-Gluc).

6. Conditions de culture

Les plantes ont été cultivées en chambre climatique (22°C, éclairement 16h/j).

7. Notations

Une note de 0 à 5 a été attribuée à chaque condition.

O correspondant à une absence d'expression Choisissez un élément., 5 à l'expression la plus forte.

Tableau 3. Echelle de notation.

	Note	Signification
	0-1	Pas d'expression du gène Choisissez un élément. / Pas d'activation de Choisissez un élément.
	2	Falble expression du gène Choisissez un élément. / Activation falble de Choisissez un élément.
3-4 Expression du gène Choisis Choisissez un élément.		Expression du gène Choisissez un élément. / Activation de Choisissez un élément.
	5	Forte expression du gène Choisissez un élément. / Activation forte de Choisissez un élément.

Figure 3. Echelle visuelle de référence des notations:

Note :	0	4	2	2	4	5
Note :	0	1	2	3	4	0

MATERIELS ET METHODES

REFULTATI

Résultats

1. ESSAIS D'Elicitation

La Figure suivante (4) présente les photographies des résultats obtenus lors de l'essai 15 51 01 Gus d'élicitation. 5 plantes ont été conservées et analysées à l'issue de l'essai.

Figure 4. Photographies des plantes de l'essai d'élicitation et note attribuée à chaque condition selon l'échelle précédemment détaillée (cf. paragraphe 7).



Le tableau 4 présente l'interprétation des résultats obtenus lors de l'essai XXX Gus d'élicitation.

Tableau 4. F	Résultat de l'In	hterprétation des photographies : essai d'élicitation.
Produit	NOCE	Signification
H20	0	Pas d'expression du gène PR1 / Pas d'activation de la SAR
SA	5	Forte expression du gène PR1 / Activation forte de la SAR
XXXX	1	Expression résiduelle du gène PR1 / Peu d'activation de la SAR
Bion	2	Faible expression du gène PR1 / Activation faible de la SAR
Dana la cas	tra da ant ca	and to YYY plinduit non notablement l'anthuition des défenses

Dans le cadre de cet essai, le XXX n'induit pas notablement l'activation des défenses des plantes de type SAR.

REFULTATI

2-Potentialisation

La Figure suivante (5) présente les photographies des résultats obtenus lors de l'essai XXX Gus de potentialisation. 5 plantes ont été conservées et analysées à l'issue de l'essai.

Figure 5. Photographies des plantes de l'essai de potentialisation et note attribuée à chaque condition selon l'échelle précédemment détaillée (cf. paragraphe 7).

Conditio	n						
	<u> J0 + 48h</u>						Note
HyO	+ H2O	Plante 1	Plante 2	Plante 3	Plante 4	Plante 5	0
H₂O	+ 8A			1	4		5
H ₂ O	- XXX	C.	Car.	54	X	A	1
H₂O	+ Bion		R	1	39	*	2
XXXX	٠H ₂ O	19	wh.	S		St.	1
XXX	+ Bion	-20	340	30	0%		4
XXXX	+ XXX	R	4	36	Se.	-	2

REJULTATS

Le tableau 5 présente l'interprétation des résultats obtenus lors de l'essai XXX Gus de potentialisation.

Tableau 5. Résultat de l'Interprétation des photographies : essai de potentialisation.				
Produit J0	Produit J0 + 48h	Note	Signification	
H2O	H20	0	Pas d'expression du gène PR1 / Pas d'activation de la SAR	
H2O	SA	5	Forte expression du gène PR1 / Activation forte de la SAR	
H2O	XXX	1	Expression résiduelle du gène PR1 / Peu d'activation de la SAR	
H2O	Bion	2	Faible expression du gène PR1 / Activation faible de la SAR	
ххх	H2O	1	Expression résiduelle du gène PR1 / Peu d'activation de la SAR	
XXX	Bion	4	Expression du gène PR1 / Activation de la SAR	
XXX	XXXX	2	Faible expression du gène PR1 / Activation faible de la SAR	

Dans le cadre de cet essal, une double puivérisation de XXX a généré une activation notable des défenses des plantes de type SAR, démontrant l'effet de potentialisation du XXX sur les plantes.

En outre, l'application de SDP synthétique (Bion®) suite à une première application de XXX conforte le rôle de potentialisateur de ce produit expérimental.

3. Conclusion

Les résultats obtenus dans le cadre d'une application unique du produit XXX, sur plantes d'A. *thallana PR1::GUS*, en conditions contrôlées *In-vitro*, démontrent que XXX n'induit pas directement l'expression du gène *PR1*, principal marqueur de l'activation de la SAR.

Par contre les résultats du test de potentialisation des défenses des plantes suggèrent que cette préparation à un effet significatif sur la préparation des mécanismes de défenses (potentialisation ou priming du gène *PR1*) et donc de la voie de défense de type SAR.

Ces résultats suggèrent qu'une double puivérisation de XXX est nécessaire pour l'activation des mécanismes de défense dans le cadre d'une utilisation in-situ.

Conclusion

L'objet de ce programme de recherche était d'évaluer l'effet Choisissez un élément. Cliquez ici pour taper du texte. comme Choisissez un élément. au niveau de la Choisissez un élément.

Cette étude a été conduite exclusivement sur un modèle expérimental sur plante entière d'Arabidopsis thaliana Col0 possédant une construction de rapporteur transcriptionnel Choisissez un élément.

La réalisation de travaux en conditions contrôlées au laboratoire, tel que ceux-ci ont permis de maîtriser l'expression de Choisissez un élément.

L'étude de XXX, utilisant les plantes d'A. thallana PR1::GUS, en conditions In-vitro contrôlée suggèrent que XXX n'élicite pas l'expression de PR1 donc l'activation de la SAR.

Cette spécialité semble en revanche avoir un effet de potentialisation des mécanismes de défenses de la plante, le gène *PR1* étant exprimé à la suite de l'application d'un second stimulus ou d'une seconde application du produit expérimental.

Annexe 7 Envellope Soleau

Cette enveloppe Soleau présente les fondements du développement d'un test immunologique utilisable en agriculture dans le cadre du développement et de l'utilisation de Stimulateurs de Défense des Plantes.

Ce test est développé en collaboration entre l'INRA Versailles (Institut Jean Pierre Bourgin) et l'entreprise Staphyt dans le cadre de la thèse CIFRE n° 2015/0633 effectuée par Camilie Verly Cette thèse est encadrée par Alla Dellagi et Loïc Rajjou au sein de l'INRA et par Marie-Emmanuelle Saint Macary et Frédéric Giraud au sein de Staphyt

I.Domaine technique

La réduction de l'usage des produits phytosanitaires conventionnels, prévue dans le plan Ecophyto 2018, se traduit par le développement de nouvelles stratégies pour des pratiques agricoles plus durables et plus respectueuses de l'environnement. Dans ce contexte, de nouvelles variétés moins dépendantes d'intrants sont destinées à apparâtre et de nouvelles pratiques associées à ces variétés sont à mettre au point. Le développement de molécules capables de stimuler les défenses naturelles des plantes (SDP) est une stratégie qui attire de plus en plus l'attention. Les SDP peuvent être d'origine naturelle ou de synthèse, mais sont soumis dans les deux cas à la règlementation en vigueur concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (Règlement CE n°1107/2009).

Cependant, bien qu'ils constituent une stratégie prometteuse en faveur d'une agriculture plus durable, l'efficacité des SDP sur le terrain reste aléatoire et il n'existe pas ou peu d'outils pour évaluer leur capacité d'activation. Ainsi, de nombreux projets de produits SDP développés en laboratoire ne peuvent aboutir à des autorisations de mise sur le marché (AMIM), par manque de moyens d'analyses et/ou en raison des résultats inexploitables des expérimentations menées en conditions naturelles. En pratique, les traitements à l'aide de SDP sont généralement positionnés en préventif et renouvelés car leur persistance d'action est limitée. Il arrive également que les plantes ne soient pas réceptives au moment du traitement (variétés, stade végétatif...). De plus, au-dela d'une certaine pression parasitaire, un traitement chimique d'appoint est recommandé (en mélange ou dissocié). Plusieurs tests en conditions semi-contrôlés ont infirmé les résultats d'études obtenus en laboratoire et ainsi plusieurs produits et molécules ont été mises au ban. Ce phénomène de discordance entre les résultats d'efficacité obtenus en conditions naturelles (plein champ). En effet, les aléas climatiques sont inévitables et la pression parasitaire est parfois très variable. Les résultats de ces essais sont alors aléatoires, difficiement exploitables et leur reproductibilité est faible. Certains produits ont néanmoins réussi à prouver leur efficacité, mais il existe une disparité importante dans les méthodes d'évaluation des produits.

L'identification de molécules SDP efficaces ainsi que de variétés hautement réceptives requiert des outils de criblage fiables, efficaces et utilisables en routine. La mise au point d'une méthode fiable de détection de l'activation des mécanismes de défense des plantes est un enjeu majeur pour évaluer ce type de produits sur le terrain dans les meilleures conditions. Cet outil s'avère indispensable à plusieurs niveaux, tant pour tester la réceptivité des plantes aux sites d'expérimentations retenus que pour le suivi de l'efficacité des produits au cours du temps.

Le but de ce projet est de mettre au point une méthode d'évaluation simple de l'activation des mécanismes de défenses des plantes. Cette invention est une méthode d'évaluation simple de l'activation des mécanismes de défenses des plantes. Il apparaît d'après la littérature, que la protéine NPR1 est une protéine clé de l'immunité de la plante. Elle est nécessaire à la mise en place de la résistance systémique acquise (SAR) et de la résistance systémique induite (ISR) qui sont des forme d'immunité qui peut durer jusqu'à plusieurs semaines voire plusieurs mois.

Nous avons décidé de choisir NPR1 comme marqueur de l'immunité en créant un kit de détection « universel » de l'activation de cette protéine. Nous avons identifié des séquences peptidiques conservées chez NPR1 à travers plusieurs espèces cultivées et chez Arabidopsis thaliana. La protéine NPR1 se trouve sous forme monomérique ou oligomérique. La littérature indique que le niveau de concentration du monomère est totalement corrélé avec son activité. Notre projet consiste à mettre au point un test immunologique basé sur des anticorps spécifiques de la forme monomérique et capables de reconnaître les peptides conservés chez plusieurs espèces accessibles uniquement sous cette forme monomérique.

Ce test pourra alors être utilisé :

- Pour faire du crible de molécules potentiellement SDP au laboratoire ou au champ.
- Pour vérifier l'activation des défenses au champ suite à l'application de SDP (dans le cadre d'essai agronomiques ou bien par l'agriculteur dans le cas d'une utilisation industrielle de ces produits)
Pour montrer l'activation des d
éfenses par un produit comme demand
é dans le cadre de la m
éthode de la Commission des essais biologiques (CEB) sur les « principes g
én
éraux d'exp
érimentation des stimulateurs des d
éfenses des plantes » (m
éthode g
én
érale MG 14) en avai de l'homologation et la mise sur le march
é du produit.

II.Art antérieur

A l'heure actuelle il existe différentes méthodes de détection de l'activation des défenses des plantes par les SDP :

Un émetteur / récepteur optique, développé par la société Force A et appelé Multiplex® permet le "dosage" de molécules, type anthocyanes, flavonols, etc. Cet outil portatif permet l'acquisition rapide et importante de données, facilement utilisables. De plus, les mesures non destructives permettent la réalisation de plusieurs mesures sur le même organe, apportant ainsi des informations sur l'évolution temporelle des réponses. Cependant, les marqueurs dosés sont peu spécifiques. Il s'agit composés du métabolisme secondaire propres à chaque variété de plantes qui ont des rôles très divers au niveau de la physiologie et du développement de ces plantes.

Il existe également un nouvel outil de diagnostic moléculaire développé par l'INRA d'Angers, appelé "qPFD" (Puce à Faible Densité Quantitative : RT-PCR quantitative en microplaque / puce à ADN de faible densité) qui permet d'évaluer des gènes cibles dont l'expression, seule ou en combinaison, renseigne sur l'état de stimulation des défenses naturelles des plantes. A ce jour, seule une puce sur Pommier est disponible et le coût d'analyse est bien trop onéreux pour une éventuelle utilisation de recherche de stimulation des défenses des plantes en conditions naturelles.

A ce jour, aucune technique immunologique de détection / quantification simple, spécifique, rapide et bon marché pour l'expérimentation « terrain » n'est disponible au vu de la littérature scientifique et/ou connu des professionnels de l'expérimentation.

III.Problème posé

Le but de ce projet est de mettre au point une méthode immunologique d'évaluation simple de l'activation des mécanismes de défenses des plantes. Ce test immunologique sera basé sur des anticorps spécifiques de la forme monomérique de la protéine NPR1 et ce chez différentes espèces de plantes (plantes modèles et plantes cultivées)

Nous avons donc développés différents anticorps (monaux ou poly clonaux) capables de détecter uniquement la forme active de la protéine NPR1 (figure 1). Pour cela nous avons identifié la partie de la protéine « cachée » ou inaccessible sous sa forme oligomérique inactive et avons effectué un alignement des séquences de cette protéine pour plusieurs espèces végétales et avons créé une squence consensus à partir de cet alignement (Annexe 1).



Protéine NPR1 : NPR1
Anticorps :

Flaure 1 : principe du test

IV.Solution technique

Afin de créer des anticorps spécifique de la forme active de NPR1 deux stratégies sont utilisées (Figure 2) :

- Une stratégie est basée sur la création de peptides synthétiques dégénéré consensus fondés sur l'alignement des différentes versions de NPR1 correspondant à différentes espèces de plantes et plus précisément sur la partie cachée de cette protéine. Ces peptides sont créés à partir de parties les plus conservées de cette partie cachée qui ne se retrouvent pas dans d'autres protéines du règne végétal.
- La deuxième stratégie est basée sur la création de protéines recombinantes à partir de la séquence de NPR1 chez A. thaliana. Des constructions permettant la surproduction de différentes partie de cette protéine sont inclue dans E. coll avec tous les éléments permettant de produire ces différentes partie en grande quantité et de les purifier.
 Ces différents peptides ou protéines sont injectés chez l'animal (lapin ou autre) afin de produire

Ces différents peptides ou protéines sont injectés chez l'animai (lapin ou autre) afin de produire des anticorps capables de les détecter spécifiquement.

Ces anticorps pourront aiors être utilisés de différentes manières pour obtenir un test flable capable de détecter l'activation des défenses chez les plantes (techniques de blochimie classiques : Western blot, ELISA...).



Figure 2 : Schéma montrant les deux stratégies en fonction de l'alignement des séguences des peptides ou des protéines recombinantes

V.Meilleure manière de réaliser l'Invention

Après avoir initié le projet, il apparait que la méthode la plus simple pour obtenir les anticorps d'intérêt est la méthode utilisant des peptides synthétiques dégénérés consensus. En effet, cette méthode permet d'obtenir des anticorps qui sont bien spécifiques de la forme active de NPR1, qui ne détectent donc ni la forme inactive de NPR1 ni d'autre protéine. De plus ces anticorps sont capables de détecter cette forme active et donc l'activation des défenses chez un grand nombre de plantes (espèces modèles et d'intérêt agronomique)

La stratégie de production d'anticorps à partir de protéines recombinantes est plus compliquée à mettre en place (en termes de temps et de manipulation techniques) mais permet de valider le test chez une espèce modèle bien connue (*A. thallana*) et de détecter les deux formes de la protéine (active ou inactive) en fonction de la construction utilisée. De par la forte homologie de séquence entre les différentes espèces de plante pour la partie cachée de NPR1, II est possible que cette stratégie permette d'obtenir des anticorps détectant l'activation des défenses chez d'autres espèces et plus particulièrement chez des plantes d'intérêt agronomique.

VI.Variantes de réalisation

Dans le cas où aucune des deux stratégies ne permette d'obtenir des résultats exploitables industriellement d'autres stratégies pourront être envisagées : En effet si les anticorps obtenus ne permettent pas de détecter l'activation des défenses chez certaines plantes d'intérêt agronomique, il sera possible de créer des anticorps spécifiques de cette espèce à partir de sa séquence la partie cachée de NPR1. Ces anticorps seront toujours créés à partir soit de peptides synthétiques, soit de protéines recombinantes.

VII.Avantages de l'Invention

Le développement de molécules SDP efficaces ainsi que l'identification de variétés hautement réceptives requiert des outils de criblage fiables, efficaces et utilisables en routine. La mise au point d'une méthode fiable de détection de l'activation des mécanismes de défense des plantes est donc un enjeu majeur pour évaluer ce type de produits sur le terrain dans les meilleures conditions. Cet outil s'avère indispensable à plusieurs niveaux, tant pour tester la réceptivité des plantes aux sites d'expérimentations retenus que pour le suivi de l'efficacité des produits au cours du temps.

Les avantages de cette méthode vis-à-vis de celles existantes sont :

- son faible coût lui permettra d'être utilisé par l'agriculteur ainsi que l'expérimentateur pour vérifier que la pulvérisation du SDP utilisé ou du produit testé a bien activé les défenses en champ ou au laboratoire
- le fait qu'un anticorps peut être utilisé de manière simple intégré à un kit utilisable en terrain
- la protéine ciblée est impliquée dans les deux voies de défenses connues et permet donc de détecter l'activation de l'une ou l'autre des voies de défenses avec le même outil
- le fait qu'elle permette la détection de l'activation des défenses chez un grand nombre de plantes
- le fait qu'elle réponde à l'une des exigences du CEB de validation des SDP car elle montre l'activation des défenses au niveau protéique





Annexe 8 Brevet en cours de dépôt : Anticorps dirige contre la forme active de NPR1 et ses applications dans le cadre du developpement et de l'utilisation des stimulateurs de defense des plantes ABREGE

L'abrégé est un résumé de l'invention. Il comporte 250 mots au maximum et 150 mots seulement s'il est accompagné d'une figure Il est constitué des éléments suivants :

• le titre de l'invention et son domaine technique ;

• un résumé concis des caractéristiques techniques essentielles déjà exposées dans la description et les revendications,

accompagnées éventuellement des numéros de référence à la figure, et en rappelant si possible **le problème technique posé et la** solution apportée par l'invention ;

• l'indication de l'utilisation ou des utilisations principales de l'invention.

Anticorps dirigé contre la forme active de NPR1 et ses applications dans le cadre du développement et de l'utilisation des stimulateurs de défense des plantes (SDP).

L'invention concerne la méthode d'obtention d'anticorps permettant de montrer l'activation des défenses chez les plantes notamment par l'utilisation de SDP.

A ce jour, aucune technique immunologique de détection / quantification simple, spécifique, rapide et bon marché pour l'expérimentation « terrain » n'est disponible au vu de la littérature scientifique et/ou connu des professionnels de l'expérimentation. Une stratégie d'immunisation particulière permettant l'obtention d'anticorps spécifiques d'une forme active de la protéine NPR1 a été développée. Cette forme active peut être reconnue et hybridée par des anticorps spécifiquement développés pour cibler la partie inaccessible de cette protéine sous sa forme inactive. Cette approche présente l'avantage de montrer l'activation des défenses des plantes quelle que soit la voie hormonale mise en œuvre, et ce, sur différentes espèces végétales, de manière simple et bon marché.

Le dispositif selon l'invention est particulièrement destiné au crible ou à la validation de substances SDP, ou à permettre une amélioration de leur conditions d'utilisation (génotype de la plante, conditions environnementale, aide à la décision...). Il permet de montrer de manière simple l'activation des défenses naturelles des plantes et peut aussi être utilisé dans le cadre de la recherche fondamentale.

REVENDICATIONS

Il s'agit d'un texte destiné à définir précisément la protection que vous recherchez. Ce texte se fonde sur la description. Les revendications doivent énoncer les caractéristiques techniques constitutives de l'invention à protéger, avec leur numéro de référence. Elles sont de deux sortes : les revendications indépendantes et les revendications dépendantes.

• La simple énumération des avantages et des résultats obtenus par l'invention ne peut pas faire l'objet de revendications. Ils doivent être liés à des caractéristiques techniques.

• Les revendications ne peuvent pas apporter plus de précisions que n'en contient la description.

Le texte des revendications commence en haut de la page qui suit la dernière page de description. L'indication « revendications » peut être portée en haut de la première page des revendications, de façon centrée en dessous de la marge.

S'il existe plusieurs revendications, elles doivent être numérotées de façon continue, en chiffres arabes.

Les différentes revendications et leur structure sont identifiées sur l'exemple en page suivante.

ATTENTION

• Si vous déposez plus de 10 revendications, vous devez acquitter au moment du dépôt une redevance pour chaque revendication supplémentaire (voir p. 27).

• Les appellations de fantaisie, marques ou déclarations dénigrantes à l'égard de quiconque sont interdites.

• Les dessins ne doivent pas figurer dans le texte, mais sont à réaliser à part

- Dispositif immunologique permettant la détection de l'activation des défenses des plantes caractérisé par sa capacité à détecter cette activation chez différentes espèces de plante en se basant sur une séquence consensus et sur les séquences de la protéine NPR1 chez différentes plantes.
- Dispositif selon la revendication 1 caractérisé par la conception d'anticorps à partir de peptides synthétiques construits en se basant sur les séquences de la partie inaccessible de NPR1 sous sa forme oligomérique.
- Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé par l'utilisation de peptides dégénérés correspondant aux séquences de différentes espèces végétale.

ANTICORPS DIRIGE CONTRE LA FORME ACTIVE DE NPR1 ET SES APPLICATIONS DANS LE CADRE DU DEVELOPPEMENT ET DE L'UTILISATION DES STIMULATEURS DE DEFENSE DES PLANTES

DESCRIPTION

Il s'agit d'un texte décrivant ce qu'est votre invention. Il sert de base à la rédaction d'une autre partie de la demande de brevet : les revendications (voir p. 8). Sa longueur n'est pas limitée, mais sa rédaction demande une attention toute particulière puisqu'il sera impossible de la modifier après le dépôt.

Attention : chaque mot compte ! La description doit être suffisante pour qu'un « homme du métier » puisse réaliser l'invention. Elle doit aussi être complète, c'est-à-dire présenter tous les moyens techniques à mettre en oeuvre.

DOMAINE TECHNIQUE

l'indication du « domaine technique » de l'invention

La réduction de l'usage des produits phytosanitaires conventionnels, prévue dans le plan Ecophyto 2025, se traduit par le développement de nouvelles stratégies pour des pratiques agricoles plus durables et plus respectueuses de l'environnement. Dans ce contexte, de nouvelles variétés moins dépendantes d'intrants sont destinées à apparaître et de nouvelles pratiques associées à ces variétés sont à mettre au point. Le développement de molécules capables de stimuler les défenses naturelles des plantes (SDP) est une stratégie qui attire de plus en plus l'attention. Les SDP peuvent être d'origine naturelle ou de synthèse, mais sont soumis dans les deux cas à la règlementation en vigueur concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (Règlement CE n°1107/2009).

Cependant, bien qu'ils constituent une stratégie prometteuse en faveur d'une agriculture plus durable, l'efficacité des SDP sur le terrain reste aléatoire et il n'existe pas ou peu d'outils pour évaluer leur capacité d'activation. Ainsi, de nombreux projets de produits SDP développés en laboratoire ne peuvent aboutir à des autorisations de mise sur le marché (AMM), par manque de moyens d'analyses et/ou en raison des résultats inexploitables des expérimentations menées en conditions naturelles. En pratique, les traitements à l'aide de SDP sont généralement positionnés en préventif et renouvelés car leur persistance d'action est limitée. Il arrive également que les plantes ne soient pas réceptives au moment du traitement (variétés, stade végétatif...). De plus, au-delà d'une certaine pression parasitaire, un traitement chimique d'appoint est recommandé (en mélange ou dissocié). Plusieurs tests en conditions semi-contrôlées ont infirmé les résultats d'études obtenus en laboratoire et ainsi plusieurs produits et molécules ont été mises au ban. Ce phénomène de discordance entre les résultats d'efficacité obtenus en conditions plus ou moins contrôlées (phytotron vs serre) est encore plus flagrant lorsque les essais se font en conditions naturelles (plein champ). En effet, les aléas climatiques sont inévitables et la pression parasitaire est parfois très variable. Les résultats de ces essais sont alors aléatoires, difficilement exploitables et leur reproductibilité est faible. Certains produits ont néanmoins réussi à prouver leur efficacité, mais il existe une disparité importante dans les méthodes d'évaluation des produits.

L'identification de molécules SDP efficaces ainsi que de variétés hautement réceptives requiert des outils de criblage fiables, efficaces et utilisables en routine. La mise au point d'une méthode fiable de détection de l'activation des mécanismes de défense des plantes est un enjeu majeur pour évaluer ce type de produits sur le terrain dans les meilleures conditions. Cet outil s'avère indispensable à plusieurs niveaux,

223

Thèse de doctorat Université Paris Saclay 2019

tant pour tester la réceptivité des plantes aux sites d'expérimentations retenus que pour le suivi de l'efficacité des produits au cours du temps.

Cette invention est un test immunologique qui permet d'évaluer simplement l'activation des mécanismes de défenses des plantes.

Ce test permet :

- de faire du crible de molécules potentiellement SDP au laboratoire afin de permettre l'émergence de nouvelles substance actives à activité SDP ;

- de démontrer l'activation des défenses suite à l'application d'un produit comme demandé dans le cadre de la méthode de la Commission des essais biologiques (CEB) sur les « principes généraux d'expérimentation des stimulateurs des défenses des plantes » (méthode générale MG 14), nécessaire au processus d'homologation et réglementant la mise en marché du produit ;

- de vérifier l'activation des défenses *in situ* (serre ou champ) suite à l'application de SDP ainsi que d'effectuer un suivi de cette activation au cours du temps, dans le cadre d'essais agronomiques ou bien par l'agriculteur dans le cas d'une utilisation agricole de ces produits ;

- de sélectionner des variétés hautement réceptives aux SDP, dans le cadre de la sélection variétale ou bien afin d'optimiser les couples variété de plante/SDP ;

- de mesurer l'activation des mécanismes de défenses des plantes au champ avant traitement pour faciliter l'aide à la décision et le positionnement des SDPs en fonction de la réactivité des plantes ciblées ;

- de montrer l'activation des défenses de manière simple dans le cadre de la recherche fondamentale.

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

l'indication de « l'état de la technique antérieure » faisant ressortir le problème technique posé ;

A l'heure actuelle il existe différentes méthodes de détection de l'activation des défenses des plantes par les SDP :

Un émetteur / récepteur optique, développé par la société Force A et appelé Multiplex[®] permet le "dosage" de molécules, type anthocyanes, flavonols, etc. Cet outil portatif permet l'acquisition rapide de données, facilement utilisables. De plus, les mesures non destructives permettent la réalisation de plusieurs mesures sur le même organe, apportant ainsi des informations sur l'évolution temporelle des réponses. Cependant, les marqueurs dosés sont peu spécifiques. Il s'agit composés du métabolisme secondaire propres à chaque variété de plantes qui ont des rôles très divers au niveau de la physiologie et du développement de ces plantes.

Il existe également un outil de diagnostic moléculaire développé par l'INRA d'Angers, appelé "qPFD" (Puce à Faible Densité Quantitative : RT-PCR quantitative en microplaque / puce à ADN de faible densité) qui permet d'évaluer des gènes cibles dont l'expression, seule ou en combinaison, renseigne sur l'état de stimulation des défenses naturelles des plantes (brevet INRA WO 2011/161388). Cette méthode est proposée dans un cadre commercial par la société Vegenov. A ce jour, une puce est disponible pour le

224

pommier, la tomate, la pomme de terre, la vigne et le blé et le coût d'analyse est bien trop onéreux pour une éventuelle utilisation de recherche de stimulation des défenses des plantes en conditions naturelles.

Une méthode de criblage de produits potentiellement éliciteurs (GUSTAVE pour GUS Technology for Analysis and Validate plant Elicitor), a aussi été développé par les inventeurs de cette invention. Cette méthode est proposée dans un cadre commercial par l'entreprise Staphyt. Le principe de ce test est d'utiliser des plantes exprimant un gène rapporteur codant une β-glucuronidase, le gène *GUS*. Celui-ci a été fusionné au promoteur de gènes connu pour être des marqueurs des deux principales voies de défense. Des plantes d'Arabidopsis transgéniques possédant une construction *promoteur gènes marqueurs::GUS* sont donc utilisées. Lorsque le substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium) est apporté à la plante, l'enzyme GUS va cliver ce substrat et produire un précipité bleu insoluble). Une coloration bleue apparaît alors si le gène marqueur est exprimé, permettant ainsi une localisation spatiale de la mise en place des défenses. L'utilisation de ce test permet de manière rapide de cribler des SDP qui sont capables d'activer les défenses en visualisant facilement l'expression de gènes marqueur représentant l'une ou l'autre des deux principales voies de défenses connues. Il est ainsi facile de constater si le produit est capable d'activer les défenses des plantes mais aussi de savoir quel type de défense est activé.

Des tests de protections sont aussi proposés par de multiples entreprises. Ces tests permettent d'observer en condition contrôlée ou au terrain l'efficacité d'un SDP en terme de protection vis-à-vis de pathogènes. Ces tests permettent donc de montrer l'efficacité d'un SDP mais ne montrent aucunement l'activation des défenses par ce produit.

A ce jour, aucune technique immunologique de détection / quantification simple, spécifique, rapide et bon marché pour l'expérimentation « terrain » n'est disponible au vu de la littérature scientifique et/ou connu des professionnels de l'expérimentation.

LISTE DES ABREVIATIONS

Un certain nombre d'abréviations est utilisé dans la description ci-dessous. Elles correspondent la plupart du temps à des termes en anglais car c'est la langue utilisé couramment en laboratoire.

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire AMM : Autorisations de Mise sur le Marché ARN : Acide RiboNucléique BSA : Sérum Albumine Bovine CEB : Commission des Essais Biologiques DEPC : DiEthyl PyroCarbonate DMSO : DiMéthylSulfOxyde dNTP : mélange des quatre désoxyribonucléotides

- DTT : DiThioThréitol
- EDTA : ÉthylèneDiamineTétraAcétique
- Et : Ethylène
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- GUS : ß-glucuronidase
- His : Histidine
- HRP : HorseRadish Peroxidase
- IP : ImmunoPrécipitation
- IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
- ISR : Résistance Systémique Induite
- JA : Acide Jasmonique
- kDa : Kilo Daltons
- LOX2 : LipOXygenase 2
- Me-JA : Methyl-Jasmonate
- NPR1 : Non expressor of Pathogenesis Related protein 1
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PBST : Tampon Phosphate Tween 0,1%
- PR1 : Pathogenesis Related protein 1
- PVFD : PolyVinylidene DiFluoride
- q-RT-PCR : Retro Rranscriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction
- **RT** : Transcription Inverse
- SDP : Stimulateur des Défenses naturelles des Plantes
- SA : Acide Salicylique
- SAR : Résistance Systémique Acquise
- TA : Température Ambiante
- WB : Western Blot

EXPOSE DE L'INVENTION

Un exposé de l'invention permettant la compréhension de la solution technique apportée au problème technique posé. Cet exposé doit donc mentionner toutes les caractéristiques techniques propres à l'invention et, en particulier, celles qui seront énoncées dans les revendications ;

La présente invention permet de résoudre les problèmes techniques tels que précédemment définis et d'atteindre le but que se sont fixé les inventeurs.

Il apparaît d'après la littérature, que la protéine NPR1 est une protéine clé de l'immunité de la plante. Elle est nécessaire à la mise en place de la résistance systémique acquise (SAR) impliquant la phytohormone acide salicylique (SA) et de la résistance systémique induite (ISR) impliquant le couple de phytohormones acide jasmonique/éthylène (JA/ET) qui sont des forme d'immunité qui peut durer jusqu'à plusieurs semaines voire plusieurs mois. Les inventeurs ont donc développé et utilisé une stratégie d'immunisation particulière permettant l'obtention d'anticorps spécifiques d'une forme active de NPR1. Cette approche présente l'avantage de montrer l'activation des défenses des plantes quelle que soit la voie hormonale mise en œuvre, et ce, sur différentes espèces végétales.

NPR1 a donc été choisi comme marqueur de l'immunité pour créer un kit de détection multi-spécifique à large spectre de l'activation des défenses. La protéine NPR1 se trouve sous forme monomérique ou oligomérique dans la cellule végétale. La littérature indique que le niveau de concentration du monomère est corrélé avec son activité. Cette invention est basée sur des anticorps spécifiques de la forme monomérique de NPR1 et capables de reconnaître cette forme active chez plusieurs espèces végétales.

Un alignement des séquences de cette protéine provenant de plusieurs espèces végétales (betterave, luzerne, coton, cacao, tomate, pomme de terre, ricin, piment, peuplier, tabac, patate douce, papaye, vigne, moutarde brune, colza, pommier...) ainsi que celle d'*Arabidopsis thaliana* a été effectué. Une séquence consensus potentielle a alors été identifiée, à partir de cet alignement multiple. La partie « cachée » de cette protéine, correspondant à une partie inaccessible sous sa forme oligomérique inactive, a également été identifiée (entre la cystéine 82 et la cystéine 216 pour la séquence d'*A. thaliana*) par bio-informatique. Deux séquences peptidiques consensus ciblant la forme active de la protéine NPR1 ont ainsi pu être proposées.

Des peptides dégénérés consensus fondés sur l'alignement des différentes protéines NPR1 des principales espèces de plantes d'intérêt agronomique ont alors été synthétisés (GENEPEP SA, 12 rue du Fer à Cheval, 34430, St-Jean-de-Védas, FRANCE).

Ces peptides ont ensuite été injectés chez le lapin (GENEPEP SA) afin de produire des anticorps (antipeptides). Les antipeptides produits ont ainsi pour cible la forme active de la protéine NPR1 de différentes espèces de plantes, et peuvent être utilisés pour valider l'activation des défenses de ces plantes d'intérêt après application d'un SDP. Le test, permettant de valider cette activation des défenses via la reconnaissance par anticorps, est un test immunologique, tel que le Western blot (WB), le test ELISA (Enzyme Link ImmunoSorbent Assay) ou même en test bandelette de type LFD (Lateral Flow Device ou Lateral Flow Immunchromatograhic Assay).

Par cette stratégie, les inventeurs ont pu sélectionner différents anticorps dirigés contre cette forme active de NPR1. Les anticorps selon la présente invention permettent, de plus, de détecter les défenses des plantes mises en place selon la voie impliquant le SA mais aussi celles impliquant la voies du JA/ET.

La présente invention concerne donc la méthode permettant l'obtention d'anticorps dirigés contre une forme active de NPR1 présente chez différentes espèces végétales.

Avant d'entrer plus en détail dans la description de l'invention, les notions suivantes sont décrites. Les termes « anticorps » et « immunoglobuline » sont équivalents et peuvent être utilisés de façon interchangeable dans la présente invention. Le terme antipeptide quand à lui, est utilisé afin de préciser

227

Thèse de doctorat Université Paris Saclay 2019

qu'il s'agit des anticorps créés avec la présente stratégie en utilisant des peptides dégénérés consensus. Ces antipeptides sont de type polyclonaux mais la stratégie mise en œuvre pourrait aussi bien être réalisée à l'aide des anticorps monoclonaux.

Un **peptide** est un polymère d'acides aminés constitué d'un faible nombre d'acides aminés (de deux à quelques dizaines). Un peptide peut être synthétisé artificiellement ou issu de la dégradation ou du clivage d'une protéine. Dans la présente invention, des peptides synthétiques servent d'antigène afin d'immuniser des lapins et de produire les anticorps. Ces peptides sont dits dégénérés car deux acides aminés de leur séquence sont variables, et consensus car les différentes séquences ainsi créées correspondent aux séquences de NPR1 conservées chez différentes espèces végétales. Il sera aussi question de peptides issus du clivage de NPR1 dans la partie traitant du séquençage de la protéine détectée. En effet afin de séquencer une protéine, celle-ci est d'abords digérée à l'aide de trypsine. Ce sont les peptides obtenus qui sont ensuite séquencés et permettent par analogie à des séquences présentes dans une banque de données, de déterminer la protéine recherchée.

Des substances comme des protéines, des nucléoprotéines, des polysaccharides [, des peptides] et certains glycolipides qui induisent une réaction immunitaire et qui réagissent avec les produits de ces réponses sont appelés **antigènes** (pour générateur d'anticorps) [...] Chaque antigène peut avoir plusieurs déterminants antigènique ou épitopes. Les épitopes sont les régions de l'antigène qui se lient au site de fixation de l'antigène sur un anticorps spécifique (selon Microbiology, L. Prescott 2002).

Un **anticorps** ou immunoglobuline est une glycoprotéine synthétisée en réponse à un antigène, capable de reconnaitre et de fixer l'antigène responsable de sa production. [...] Toutes les molécules d'immunoglobuline ont une structure de base faite de quatre chaines polypeptidiques reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne légère est constituée d'environ 220 acides aminés et possède une masse moléculaire d'environ 25 kilodaltons (kDa). Chaque chaîne lourde est constituée d'environ 400 acides aminés et possède une masse moléculaire de 50 à 70 kDa. Pour chaque classe, ou sous classe d'immunoglobulines, les chaînes lourdes sont structurellement distinctes. Les chaînes lourdes comme les chaînes légères contiennent deux régions différentes. Les régions constantes (C_L et C_H) ont des séquences d'acides aminés qui ne varient pas de façon significatives entre les anticorps d'une même classe. Les régions variables (V_L et V_H) des anticorps possèdent des séquences différentes. Repliées ensemble, les régions variables (V_L et V_H) forment le site de fixation de l'anticorps (selon Microbiology, L. Prescott 2002).

Une **protéine recombinante** est une protéine produite par une cellule dont le matériel génétique a été modifié dans ce but. Ainsi dans le cas de cette invention, la protéine NPR1 d'A. *thaliana*, et différentes sous parties de cette protéine, ont été produites dans la bactérie *Escherichia coli*. Pour cela, différentes séquences d'ADN correspondant à différentes portions de la séquence codant pour NPR1 ont été clonées dans un vecteur permettant d'induire l'expression de cette séquence d'ADN et donc sa traduction en protéine. Ces protéines peuvent alors être produites en quantité afin d'être purifiées.

DESCRIPTION DES FIGURES

Une brève présentation des différentes figures constituant les dessins, s'il en existe ;

La figure 1 représente la position des deux peptides dégénérés consensus utilisés pour produire les anticorps décrits dans la partie modes de réalisation I.1 sur la protéine NPR1 consensus de différentes espèces végétales. L'antipeptide 0 (antipep0) a été produit à l'aide du peptide 0 dégénéré SEQ ID NO 1-2-3-4-5, l'antipeptide 1 (antipep1) a lui été produit à l'aide du peptide 1 dégénéré SEQ ID NO 6-7-8-9-10.

La figure 2 représente les protéines recombinantes (prot T, P et I) utilisées dans la partie modes de réalisation I.6 a) et b) en fonction de leurs positions par rapport à la protéine NPR1 d'A. thaliana.

La figure 3 est un western blot effectué à l'aide de l'antipeptide0 sur extraits de plante d'A. thaliana dont les défenses ont été activées à l'aide de Blon[®] (1) ou de SA (2) ou non activées en utilisant de l'eau (3). Une bande de 37kDa n'est détectée (1 et 2) que lorsque les défenses sont activées et cette bande n'est pas détectée lorsque les défenses ne sont pas activées (3).

La figure 4 montre des westerns blots effectués par hybridation des différentes protéines recombinantes avec l'anti corps anti-étiquette histidine (1 ; 3 et 5) et avec l'antipep0 (2 ; 4 et 6). Une bande correspondant à la prot P est détectée avec les deux anticorps (1 et 2). Des bandes de même taille correspondant à la prot P (2 et 3) ainsi qu'à la prot I (4 et 6) sont aussi hybridées par ces mêmes anticorps sur les extraits protéiques correspondants. Les mêmes bandes sont donc détectées avec ces deux anticorps lorsque différentes formes de protéines recombinantes possédant une étiquette histidine sont utilisées.

La figure 5 correspond à des westerns blots effectués par hybridation d'extraits d'*A. thaliana,* traitées ou non avec différents activateurs de défense, avec l'anticorps anti-NPR1 commercial (1 ; 3 et 5) ainsi que par l'antipep0 (2 ; 4 et 6). Les défenses impliquant la voie du JA/ET sont activées à l'aide de Methyl-Jasmonate (Me-JA), celles impliquant la voie du SA sont activées à l'aide de SA. Afin d'obtenir un témoin négatif de l'activation des défenses, des plantes traitées à l'eau sont utilisées. Il est montré que la même bande est retrouvées quel que soit l'anticorps utilisé et ce que les défenses soit activées à l'aide de Me-JA (3 et 4) ou à l'aide de SA (5 et 6). Cette bande n'est pas retrouvée (ou avec une très faible intensité lorsque les plantes ont été traitées avec de l'eau (1 et 2). Ces différences d'intensités ne sont pas due à la quantité de protéines chargées comme le montre les profils protéiques correspondants (7 et 8) obtenus par coloration au bleu de Coomassie.

La figure 6 représente 2 westerns effectués par hybridation d'extraits d'*A. thaliana,* traitées ou non avec différents activateurs de défense, avec les différents antipeptides décrits dans la partie Mode de réalisation I.1 et II.2 sur des protéines d'*A. thaliana* dont les défenses ont été activées à l'aide de SA. La même bande est retrouvée à 37kDa (1 et 2) quel que soit l'antipeptide utilisé.

La figure 7 montre les westerns blots effectués par hybridation des éluats d'immunoprécipitation (IP) avec l'antipeptide0. Les anticorps utilisés lors de l'IP (antipep0 et anticorps commercial) sont décrochés lors

Thèse de doctorat Université Paris Saclay 2019

de l'élution et sont donc détectés (1 ; 2 et 3). Ces anticorps ont permis d'immunoprécipiter la protéine de 37kDa lorsque des extraits d'*A.thaliana* dont les défenses ont été activées à l'aide de SA sont utilisés (4 et 6). L'antipep0 est aussi capable d'immunoprécipiter la protP (5), par contre l'anticorps commercial ne le permet pas comme le montre l'absence de bande à la taille attendue (7).

La figure 8 montre le niveau d'expression d'un gène marqueur des défenses (*PR5*) de différents échantillons mesuré en qPCR (1 ; 2 ; 3 et 4) ainsi que l'intensité de la bande de 37kDa détectée en western blot sur ces mêmes échantillons (5 ; 6 ; 7 et 8). La quantité de protéines déposée n'explique pas la différence d'intensité de ces bandes comme le montre la coloration au bleu de Coomassie effectuée sur la membrane (9). Le niveau d'activation des défenses mesuré en qPCR est corrélé à l'intensité de la bande retrouvée en western blot.

La figure 9 présente un western blot effectué par hybridation d'extraits de tomate, dont les défenses ont été stimulées ou non par pulvérisation de SA, de Me-JA ou d'eau, avec l'antipep0. Une bande est détectée autour de 40kDa avec une plus forte intensité sur les extraits de plantes traitées à l'aide de SA (2) et de Me-JA (3) que sur les plantes traitées à l'eau (1). La quantité de protéine déposée n'explique pas la différence d'intensité de ces bandes comme le montre la coloration au bleu de Coomassie effectuée sur la membrane (4).

MODES DE REALISATION

Un exposé détaillé **d'au moins un mode de réalisation** de l'invention, qui précise la structure des différentes caractéristiques ou parties constituant l'invention, ainsi que leur agencement et leur fonctionnement. Si des figures sont utilisées pour illustrer la description, vous devez associer au texte chaque numéro de référence porté sur ces figures ;

I. Matériel et méthodes.

I.1 immunisation

La production des peptides dégénérés consensus et des anticorps a été effectuée par l'entreprise GENEPEP. Pour cela ils ont, en premier lieu, synthétisé les deux peptides de séquence définie par les inventeurs Figure1 et SEQ ID NO 1-2-3-4-5-6-7-8-9 & 10, puis ils les ont utilisé comme agent immunogène afin d'induire une réaction immunitaire dirigée contre ces antipeptides chez le lapin. Pour cela ils ont injecté ces 2 antipeptides dans 2 lapins chacun et ce à 5 reprises au cours de la vie des lapins. La totalité de leur sang a ensuite été prélevée afin d'en extraire le sérum contenant les anticorps reconnaissant les peptides injectés.

1.2 Purification et concentration des antipeptides

Le sérum de lapin obtenu est utilisé pour purifier les antipeptides spécifiques de la forme active de NPR1, suivant la méthode suivante.

50µl de solution de peptide synthétique à 0.5mg/ml sont déposés sur une membrane de Polyvinylidene difluoride (PVFD) de 1.5 x5cm préalablement activée 10min dans l'éthanol absolu puis séchée. Cette membrane est ensuite transférée dans un tube à hémolyse puis saturée à l'aide de 1ml de tampon phosphate tween 0,1% (PBST) + 5% lait (lait en poudre Régilait[®] écrémé) en agitation durant 1h à 4°C. Un millilitre de sérum y est ajouté avant incubation en agitation sur la nuit à 4°C. La membrane et alors lavée 4 fois avec 2ml de PBST en agitation 15min à 4°C. Les antipeptides sont ensuite élués par choc acide (1ml de 50mM glycine, 500mM NaCl, 0.1%Tween 20, 1% BSA, pH 3) durant 1min en agitation à 4°C. L'éluat de 1ml est récupéré et neutralisé avec 100µl de Tris Base 1M. Cette élution est répétée 5 fois, et les éluats 2 et 3 (les plus concentrés en antipeptide) sont récupérés pour être concentrés.

Cette opération est effectuée sur 10 membranes en parallèle et chaque membrane est utilisée 2 fois. 10ml de solution d'antipeptide sont donc obtenus pour les deux éluats d'intérêt. Deux fois 4 ml de chaque solution sont concentrés par ultrafiltration à l'aide du système d'ultafiltration amicon 10kDa (10 000 rpm, 10min, 4°C) Entre 500 et 600µl de solution d'antipeptide concentrés sont ainsi produits pour chaque éluat.

I.3 Extraction des protéines de plante

1.3 a) Extraction des protéines d'A. thaliana

Des plantes d'A. thaliana sont cultivées en terre durant 3 semaines en chambre de culture jour long (18h de lumières 60% d'hygrométrie, 21°C le jour et 19°C la nuit) puis sont pulvérisées avec de l'eau (témoin négatif) du Bion® 0.015% ou du SA 1mM (témoin d'activation de la voie du SA) ou bien à l'aide de Me-JA 0.1mM dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 0.1% (témoin d'activation de la voie JA). Les parties aériennes des plantes sont alors récoltées 48h après pulvérisation et broyées dans l'azote liquide. Les protéines totales de ces plantes sont alors extraites à raison de 1µl de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7,5 50mM, NaCl 150mM, MgCl 10mM, EDTA 5mM, glycerol 10% Iodoacétamide 4%, antiprotéase 1X (cOmplete[™], Mini, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail, ROCHE)) par mg de poudre congelée. Les échantillons sont décongelés dans le tampon en vortexant régulièrement puis centrifugés (10min, 14 000g, 4°C). Le surnageant est de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Les surnageants finaux sont récupérés et constituent les extraits protéiques de plante utilisés pour les différentes expérimentations.

1.3 b) Extraction des protéines d'autre plantes

Des plantes de tomate ont été cultivées en serre durant 4 semaines avant d'être pulvérisées avec du SA, du Me-JA ou de l'eau afin d'activer ou non leurs défenses. Les parties aériennes de ces plantes sont récoltées 48h après puis réduites en poudre dans l'azote liquide et utilisées pour en extraire les protéines.

Les protéines totales de ces plantes sont alors extraites à raison de 2µl de tampon d'extraction (Tris-Hcl pH7.5 50mM, NaCl 150mM, EDTA 0.5mM, Triton X100 0.1%, nP40 0.2% antiprotéase 1X (cOmplete[™], Mini, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail, ROCHE)) par mg de poudre. Les échantillons sont resuspendus dans le tampon en vortexant régulièrement puis centrifugés (10min, 14 000g, 4°C). Le surnageant est de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Les surnageants finaux sont récupérés et constituent les extraits protéiques de plante utilisés pour les différentes expérimentations.

I.4 Westerns blots (WB)

Des gels de SDS page à 10% d'acrylamides sont utilisés pour la migration des extraits protéiques. 30µl d'extrait de plante ou 25µl d'éluat d'immunoprécipitation sont incubés dan 15µl de Laemmli 2X 10min à 65°C en agitation puis déposés par puits. Les gels sont alors mis à migrer dans du tampon RB1X en voltage constant (100mV). Les protéines ayant été soumises à l'électrophorèse, sont alors transférées sur membranes de PVFD préalablement activées 10min dans l'éthanol absolu, à l'aide du trans-blot® turbo[™] transfer system de Bio-rad. Les membranes sont alors rincées 3 fois dans du tampon Phosphate salin + 1% Tween (PBST) puis saturées en protéine de lait dans du PBST + lait 5% (1h en agitation 40rpm, température ambiante). Elles sont alors incubées pendant la durée de la nuit dans du PBST + 5% lait sur la nuit à 4% en présence de l'anticorps primaire (1/5 000°). Les membranes sont alors lavées dans du PBST (4 x 10min + 1x 1h, 40rpm, température ambiante). Elles sont alors de nouveau lavées dans du PBST (4 x 10min + 1x 1h, 40rpm, température ambiante) avant d'être séchées 2min sur papier absorbant. Les protéines hybridées par l'anticorps primaire sont alors détectées par chimioluminescence à l'aide du LAS 4000 (Fuifilm) et du substrat Amersham ECL[™] Prime (luminol + peroxyde) de chez GE Healthcare.

Les membranes sont ensuite colorées à l'aide de bleu de Coomassie durant 1h à température ambiante en agitation à 35rpm. Les profils protéiques sont alors révélés en décolorant les membranes à l'aide d'une solution de décoloration d'acide acétique 10% et éthanol 10% pendant la nuit à température ambiante en agitation à 35rpm.

I.5 Immunoprécipitation (IP)

Des billes magnétiques couplées à des protéines A (Dynabeads[™] Protein A, ThermoFisher n°10001D) sont utilisées afin d'effectuer une immunoprécipitation (IP) des protéines d'*A. thaliana* ou de protéines recombinantes à l'aide de l'antipeptide ou d'un anticorps commercial ciblant NPR1 uniquement chez cette espèce végétale (Agrisera n° AS12 1854).

Des billes sont préparée pour chaque IP, pour cela 4 aliquotes de 100µl de solution de billes sont déposés dans des tubes Eppendorf 1,5ml puis placé sur portoir magnétique durant 2min. Le surnageant est jeté et les billes sont lavées 2 fois avec 500ml de PBST. Les tubes sont de nouveau placés sur le portoir magnétique pendant 2min, le surnageant est enlevé puis 90µl de PBST y sont déposés. Six microlitres d'anticorps commercial (6µg) et 0.5µl d'antipeptide (25µg) sont ajoutés par tube (qsp 100µl PBST) puis le tout est incubé 1h30 à température ambiante en agitation sur roue. Le surnageant est enlevé et les billes couplées aux anticorps sont lavées 3 fois avec 500µl de PBST an agitation (5min) sur roue. Le tout est ensuite repris dans 100µl de PBST. Les anticorps sont ensuite liés de manière covalente aux protéines A des billes en les lavant 2 fois 10min en agitation avec 1ml de tampon de crosslink (200mM triethanolamine pH 8,2). Les tubes sont de nouveau placés sur le support magnétique (2min) puis le surnagent est retiré. Un millilitre de tampon de cross-link + DMP (200mM triethanolamine pH 8,2 + dimethyl pimelimidate dihydrochloride 26 mM) est ajouté par tube puis les tubes sont incubés 30min en agitation à température ambiante. La réaction de liaison covalente est stoppée en enlevant le surnageant (sur portoir magnétique), en ajoutant 1ml de Tris-HCl 50mM pH 7,5 (incubation 15min à TA en agitation sur roue) puis en lavant 3 fois

232

5min avec 500µl de PBST. Les billes liées de manière covalente aux anticorps sont alors reprises dans 100µl de PBST et conservées à 4°C pour les IP.

Les tubes sont placés sur le portoir magnétique pour retirer le surnageant, 800µl de protéines totales d'*A. thaliana* traitées au SA ou 150µl de protéine recombinante (1µg pour chaque) sont déposés dans les 4 tubes contenant des billes magnétiques liées soit à l'anticorps commercial soit à l'antipeptide. Les 4 tubes sont incubés pendant la nuit à 4°C sur roue pour hybrider la, ou les, protéines reconnues par les anticorps à ceux-ci. Les billes couplées aux anticorps eux même hybridés aux protéines sont lavées 5 fois 5 min avec 500µl de PBST. Les protéines reconnues par les anticorps sont alors éluées à l'aide de 50µl laemmli + dithiothréitol (DTT) 100mM une première fois 15min à température ambiante (éluat 1) puis une deuxième fois toujours à l'aide de laemmli +DTT 100mM mais pendant 1h à 95°C (éluat2). Ces différent éluats sont ensuite utilisés en WB et SDSpage.

I.6 Production de protéines recombinantes

1.6.a)Clonage

La phase codante de la protéine NPR1 d'*A.thaliana*, ainsi que des sous partie de celle-ci, ont été clonées dans la bactérie *E. Coli* par la technique de clonage Gateway[®]. Trois différentes constructions ont ainsi été effectuées. La première permet de produire la protéine NPR1 entière ou totale (prot T dans le reste du document) soit une protéine de 560 acides aminés. La seconde permet de produire une protéine partielle (prot P) correspond aux 260 acides aminés en Nter de NPR1. La troisième permet de produire uniquement la parte inaccessible de NPR1 sous sa forme inactive soit les 140 acides aminés situés entre la cystéine 82 et la cystéine 216 de NPR1 (appelée prot I pour protéine d'intérêt) Figure2 et SEQ ID 11-12 & 13.

Des PCR ont été effectuées en utilisant comme matrice les ADNc d'*A. thaliana* à l'aide des amorces décrites en SEQ ID NO 14-15-16-17 & 18. Ces amorces permettent d'amplifier les séquences d'ADN codant pour les trois protéines sus citées en y intégrant en 5' une séquence TEV permettant le clivage des protéines par la protéase TEV. Les séquences attB1 et attB2 ont aussi été ajoutées aux amorces afin de les intégrer respectivement en 5' et en 3' des produits de PCR afin de les assembler dans le vecteur pDONR207 par réaction de BP dans le cadre du clonage par la technique Gateway[®]. Les clones obtenus ont été validés par séquençage (GATC biotech) puis utilisés pour purifier les plasmides donneurs (pDONR207 + constructions) pour la suite du clonage. Les plasmides donneurs ont ensuite été utilisés pour la réaction de recombinaison (étape LR du protocole Gateway[®]) avec les plasmides d'expression (PetG10-A) permettant de rajouter une séquence codant pour une étiquette histidine en 5' des différentes séquences d'intérêt et de traduire ces séquences en protéine de manière inductible (par ajout d' d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)). Les plasmides d'expression obtenus ont ensuite été clonés dans la bactérie *E. coli dH5a* afin de les multiplier et de les purifier puis ils ont été clonés dans *E. coli Rosetta* afin de produire les protéines avec leur étiquette histidine.

1.6.b) Production des protéines

Les différentes bactéries possédant les constructions d'intérêt ont été cultivées dans 21 de bouillon lysogène + Ampicilline 100µg/ml + Chloramphénicol 34µg/ml, jusqu'à avoir une densité optique de 0,6 à 600nm, à 37°C. La production de protéine est alors déclenchée par ajout d'IPTG (0,5mM pour T et P et 1mM pour I). Les bactéries sont prélevées 3h plus tard pour T et P et 4h plus tard pour I. Les cultures sont séparées en 6 fois 40ml chacune et centrifugées (12000g 15min à 4°C). Les culots sont congelés dans l'azote liquide pour les étapes suivantes.

Les culots sont re-suspendus dans un tampon de lyse dénaturant car les protéines recombinantes sont dans des corps d'inclusion (NaH2PO4 100mM, tris 10mM pH8, NaCl 250mM, urée 8M, DTT 1mM, imidazole 250mM, antiprotéase 1X (cOmplete[™], Mini, EDTA-free Protease inhibitor Cocktail, ROCHE)) puis lysés par sonication (12 pulses de 20 s à 50% d'amplitude entrecoupés de pause de 30 sec, sur glace 2°). Les extraits sont ensuite centrifugés (20 000g, 15min 4°C) pour culotter les débris cellulaires. Les surnageants sont récupérés et utilisés pour les différentes expérimentations comme protéine recombinante.

1.7 Analyse de l'expression de gènes par q-RT-PCR

Des plantes d'A. *thaliana* sont cultivées en terre durant 3 semaines en chambre de culture jour long puis sont pulvérisées avec de l'eau (témoin négatif) du Bion® 0.015% (témoin d'activation de la voie du SA). Les parties aériennes des plantes sont alors récoltées 48h après pulvérisation et broyées dans l'azote liquide.

Les ARNs sont ensuite extraits au trisol puis sont dosés afin de partir de 1µg d'ARN pour les étapes de DNase et RT. L'ADN présent dans les échantillons est dégradé à l'aide de DNase (1µg d'ARN, 1µl de tampon 10X avec du MgCl2, 1µl de DNase, complétés à 10µl avec de l'eau DEPC). Le tout est incubé 45 min à 37°C dans un bain Marie puis 1µl d'EDTA à 50mM est rajouté avant incubation 10min à 65°C toujours dans un bain Marie afin d'inactiver la DNase. Ces ARNs traités à la DNase sont alors utilisés pour l'étape de rétrotranscription (RT). Cinq microlitres d'ARN sont incubés à 65°C pendant 5 min dans un bain Marie avec 1µl d'amorces et 6.5µl d'eau traitée avec du diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Puis 4µl de tampon de RT 5X, 0.5µl de Ribolock, 2µl de dNTPs à 10mM et 1µl de transcriptase inverse M-MuLV sont ajoutés par tube avant incubation 1h à 37°C dans un bain marie. La transcriptase inverse est ensuite inactivée durant 10min à 70°C. Les ADNc ainsi obtenus sont alors dilués par 10 (ajout de 180µl d'eau) pour être utilisés lors de l'étape de PCR quantitative.

La réaction de qPCR se fait dans 10µl, à raison de 5µl de mix SybrGreen, 0.3µl de mélange d'amorces à 0.3µM, 2.4µl d'eau et 2.5µl d'ADNc.

Les qPCRs sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur CFX-96 Real Time PCR system de chez Bio-Rad. Les données brutes obtenues sont traitées à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX manager. La quantité de transcrits normalisée est ensuite obtenue en effectuant le rapport entre les données obtenues pour les gènes de défense d'intérêt et pour le gène constitutif utilisé (ici le gène codant pour la clathrine) en tenant compte de l'efficacité des amorces obtenues à l'aide de la gamme de dilution et de leur quantité exprimée en unité arbitraire.

II. Résultats.

II.1 Les antipeps permettent de détecter une forme active de NPR1

L'objectif est de montrer que les anticorps, produits par la méthode développée, permettent de détecter une forme active de NPR1. Des WB ont donc été réalisés à partir d'extraits de plantes traitées avec du Bion, du SA, du Me-Ja ou de l'eau. Dans les WB effectués avec ces extraits de plante, une bande est détectée lorsque les plantes sont traitées par des activateurs de défense et n'est pas détectée lorsque les plantes sont traitées avec de l'eau. Cette bande est détectée à une taille de37 kDa Figure3.

Afin de montrer que la bande détectée correspond bien à la protéine NPR1, un séquençage a été effectué sur des bandes découpées sur un gel d'acrylamide réalisé en parallèle avec un Western blot, par séquençage peptidique effectuée par la plateforme PAPPSO (UMR MICALIS, PAPPSO, bâtiment 526, Domaine de Vilvert 78352, Jouy en Josas cedex). Entre 100 et 160 protéines sont alors identifiées au niveau de la bande détectée par WB dont la protéine NPR1. NPR1 est donc bien présente au niveau de la bande détectée par WB (à la taille de 37 kDa).

De plus, des WB ont été effectués avec les mêmes extraits de plante en utilisant en parallèle l'anti pep ainsi qu'anticorps commercial ciblant NPR1 uniquement chez *A. thaliana* (Agrisera n° AS12 1854). Une bande à la même taille que la bande observée en Western blot en utilisant les anticorps développés dans cette invention est détectée, lorsque l'anticorps commercial est utilisé Figure5.

Afin de montrer que l'antipeptide développé est capable de s'hybrider à la protéine NPR1, les différentes formes de NPR1 recombinantes produites chez *E.coli* (incluant la partie active ciblée de la protéine) sont utilisées afin d'effectuer des westerns blots avec l'antipep ou avec un anticorps spécifique de l'étiquette Histidine (His) utilisé chez ces mêmes protéines recombinantes (His-tag). Ces différentes formes de la protéine sont toutes les trois détectées avec chacun des anticorps, et ce à leur taille attendue Figure4.

II.2 L'immunisation avec différents peptides synthétiques permet d'obtenir différents antipeps détectant la même bande

Afin de montrer que cibler différentes zones dans la partie inaccessible de NPR1 permet de détecter cette forme active, deux peptides dégénérés consensus différents, d'une douzaine d'acide aminés, correspondants à des séquences consensus inter-espèces de cette partie de NPR1 ont été utilisés pour produire des anticorps. Les anticorps obtenus de cette manière permettent de détecter une bande à la même taille en WB sur des extraits protéiques d'*A. thaliana* élicités par un SDP ou une molécule élicitrice des défenses des plantes Figure6.

II.3 Cette forme active de NPR1 est présente lors de l'activation de différentes voies de défense

Afin de montrer que cette forme active de NPR1 est présente dans le deux voies hormonales de défense activées (voie impliquant le SA ou impliquant le couple JA/ET). Des WB ont été effectuées en utilisant des plantes d'A.thaliana traitées avec du SA, du Me-JA, ou de l'eau. La bande observée à 37kDa en WB à l'aide des anticorps produits est détectée que l'on active les défenses à l'aide de SA ou à l'aide de Me-JA Figure5.

235

Ces résultats sont cohérents avec la littérature scientifique qui met en évidence l'implication de la protéine NPR1 dans les deux voies systémiques de défense des plantes que sont la résistance systémique acquise (SAR) et induite (ISR) (Pieterse *et al.* 1998).

Le même type de résultat est obtenu lorsque des extraits de tomates sont utilisés à la place des extraits d'A. thaliana Figure 9.

II.4 Ces antipeps peuvent être utilisés dans différentes technique de biochimie

Pour montrer qu'il est potentiellement possible d'utiliser ces anticorps dans le cadre de l'ensemble des techniques immunologiques de biochimie tels que les WB, les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) mais également en IP ou encore potentiellement en immunocytochimie, deux techniques immunologiques ont d'ores et déjà été largement utilisées à l'aide de ces antipeptides que sont la méthode du Western blot (cf. ci-dessus I) et l'IP.

Les antipeps ainsi que l'anticorps commercial ont été utilisés pour effectuer une IP (Dynabeads[™] Protein A, ThermoFisher n°10001D) sur extrait de protéines d'*A. thaliana* traitées à l'aide de SA. La bande de 37 kDa est observée sur l'électrophorèse de l'éluat d'IP obtenu avec des extraits de plante dont les défenses ont été activées Figure7.

Ces anticorps ont aussi été utilisés pour immunoprécipiter la protéine recombinante P de taille connue. Cette protéine est détectée en Western-blot sur l'éluât d'IP obtenu avec les antipeptides, mais pas avec celui obtenu en utilisant l'anticorps commercial Figure7.

II.5 Ces antipeps peuvent permettre une quantification relative de l'activation des défenses

Afin de montrer que les antpeps peuvent permettre une quantification relative de l'activation des défenses, des extraits d'*A. thaliana*, connus pour avoir un niveau d'activation des défenses différent (observé en qPCR sur des gènes rapporteurs des différentes voies de défense), ont été utilisés en WB. L'intensité de la bande détectée est corrélée avec le niveau d'activation des défenses observé en qPCR Figure8.

II.6 Les antipeps permettent de détecter l'activation des défenses chez différentes espèces végétales

Pour montrer que la stratégie d'utiliser des peptides dégénérés peut permettre d'obtenir des anticorps capables de détecter l'activation des défenses chez différentes espèces végétales, de extraits protéiques de plantes de tomates traitées avec du DA, du Me-JA ou de l'eau ont été analysés en WB.

Une bande détectée se révèle beaucoup plus intense lorsque l'extrait protéique utilisé provient de plants de tomate traitées avec du SA ou du Me-JA comparé à l'extrait protéique issu du lot de plantes témoin traités à l'eau Figure9.

APPLICATIONS INDUSTRIELLES

L'indication de la manière dont l'invention est « susceptible d'application industrielle ».

Les antipeps obtenus selon la méthode décrite ci-dessus peuvent être utilisés afin de valider l'activation des défenses par un SDP potentiel. Le test, permettant de valider cette activation des défenses, peut être réalisé par Western blot, en ELISA ou même en test bandelette.

Ce test permettra :

- De faire du crible de molécules potentiellement SDP au laboratoire ou au champ afin de permettre l'émergence de nouvelles formulations de SDP.

- De faire du crible de molécules potentiellement SDP au laboratoire ou au champ afin de permettre l'émergence de nouvelles formulations de SDP.

 De vérifier l'activation des défenses au champ suite à l'application de SDP ainsi que d'effectuer un suivi de cette activation au cours du temps, dans le cadre d'essais agronomiques ou bien par l'agriculteur dans le cas d'une utilisation agricole de ces produits.

- De montrer l'activation des défenses par un produit comme demandé dans le cadre de la méthode de la Commission des essais biologiques (CEB) sur les « principes généraux d'expérimentation des stimulateurs des défenses des plantes » (méthode générale MG 14) en aval de l'homologation et la mise sur le marché du produit.

- De sélectionner des variétés hautement réceptives aux SDP, dans le cadre de la sélection variétale ou bien afin d'optimiser les couples variété de plante/SDP, dans le cadre du conseil aux agriculteurs.

- De mesurer le niveau basal de l'activation des défenses au champ avant traitement pour faciliter l'aide à la décision d'utiliser ou non des SDPs.

- De montrer l'activation des défenses de manière simple dans le cadre de la recherche fondamentale.

FIGURES





Fig 2





Fig 5





Fig 7



Fig 8



LISTAGE DES SEQUENCES

<110> Nom du déposant <120> Titre de l'invention <130> Référence du dossier <140> Demande de brevet actuelle <141> Date de dépôt <160> 18 <210> 1 <211> 14 <212> PRT <213> Séquence artificielle <220> 2 acides aminés dégénérés (Xaa) <223> Le premier Xaa correspond soit à Val soit à Ile le deuxième correspond soit à Ser soit à Pro <400> 1 His Val His Arg Cys Xaa Leu Ser Ala Arg Ser Xaa Phe Phe 5 1 10 <210> 2 <211> 14 <212> PRT <213> Séquence artificielle <220> <223> La première séquence possible basée sur SEQ ID NO1 <400> 2 His Val His Arg Cys Val Leu Ser Ala Arg Ser Ser Phe Phe 5 1 10 <210> 3 <211> 14 <212> PRT

244

Partie 6. Annexe

```
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> La deuxième séquence possible basée sur SEQ ID NO1
<400> 3
His Val His Arg Cys Ile Leu Ser Ala Arg Ser Ser Phe Phe
                  5
                                        10
 1
<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> La troisième séquence possible basée sur SEQ ID NO1
<400> 4
His Val His Arg Cys Val Leu Ser Ala Arg Ser Pro Phe Phe
 1
                  5
                                        10
<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> La quatrième séquence possible basée sur SEQ ID NO1
<400> 5
His Val His Arg Cys Ile Leu Ser Ala Arg Ser Pro Phe Phe
 1
                  5
                                        10
<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220> 2 acides aminés dégénérés (Xaa)
```

```
<223> Le premier Xaa correspond soit à Phe soit à Leu et le deuxième
correspond soit à Val soit à Ile
<400> 6
His Ala Leu Gln Leu Leu Ser Asn Ser Xaa Glu Ser Xaa Phe
1
                5
                                     10
<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> La première séquence possible basée sur SEQ ID NO6
<400> 7
His Ala Leu Gln Leu Leu Ser Asn Ser Phe Glu Ser Val Phe
1
               5
                                     10
<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> La deuxième séquence possible basée sur SEQ ID NO6
<400> 8
His Ala Leu Gln Leu Leu Ser Asn Ser Phe Glu Ser Ile Phe
1
                5
                                     10
<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> La troisième séquence possible basée sur SEQ ID NO6
<400> 9
His Ala Leu Gln Leu Leu Ser Asn Ser Leu Glu Ser Val Phe
```

10 1 5 <210> 10 <211> 14 <212> PRT <213> Séquence artificielle <220> <223> La quatrième séquence possible basée sur SEQ ID NO6 <400> 10 His Ala Leu Gln Leu Leu Ser Asn Ser Leu Glu Ser Ile Phe 1 5 10 <210> 11 <211> 617 <212> PRT <213> Séquence artificielle <220> Séquence de la protéine NPR1 d'A. thaliana entière (Prot T) incluant en Nter une étiquette histidine suivit des acides aminés correspondant à la séquence attBl nécessaire au clonage avec la méthode gateway ainsi que la séquence de clivage de la TEV protéase <223> <400> 11 His His His His His Pro Met Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly 1 5 10 15 Phe Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Met Asp Thr Thr Ile Asp Gly Phe 20 25 30 Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Ser Ser Thr Ser Phe Val Ala Thr Asp Asn 35 40 45 Thr Asp Ser Ser Ile Val Tyr Leu Ala Ala Glu Gln Val Leu Thr Gly 50 55 60 Pro Asp Val Ser Ala Leu Gln Leu Leu Ser Asn Ser Phe Glu Ser Val 70 75 80 65 Phe Asp Ser Pro Asp Asp Phe Tyr Ser Asp Ala Lys Leu Val Leu Ser 85 90 95 Asp Gly Arg Glu Val Ser Phe His Arg Cys Val Leu Ser Ala Arg Ser 100 105 110

247

Ser Phe Phe Lys Ser Ala Leu Ala Ala Ala Lys Lys Glu Lys Asp Ser Asn Asn Thr Ala Ala Val Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ile Ala Lys Asp Tyr Glu Val Gly Phe Asp Ser Val Val Thr Val Leu Ala Tyr Val Tyr Ser Ser Arg Val Arg Pro Pro Pro Lys Gly Val Ser Glu Cys Ala Asp Glu Asn Cys Cys His Val Ala Cys Arg Pro Ala Val Asp Phe Met Leu Glu Val Leu Tyr Leu Ala Phe Ile Phe Lys Ile Pro Glu Leu Ile Thr Leu Tyr Gln Arg His Leu Leu Asp Val Val Asp Lys Val Val Ile Glu Asp Thr Leu Val Ile Leu Lys Leu Ala Asn Ile Cys Gly Lys Ala Cys Met Lys Leu Asp Arg Cys Lys Glu Ile Ile Val Lys Ser Asn Val Asp Met Val Ser Leu Glu Lys Ser Leu Pro Glu Glu Leu Val Lys Glu Ile Ile Asp Arg Arg Lys Glu Leu Gly Leu Glu Val Pro Lys Val Lys Lys His Val Ser Asn Val His Lys Ala Leu Asp Ser Asp Asp Ile Glu Leu Val Lys Leu Leu Lys Glu Asp His Thr Asn Leu Asp Asp Ala Cys Ala Leu His Phe Ala Val Ala Tyr Cys Asn Val Lys Thr Ala Thr Asp Leu Lys Leu Asp Leu Ala Asp Val Asn His Arg Asn Pro Arg Gly Tyr Thr Val Leu His Val Ala Ala Met Arg Lys Glu Pro Gln Leu Ile Leu Ser Leu Leu Glu Lys Gly Ala Ser Ala Ser Glu Ala Thr Leu Glu Gly Arg Thr Ala Leu Met Ile Ala Lys Gln Ala Thr Met Ala Val Glu Cys Asn Asn Ile Pro Glu Gln Cys Lys His Ser Leu Lys Gly Arg Leu Cys Val Glu Ile Leu Glu Gln Glu Asp Lys Arg Glu Gln Ile Pro

Thèse de doctorat Université Paris Saclay 2019

Arg Asp Val Pro Pro Ser Phe Ala Val Ala Asp Glu Leu Lys Met 435 440 445 Thr Leu Leu Asp Leu Glu Asn Arg Val Ala Leu Ala Gln Arg Leu Phe 4.50 455 460 Pro Thr Glu Ala Gln Ala Ala Met Glu Ile Ala Glu Met Lys Gly Thr 465 470 475 Cys Glu Phe Ile Val Thr Ser Leu Glu Pro Asp Arg Leu Thr Gly Thr 480 485 490 Lys Arg Thr Ser Pro Gly Val Lys Ile Ala Pro Phe Arg Ile Leu Glu 495 505 510 Glu His Gln Ser Arg Leu Lys Ala Leu Ser Lys Thr Val Glu Leu Gly 515 520 525 Lys Arg Phe Pro Arg Cys Ser Ala Val Leu Asp Gln Ile Met Asn 530 535 540 Cys Glu Asp Leu Thr Gln Leu Ala Cys Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu 545 550 555 560 Lys Arg Leu Gln Lys Lys Gln Arg Tyr Met Glu Ile Gln Glu Thr Leu 565 570 575 Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asp Asn Leu Glu Leu Gly Asn Ser Ser Leu 580 585 590 Thr Asp Ser Thr Ser Ser Thr Ser Lys Ser Thr Gly Gly Lys Arg Ser 595 600 605 Asn Arg Lys Leu Ser His Arg Arg Arg 610 615

<210> 12 <211> 274 <212> PRT <213> Séquence artificielle

<220> Séquence de la protéine NPR1 d'A. thaliana partielle (Prot P) incluant en Nter une étiquette histidine suivit des acides aminés correspondant à la séquence attB1 nécessaire au clonage avec la méthode gateway ainsi que la séquence de clivage de la TEV protéase <223>

<400> 12 His His His His His Pro Met Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Partie 6. Annexe

Phe Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Met Asp Thr Thr Ile Asp Gly Phe Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Ser Ser Thr Ser Phe Val Ala Thr Asp Asn Thr Asp Ser Ser Ile Val Tyr Leu Ala Ala Glu Gln Val Leu Thr Gly Pro Asp Val Ser Ala Leu Gln Leu Leu Ser Asn Ser Phe Glu Ser Val Phe Asp Ser Pro Asp Asp Phe Tyr Ser Asp Ala Lys Leu Val Leu Ser 9.5 Asp Gly Arg Glu Val Ser Phe His Arg Cys Val Leu Ser Ala Arg Ser Ser Phe Phe Lys Ser Ala Leu Ala Ala Ala Lys Lys Glu Lys Asp Ser Asn Asn Thr Ala Ala Val Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ile Ala Lys Asp Tyr Glu Val Gly Phe Asp Ser Val Val Thr Val Leu Ala Tyr Val Tyr Ser Ser Arg Val Arg Pro Pro Pro Lys Gly Val Ser Glu Cys Ala Asp Glu Asn Cys Cys His Val Ala Cys Arg Pro Ala Val Asp Phe Met Leu Glu Val Leu Tyr Leu Ala Phe Ile Phe Lys Ile Pro Glu Leu Ile Thr Leu Tyr Gln Arg His Leu Leu Asp Val Val Asp Lys Val Val Ile Glu Asp Thr Leu Val Ile Leu Lys Leu Ala Asn Ile Cys Gly Lys Ala Cys Met Lys Leu Asp Arg Cys Lys Glu Ile Ile Val Lys Ser Asn Val Asp Met Val Ser Leu Glu Lys Ser Leu Pro Glu Glu Leu Val Lys Glu Ile Ile

Prot I (163aa 18.30 kDa)

<210> 13

Partie 6. Annexe

<211> 163 <212> PRT <213> Séquence artificielle

<220> Séquence de la partie inaccessible sous la forme inactive de la protéine NPR1 d'A. thaliana partielle (Prot I) incluant en Nter une étiquette histidine suivit des acides aminés correspondant à la séquence attB1 nécessaire au clonage avec la méthode gateway ainsi que la séquence de clivage de la TEV protéase <223>

<400> 13

HisHisHisHisProMetThrSerLeuTyrLysLysAlaGly1510101515PheGluAsnLeuTyrPheGlnGlyCysValLeuSerAlaArgSerSer20253030303030303030303030PhePheLysSerAlaAlaAlaAlaLysLysGluLysAspSerAsn354045454545454545454545

Asn Thr Ala Ala Val Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ile Ala Lys Asp Tyr 55 50 60 Glu Val Gly Phe Asp Ser Val Val Thr Val Leu Ala Tyr Val Tyr Ser 70 65 75 80 Ser Arg Val Arg Pro Pro Pro Lys Gly Val Ser Glu Cys Ala Asp Glu 85 90 95 Asn Cys Cys His Val Ala Cys Arg Pro Ala Val Asp Phe Met Leu Glu 100 105 110 Val Leu Tyr Leu Ala Phe Ile Phe Lys Ile Pro Glu Leu Ile Thr Leu 115 120 125 Tyr Gln Arg His Leu Leu Asp Val Val Asp Lys Val Val Ile Glu Asp 130 135 140 Thr Leu Val Ile Leu Lys Leu Ala Asn Ile Cys Gly Lys Ala Cys Met 145 150 155 160 Lys Leu Leu

<210> 14 <211> 57 <212> ADN <213> Séquence artificielle
<220> Amorce en 5' permettant de produire la prot T ainsi que la prot P recombinante SED ID NO 15 et 16 incluant en 5' la séquence attB1 nécessaire au clonage avec la méthode gateway® ainsi que la séquence correspondant à celle du site de clivage de la TEV protéase <223> <400> 14 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta aatggacacc accattgatg gattcgc 57 <210> 15 <211> 57 <212> ADN <213> Séquence artificielle <220> Amorce en 3' permettant de produire la prot T recombinante SED ID NO 15 incluant en 5' la séquence attB2 nécessaire au clonage avec la méthode gateway® <223> <400> 15 57 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta tcaccgacga cgatgagaga gtttacg <210> 16 <211> 61 <212> ADN <213> Séquence artificielle <220> Amorce en 3' permettant de produire la prot P recombinante SED ID NO 16 incluant en 5' la séquence attB2 nécessaire au clonage avec la méthode gateway® <223> <400> 16 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta tcaaattatc tctttaacaa gctcttccgg 60 61 С <210> 17 <211> 55

Partie 6. Annexe

<212> ADN <213> Séquence artificielle <220> Amorce en 5' permettant de produire la prot I recombinante SED ID NO 17 incluant en 5' la séquence attB1 nécessaire au clonage avec la méthode gateway® ainsi que la séquence correspondant à celle du site de clivage de la TEV protéase <223> <400> 17 55 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta atgcgttttg tcagcgagaa gctct <210> 18 <211> 63 <212> ADN <213> Séquence artificielle <220> Amorce en 3' permettant de produire la prot P recombinante SED ID NO 17 incluant en 5' la séquence attB2 nécessaire au clonage avec la méthode gateway® <223> <400> 18

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggta tcacaatagc ttcatacaag ctttaccaca	60
tat	63

Annexe 9 Publication en cours de préparation

Nitrate deficiency or over-fertilization inhibits elicitor mediated defense activation.

Autors : Camille Verly^{1,2}, Atsin Claude Roméo Djoman², Martine Rigault¹, Frédéric Giraud², Loïc Rajjou¹, Marie Emmanuelle Saint Macary³, Alia Dellagi^{1*}.

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), UMR 1318 INRA-AgroParisTech, ERL CNRS 3559 - Université Paris-Saclay, LabEx SPS, RD10, F-78026 Versailles,

² Staphyt-Service L&G / BIOTEAM, Site de Montesquieu, Av François Magendie, 33650 Martillac, France

³ Staphyt - BIOTEAM, La Paluzette, Route des Mas 34590 Marsillargues, France

* Correspondence:

Pr. Alia Dellagi

Address: Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de St Cyr (RD 10), F-78026 Versailles Cedex, France.

Phone: +33 1 30 83 32 40

E-mail: dellagi@agroparistech.fr

Keywords: Nitrate, elicitor, protection, defenses, over-fertilization,

INTRODUCTION

Wherever they grow, plants are exposed to many biotic stresses such as pathogenic microorganisms, insects or herbivores. Plants have developed the capacity to activate defenses

in response to pathogen attacks thus leading to different levels of resistance which can be effective at the site of infection or at distant sites (Hatcher, 1995). Upon pathogen perception, complex networks of signaling pathways are activated and vary depending on the type of infecting organism. These signaling pathways involve the action of several phytohormones that accumulate and lead to the transcriptional activation of genes coding for the synthesis of antimicrobial compounds such as phytoalexins or Pathogenesis Related (PR) proteins.

Hormonal signaling pathways are involved in the establishment of systemic resistance phenomena (Pieterse et al., 2012). The salicylic acid (SA) phytohormone is generally involved in defense against biotrophic or hemibiotrophic pathogens (Glazebrook, 2005). Genes activated by SA include *PR5*, encoding a thaumatin-like protein and *PR1*, which encodes an antimicrobial protein with unknown function (Beilmann et al., 1992; Durrant and Dong, 2004). The Jasmonic acid (JA) and ethylene (Et) phytohormones are generally involved in defenses against necrotrophic pathogens (Mengiste, 2012b) and may be induced by non-pathogenic Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)(Jourdan et al., 2008). JA/ET defenses are characterized by the production among others, of peroxidases, polyphenol oxidases and lipoxygenases (Van Wees, 1999). The genes encoding the PR proteins PDF1.2, which is a defensin and LOX2, which is a lipoxygenase are used as markers of this hormonal defense pathway (Manners et al., 1998; Thomma et al., 1998).

Several reports indicate the existence of cross-talks between those systemic defense pathways including synergy or antagonism (Pieterse et al., 2012; Vos et al., 2015). For example, an antagonism is often observed between SA dependent defenses and JA/ET dependent defenses (Caarls et al., 2016; Koornneef and Pieterse, 2008; Leon-Reyes et al., 2010b; Van der Does et al., 2013).

The NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 protein (NPR1) (Cao et al., 1997; Dong, 2004) is a key defense regulator, known to be involved in both SA and JA/ET signaling (Barker, 2018; Pieterse and Van Loon, 2004; Withers and Dong, 2017). Its role in SA defense signaling has been well studied and described, whereas its role on JA/ET defenses is yet unclear. *npr1* mutant plants fail to induce *PR* genes in response to SA, and are more susceptible to biotrophic pathogen infections. In contrary, *NPR1* overexpression leads to an upregulation of the *PR* genes and enhanced disease resistance (Kinkema et al., 2000). When defenses are not activated, in resting conditions, the NPR1 protein is localized in the cytosol under an oligomeric form due to intermolecular disulfide bonds. In the presence of SA or SA

Partie 6. Annexe

agonsits, NPR1is converted to its monomeric form and then addressed to the nucleus (Mou et al., 2003a) where it binds to TGA transcription factors leading to the transcription of *PR* genes (Chern et al., 2001; Després et al., 2000; Zhou et al., 2000). This oligomer to monomer conversion is catalyzed by thioredoxins which reduce the disulfide bond between Cys82 and Cys216 (Mou et al., 2003a) of the two NPR1 proteins involved in the oligomer (Tada et al., 2008b). NPR1 is also involved in the activation of JA/ET dependent defenses but probably via a different mechanism. An *npr1* mutant is unable to activate the JA/ET dependent defenses (Koornneef and Pieterse, 2008; Nie et al., 2017) in response to PGPR. Overexpressing engineered forms of NPR1 which are retained in the cytosol results in the suppression of JA signaling (Spoel, 2003; Spoel et al., 2007; Yuan et al., 2007) indicating that the antagonistic effect of SA over JA signaling requires cytosolic NPR1.

Environmental factors are known to influence the ability of plants to implement their defenses. Different environmental conditions may influence plant pathogen interactions such as the type of light (de Wit et al., 2013; Janda et al., 2015; Kazan and Manners, 2011; Mintoff et al., 2015) mineral composition of the soil (Kieu et al., 2012; Poschenrieder et al., 2006) or water availability (Blumenthal et al., 2009b). The impact of fertilizers, in particular nitrogen fertilization, on plant-pathogen interactions is well documented (Eyles et al., 2007b; Fagard et al., 2014; Pato and Obeso, 2013; Shaner and Finney, 1977; Veresoglou et al., 2013b). The impact of nitrate fertilization on plant-pathogen interactions may be opposite depending on the pathosystem considered. Indeed, tomato tolerance to *Botytis cinerea* is increased by nitrate fertilization whereas *A. thaliana* tolerance to *B. cinerea* decreases with nitrate fertilization (Fagard et al., 2014). Fertilization has an impact on plant fitness (Kong et al., 2017; Mozafar, 1993; Tian et al., 2008; Wang et al., 2011; Xu et al., 2012) and on defense activation (Kutyniok and Müller, 2013; Zarattini et al., 2017) as well as on pathogen virulence (Robert et al., 2004; Sauge et al., 2010).

A better understanding of the mechanisms by which minerals affect plant defenses may be useful to improve cultural practices in order to optimize fertilization and reduce pesticide use thus decreasing the environmental impact of agriculture (Khan et al., 2016) (Ahmad et al., 2010; Mitchell et al., 2016; Schwessinger et al., 2015). Some products known to activate plant defense pathways thereby limiting infection by the pathogens have been developed and called elicitors. For example, Bion[®] a commercial elicitor commercialized by Syngenta, is known to activate the SA dependent defense pathway and is used in agriculture to protect tomato or apple against pathogens. The development of elicitors able to activate plant defenses is therefore a promising strategy to improve natural resistance (Heil, 2002; Ramamoorthy et al., 2001;

Renard-Merlier et al., 2007) and to reduce the use of conventional crop protection products (Percival, 2001; Sharp, 2013). However the effectiveness of elicitors in the field remains uncertain and may depend on different external factors (Walters, 2009; Walters et al., 2005).

This effectiveness may depend on several parameters such as developmental stage of the plant (Carella et al., 2015; Steimetz et al., 2012) and environmental conditions. More specifically, mineral nutrition, and mainly nitrogen nutrition, plays a major role in the establishment of defenses. Our work addresses the combined impacts of developmental stage and nitrogen nutrition on elicitor efficiency.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and treatment

Seeds of *Arabidopsis thaliana* Col0 accession were obtained from Versailles Arabidopsis Stock Center (INRA Versailles France) and seeds of *npr1.1* mutant (N3726) were obtained from NASC (http://www.arabidopsis.info). Seeds were sown in poor soil with different nitrate fertilization conditions (2, 10 & 26 mM of nitrate), in a growth chamber under the following conditions ;18h of light21°C, 6h of dark 19°C, 70% relative humidity). Plants were grown until 4 different stages: Stage 1: plantlet (2 weeks after sowing (A.S.)), Stage 2: vegetative stage (3 weeks A.S.), Stage 3 : floral induction (4 weeks A.S.), Stage 4 : flowering time (5 weeks A.S.). Plants are sprayed until runoff point with a commercial elicitor (Bion® at 0.015%), Methyljasmonate (at 0.1mM with 0.5% DMSO) or water. For Bion®, the recommended dose ratio for tomato in field (0.05kg / ha) was adapted in volume concentration (g / l) considering a spray field of 330 L / ha. Plants are harvested for q-RT-PCR analysis and nitrogen and amino acid content or inoculated with pathogen 48h after elicitor treatment.

Dickeya dadantii bacterial strain and inoculation method

The *Dickeya dadantii* 3937 strain was from our own collection. Bacteria were grown in Luria-Bertani medium. For plant inoculation, a bacterial suspension at an OD₆₀₀ of 0.1 made up in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) was used. Plants were covered 24 hours before inoculation and 24h after elicitor treatment to obtain saturating humidity and facilitate infection. To inoculate plants, a small hole was made with a needle in the leaf, and then, 5µl of a bacterial suspension was deposited on the hole. Plants were then recovered all over three experiments. In each experiment, 16 plants were inoculated for each condition and two leaves by plant were Partie 6. Annexe

inoculated. In order to avoid bias linked to symptom severity, leaves were randomly chosen to be processed.

Nitrogen and amino acid content

Leaves were harvested 48 hours after treatment and immediately crushed in liquid nitrogen then stored at -80°C. Nitrate content is measured by a spectrophotometric method by comparison with a NaNO3 scale (Miranda et al., 2001). Ten mg of frozen leaf powder are incubated in 300µL of sterile distilled water during 20min on ice. Samples are centrifuged at 15,000 rpm at 4°C duing 20min and supernatant is harvest twice. Ten microliters of supernatant are mixed with 90µl of water and 100 µl of Miranda reagent (0.5M HCl, 0.25% Vanadium chloride, 0.005% N-1-naphtyethylendiamin, 0.1% Sulfanilamide) and incubated during 2h at 60°C. Concentration of nitrate is then calculated based on a standard curve obtained with NaNO₃ standard solutions by spectrophotometry at 540 nm. Amino acid content is measured by a spectrophotometric method adapted from (Rosen., 1956). Amino acids are extracted by vortexing 150 mg of frozen leaf powder with 1mL of 2% 5-sulfosalicylic acid (w/v in water). Samples are then centrifuged at 13,000 rpm during 10 min and supernatant is harvested for the following steps. Fifty microliters of samples are mixed with 150 µL of water, 100 µL of cyanide acetate solution (0.2 mL of 10 mM KCN, 9.8 ml of 2.65 M sodium acetate, 8% acetic acid pH 5.35) and 100µl of ninhydrine solution (3% ninhydride in Ethylene glycol monomethylether) then incubated during 15 min at 100°C under fume hood, before adding 1 mL of 50% isopropanol. Samples are placed on ice to decrease temperature to room temperature. Two hundred µL of samples are used to quantify amino acid content by comparison with standard solutions of L-glutamine by spectrophotometry at 570 nm.

RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described in Aznar et al. 2014 (Aznar et al., 2014).

Quantitative PCR

For each sample, level of *PR1*, *PR5 PDF1.2* and *LOX2* expression were measured. Clathrin was used as a reference gene because it was stably expressed under the different stages and the different nutritional conditions. Quantitative PCR reactions are carried out in 10 μ L, with 5 μ L

of SybrGreen® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mix, 0.3 µM of each primer, and 2.5 µL of cDNA. Quantitative PCRs were carried out using a CFX-96 Real Time PCR system thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The raw data obtained are processed using the CFX manager software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For each analysis, a Ct value was extracted and then normalized with standard curves tin order to obtain an SQ value (which takes into account the efficiency of the primers). Consequently, for each condition, as analyzes were performed in triplicate, 3 SQ values were obtained which were then averaged (mean SQ). The mean SQ values obtained for these genes were then divided with mean SQ values obtained for the reference gene. A normalized transcripts level is then obtained and expressed as arbitrary units.

Monitoring protection against D. dadantii

Impact of different treatment on the infection by *D. dadantii* is measured 2 days after inoculation by different method. First, the symptom severity was scaled as follows: 0, no symptom; 1, maceration at the site of inoculation; 2, maceration has spread to about half of the leaf; 3, maceration has spread to the whole leaf; and 4, maceration has started to spread to the rest of the plant (Rigault et al., 2017). Secondly, the number of inoculated leaves without symptom is divided by the number of inoculated leaves to obtain the ratio of successful infections. Third photographs of inoculated leaves were taken for each individual leaf. The surface of the lesions and the surface of the corresponding leaves were analyzed using the open source software ImageJ <u>https://imagej.nih.gov/ij/</u>. This allowed calculating an average of lesion surfaces (in cm²) and an average of proportion of macerated surface for each leaf.

RESULTS

Physiological parameters characterizing the different plant growth conditions

Our objective in this work was to test the effect of nitrogen nutrition and of developmental stage on elicitor activity. For this purpose, different growth conditions were considered. Plants were grown under 3 different nitrate supply conditions that we chose according to litterature (Lemaitre et al., 2008). Limiting nitrate supply (2 mM), optimal nitrate supply (10 mM), and over-fertilized condition (26 mM nitrate). Four developmental stages were considered representing 4 key steps in *A. thaliana* life cycle (Boyes et al., 2001). To check that 2 mM nitrate was limiting and that 26 mM was an excess, we expected to observe a negative impact on some physiological and/or metabolic parameters. Phenotypic and nitrogen related metabolic traits were measured (Figure 1). Nitrate content and amino acid content was significantly lower under 2 mM nitrate compared to 10 mM and 26 mM supply in plants of stages 2 to 4. This indicates that the lower nitrate supply has an impact on plant nitrogen metabolism starting from the stage 2. One interpretation of these data is that young plants may have reduced nitrogen needs compared to older plants, and that they mobilize nitrogen seed stocks at stage 1. Similar results were observed for leaf numbers: growth under 2 mM nitrate for plants of stage 2, 3 and 4. Leaf numbers of youngest stage 1 plants are not affected by nitrate supply probably because of reduced metabolic needs at that stage. Although growing plants under 26 mM nitrate did not increase nitrate nor amino acid content, it affected the number of leaves and rosette surfaces compared to those grown under 10mM nitrate.

Together these data show that the 3 nutritional conditions impacted differently the plant physiological status. The 2 mM nitrate supply is limiting and 26 mM nitrate corresponds to an over-fertilization, while 10 mM is the optimal nitrate supply.

Influence of nitrate fertilization on elicitor capacity to induce defense gene expression

To determine whether nitrate fertilization and developmental stage affected elicitor mediated defense activation, plants were treated with one of the two elicitors: Me-JA which is known to activate the JA/ET defense pathway, Bion[®] which is known to activate the SA pathway and water as a negative control. Expression profiles of two maker genes of the SA pathway (*PR1* and *PR5*) and two marker genes of the ET/JA pathway (*LOX2* and *PDF1.2*) were monitored by qRT-PCR 48 h after elicitor treatment. Transcript levels of *PR1* and *PR5* were increased by Bion[®] treatment with different intensities depending on the nitrate supply and on the plant stage. Under optimal nitrate supply (10 mM), the maximum transcript level of *PR1* and *PR5* was reached at developmental stage 1-4 (Figure 2 A, C), while generally, weaker levels of *PR1* and *PR5* transcript levels accumulated under limiting and excess fertilization. Interestingly, only the youngest plants (stage 1) were able to activate SA markers under limiting nitrate nutrition while older plants were not responsive to Bion[®] under 2mM nitrate.

Me-JA treatment slightly triggered accumulation of *PR1* and *PR5* transcripts and their level was higher under over-fertilization compared to limiting nitrate supply whatever the developmental stage (Figure 2 B, D). Transcript levels of *PDF1.2* and *LOX2* had different profiles depending on the nitrate supply. Bion[®] treatment clearly down regulated the expression of *PDF1.2* and *LOX2* at stages 1 and 2. Me-JA treatment had different impacts on *LOX2* and *PDF1.2* expression depending on the stage and on the nutrition. Their expression profiles were sometimes opposite like it is the case for *PDF1.2* an *LOX2* at stage 1 under 26 mM nitrate.

Together these data indicate that elicitor capacity to activate defense genes depends both on the stage and nitrate supply and that nitrate fertilization seems to have more effect than plant developmental stage on the SA defense pathway.

Influence of nitrate supply on elicitor protection activity

D. dadantii is a necrotrophic bacterium able to infect A. thaliana plants, which in turn activates different defenses to limit infection, such as the JA/ET defense pathway and the accumulation of reactive oxygen species (Fagard et al., 2007). To know whether nitrate fertilization may influence the protective activity of elicitors, we decided to use plants at vegetative stage (Stage 2) in which 2 mM nitrate is limiting and 26 mM nitrate supply causes over-fertilization compared to the optimal conditions of 10 mM nitrate. This stage is the one generally used in most studies (Fagard et al., 2007; Rigault et al., 2017). Two different artificial elicitors were used Me-JA and Bion[®], water was the negative control. Two days after elicitor or water treatment, plants were inoculated with D. dadantii then disease severity was scored. Disease severity levels were scored 48 h post inoculation (p.i), in two different ways. The percentage of infection success on inoculated plants was calculated as an indication of the processes occurring at the early steps of infection. The proportion of macerated surface in each inoculated leaf was calculated as an indication of disease severity resulting from successful later pathogenicity processes (see materials and methods). To know whether nitrate supply affects basal A. thaliana susceptibility to the bacteria, symptom severity on control (water) treated plants were compared under the 3 nitrate supply conditions. The level of nitrate fertilization in water treated plants used in this study did not have an impact on the percentage of infection success, neither on the proportion of macerated surface (Figure 3 A, C). This indicates that under these growth conditions, basal tolerance of the plants was similar in the three nutritional conditions. Following Me-JA treatment, decreased symptom severity under optimal nitrate supply (10 mM) was observed, but no effect of MeJA was observed when plants were under-fertilized or overfertilized (Figure 3 D). Interestingly, Bion[®] pre-treatment resulted in an increase in the percentage of infection success whatever the level of fertilization used (Figure 3 B).

These data show that, depending on, the elicitor used, the level of nitrate fertilization may influence the capacity of elicitors to protect the plant against *D. dadantii*.

Involvement of the key NPR1 gene in elicitor's protection activity

As a key player in plant immunity, NPR1 was shown to be involved in both SA and ET/JA signaling pathways (Mao et al., 2007; Pieterse and Van Loon, 2004; Spoel, 2003). We first investigated whether nitrate supply affected susceptibility of npr1.1 mutant to D. dadantii. For this purpose, symptom severity on control (water) treated plants under the 3 nitrate supply conditions were compared in WT and npr1.1. Over-fertilization increased npr1.1 mutant susceptibility (Figure 4 A, B) indicating that under limiting and optimal conditions, NPR1 is not required for the plant basal defense against D. dadantii. Elicitor's activity was monitored in the *npr1.1* mutant background to know whether *NPR1* was involved in the plant response to elicitors under the different nitrate nutritional conditions. For this purpose, protection against D. dadantii was monitored in the npr1.1 mutant background. The npr1.1 mutant was cultivated under the three different nitrate supply conditions, treated with Bion[®], Me-JA or water, and then inoculated with D. dadantii 48 h after treatment. Interestingly, elicitor treatments failed to show any effect on plant disease in the *npr1.1* mutant whatever the level of fertilization used (Figure 5 B). While we observed an impact of Bion and MeJA on plant protection against D. dadantii on WT plants, no effect was observed on npr1 mutant plants,. These data suggest that although elicitor activity depends on plant nutritional status, it also requires an intact plant defense signaling machinery which likely involved NPR1.

DISCUSSION

In this work, we investigated the impact of nitrogen fertilization and plant developmental stage on the activity of elicitors in the model plant *A. thaliana*. The impact of nitrogen fertilization and developmental stage of elicitors efficacy was analyzed at different biological levels, namely at the transcriptional level with the analysis of defense genes and at the physiological level by studying the level of protection against the necrotrophic pathogen *D. dadantii*.

We first set up the experimental conditions allowing cultivating *A. thaliana* under 3 different nitrogen states. Physiological and metabolic analyzes confirmed that the 3 fertilization conditions 2 mM, 10 mM and 26 mM nitrate corresponded to nitrate deficiency, optimal nitrate nutrition and nitrate over-fertilization respectively.

In order to know if the different nitrogen nutrition conditions and the developmental stages lead to a differential regulation of the defenses induced by the elicitors, two lines of defense have been studied: the SA and the JA pathway. In order to mimic an elicitor that activates the SA pathway, we chose to use the commercial elicitor Bion®. In order to mimic an elicitor that activates the JA pathway, we chose the MeJA elicitor because we did not have a commercial elicitor capable of activating this pathway in a robust way.

The expression profiles of the defense marker genes *PR1*, *PR5* (SA pathway), *LOX2* and *PDF1.2* (JA pathway) were monitored.

Bion® induces the expression of PR1 and PR5 under all conditions and this level of expression is higher when the plants are grown with optimum nitrate fertilization. Bion® also suppresses the expression level of *LOX2* and *PDF1.2* under all fertilization conditions. These results are consistent with the fact that the defenses involving SA or JA are antagonistic(Pieterse et al., 2012). The action of the Bion® on the defenses therefore depends on the fertilization but does not depend on the stage of development. Thus, the use of Bion® must take into account the fertilization level that must be optimal, and the type of targeted pathogen.

The expression profile of the two markers used for the JA pathway, PDF1.2 and LOX2, is not always similar under the different conditions studied. For example, in stage 1 under over fertilization, the expression of LOX2 is activated while that of PDF1.2 is repressed by a MeJA treatment. Our results suggest that LOX2 is a better marker of the JA path than PDF1.2. Indeed, the expression of LOX2 is activated in almost all samples treated with MeJA.

Interestingly, MeJA activates the expression of the defense genes of the SA pathway. This activation is detectable only in conditions of optimal nitrogen nutrition. This suggests that both SA and JA pathways can be activated by some elicitors.

In contrast to Bion[®], which activates markers of the SA pathway independently of developmental stage, the effect of MeJA on the markers of the two defenses investigated

depends on stage and fertilization. Because JA is a hormone involved in development (Wasternack and Hause, 2013), its concentration in the plant varies with development. Thus, MeJA treatment may interfere with the hormonal balance and differentially activate the defenses according to the developmental stage.

We wanted to know if there is a correlation between the expression of the defense genes and the effective protection of the elicitors against *D. dadantii* in order to know if the impact of the nitrogen fertilization on the protection of the plants by the elicitors is due to the expression of these genes.

MeJA treatment did not reduce the frequency of infections but reduced the development of maceration only under optimal conditions of nitrogen fertilization. The protection induced by MeJA requires an optimal fertilization. MeJA is not involved in the early stages of infection but limits colonization. This protective effect of MeJA under optimal fertilization conditions coincides with an activation of *PR1*, *PR5* and *LOX2* gene expression.

Bion® treatment favored the infection frequency which reflects the penetration success of bacteria, regardless of the level of fertilization. These results suggest that the application of Bion® would promote the early processes of bacterial infection.

On the other hand, symptom progression was promoted by Bion® treatment only the underfertilization condition (2 mM).

These data can be explained by the fact that Bion® would activate the defense pathway involving SA and that this pathway is known to suppress the defense pathway involving Jasmonic acid and ethylene (Pietrerse 2012)involved in the defense against D. dadantii (Fagard et al., 2007). This hypothesis is in agreement with the expression profiles of SA defense genes that are activated by the Bion® and those of the JA pathway that are repressed by the Bion® in our tests.

Overall our results show that there is not a strong correlation between the expression of defense markers studied and the level of protection against D. dadantii. For example, the expression of PDF1.2 and LOX2 is activated under nitrogen deficiency conditions in response to MeJA but this does not result in protection against the bacterium.

The level of differential immunity of plants in the three nitrogen nutrition regimes can only be explained in part by the markers of the two defenses studied. It is possible that a nutritional /

metabolic effect is also partly responsible for the observed immune differences. For example, photoperiod has a very important effect on plant defenses. There is an effect of nitrogen fertilization on the sensitivity of *A. thaliana* grown in short days against *D. dadantii* (Dellagi A. unpubl. data), whereas in our long day conditions no effect of nitrogen fertilization was observed.

In order to determine the impact of the two SA and JA defense pathways in the immune status of plants grown under the three nitrogen regimes, a signaling mutant affected in both the SA and JA pathways, the *npr1.1* mutant was used. This allowed us to uncouple the hormonal signaling effect from the nutritional/metabolic effect.

Using the *npr1.1* mutant, we have shown that this protein is important for natural protection against *D. dadantii* depending on nitrate fertilization. Indeed, the infection frequency increases under 26 mM nitrate and the maceration surfaces increase when npr1.1 mutant plants are under- or over-fertilized.

To know whether the effect of elicitors on plant susceptibilities under different nitrate nutritional conditions observed in Col0 were linked to metabolic effects or defense signaling or both, we investigated the effect of elicitors in the *npr1.1* mutant under the 3 nitrate fertilization conditions.

The effects of elicitors observed on Col0 are : 1)an increase in susceptibility in response to Bion under the 3 nitrate regimes, 2) a protective effect of MeJA at the optimal nitrate regime. These effects are no longer detected in the npr1.1 mutant.

These results indicate that the differences of protection observed against *D. dadantii* involve NPR1 and therefore the SA and JA signaling pathways. In addition, these results show that NPR1 is involved in the establishment of defenses in a manner dependent on nitrogen nutrition.

Overall, we have therefore shown that the plant stage and nitrate fertilization have an impact on the activation of the natural defenses of the plants mediated by the elicitors. The effect of nitrate fertilization appears to be more important than the effect of the developmental stage of the plant. We hypothesize that plants preferentially allocate their energy to grow properly and thus multiply before allocating it to defenses against pathogens. In addition to the possible metabolic effect, our results with *npr1.1* mutant clearly show that defense signaling pathways triggered by elicitors are affected by plant nitrate nutrition. The underlying mechanisms involved in under- and over-fertilization effects on elicitor efficiency need to be further studied. We have thus shown with all of our results that these products have maximum efficiency when the plants are fertilized optimally and that a lack or an excessive input of nitrate has a negative impact on the efficiency of the elicitors.

AKNOLEGMENT

Authors want to thanks the Staphyt Company and the National Agency of Research and Technology (ANRT) which fund the PHD fellowship of C.V. supported by Paris Saclay University and the Jean-Pierre Bourgin Institut (IJPB) for the provision of scientific equipment and the reception within the institute that led to this work.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Impact of different nitrate fertilization levels on A. thaliana physiological traits

Plants were cultivated until the indicated developmental stages (4 stages) under the indicated nutritional conditions. A: Total nitrate content was quantified in healthy plants. Results represent the average from 3 biological replicates, n=30 plants. B: Total amino acid content was quantified. Results represent the average from 2 biological replicates, n=20 plants. C: Number of leaves per plant Results represent the average from 3 biological replicates, n=30 plants. D: Projected rosette surface. Results represent average of 2 biological replicates, n=12 plants. E: Picture of representative plants cultivated under indicated levels of nitrate at indicated developmental stages. Error bars represent standard deviation. Letters indicate similarities or differences based on a *t*-test performed to compare samples of the same stage (p<0.05).

Figure 2: Impact of nitrate fertilization on defense gene expression 48hours after elicitor treatment.

Plants were cultivated until the indicated developmental stages (4 stages) under the indicated nutritional conditions. They were treated with Bion, MeJA or water as a control then harvested 48 h after treatment. Defense gene expression was measured by q-RT-PCR. Data represent normalized transcript levels using Clathrin as a reference gene. A, C, E, G: Indicated defense gene expression following Bion treatment. B, D, F, H: Indicated defense gene expression following MeJA treatment.

Figure 3: Impact of nitrate fertilization on protection against the pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* after elicitor application.

Plants were cultivated until developmental stages 2 (rosette) under the indicated nitrate nutritional conditions. They were treated with Bion, MeJA or water as a control, then inoculated with *D. dadantii* 48 h after elicitor treatment. Symptoms were scored 48 h after inoculation Results represent the average from 2 biological replicates, n= 32plants. A: Frequency of inoculated leaves displaying symptoms is reported on water treated plants. B: Frequency of leaves displaying symptoms is reported depending on water, Me-JA or Bion[®] treatment. A &B: Error bar represent standard deviation. Different letters represent statistically significant differences between elicitor treatments under the same nutritional conditions. (p<0.05 as calculated by Khi²-test of proportions). C: Percentage of macerated leaf surface on water treated plants. D: Percentage of macerated leaf surface. C&D: Error bars represent standard error. Different letters represent standard error.

Figure 4: Impact of nitrate fertilization on protection against the pathogen bacteria *D*. *dadantii* after elicitor application on a *npr1* mutant.

npr1 mutant plants were cultivated until developmental stages 2 (rosette) under the indicated nitrate nutritional conditions. They were treated with Bion, MeJA or water as a control, then inoculated with *D. dadantii* 48 h after elicitor treatment. Symptoms were scored 48 h after inoculation. Results represent the average from 2 biological replicates, n= 32 plants. A: Proportions of leaves displaying symptoms. Error bars represent standard deviation. Different letters represent statistically significant differences between different levels of nitrate

fertilization (p<0.05 as calculated by Khi²-test of proportion). B: Percentage of macerated leaf surface. Error bars represent standard error. Different letters represent statistically significant differences between different levels of nitrate fertilization (p<0.05 as calculated by t-test). C: Proportions of inoculated leaves displaying symptoms on water treated plants. Error bar represent the standard deviation. Different letters represent statistically significant differences between different levels of nitrate fertilization (p<0.05 as calculated by Khi²-test of proportion). D: Percentage of macerated leaf surface. Error bars represent statistically significant different letters represent statistically significant differences between different letters.

REFERENCES

Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Pickett, J., and Ton, J. (2010). Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation: Natural variation in priming of basal resistance. Mol. Plant Pathol., no-no. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00645.x.

Aznar, A., Chen, N. W. G., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaele, D., et al. (2014). Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. PLANT Physiol. 164, 2167–2183. doi:10.1104/pp.113.233585.

Barker, C. (2018). "Systemic Acquired Resistance," in Annual Plant Reviews, eds. J. A. Roberts, D. Evan, M. T. McManus, and J. K. C. Rose (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 209–229. doi:10.1002/9781119312994.apr0032.

Beilmann, A., Albrecht, K., Schultze, S., Wanner, G., and Pfitzner, U. M. (1992). Activation of a truncated PR-1 promoter by endogenous enhancers in transgenic plants. Plant Mol. Biol. 18, 65–78. doi:10.1007/BF00018457.

Blumenthal, D., Mitchell, C. E., Pyšek, P., and Jarošík, V. (2009). Synergy between pathogen release and resource availability in plant invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 7899–7904.

Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., et al. (2001). Growth stage–based phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high throughput functional genomics in plants. Plant Cell 13, 1499–1510.

Caarls, L., Van der Does, D., Hickman, R., Jansen, W., Verk, M. C. V., Proietti, S., et al. (2016). Assessing the Role of ETHYLENE RESPONSE FACTOR Transcriptional Repressors in Salicylic Acid-Mediated Suppression of Jasmonic Acid-Responsive Genes. Plant Cell Physiol., pcw187. doi:10.1093/pcp/pcw187.

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 Gene That Controls Systemic Acquired Resistance Encodes a Novel Protein Containing Ankyrin Repeats. Cell 88, 57–63. doi:10.1016/S0092-8674(00)81858-9.

Carella, P., Wilson, D. C., and Cameron, R. K. (2015). Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature Arabidopsis. Front. Plant Sci. 5. doi:10.3389/fpls.2014.00775.

Chern, M.-S., Fitzgerald, H. A., Yadav, R. C., Canlas, P. E., Dong, X., and Ronald, P. C. (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in Arabidopsis: NPR1 in rice and rice bZIP interactor. Plant J. 27, 101–113. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01070.x.

de Wit, M., Spoel, S. H., Sanchez-Perez, G. F., Gommers, C. M. M., Pieterse, C. M. J., Voesenek, L. A. C. J., et al. (2013). Perception of low red:far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in Arabidopsis. Plant J. 75, 90–103. doi:10.1111/tpj.12203.

Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P. R. The Arabidopsis NPR1/NIM1 Protein Enhances the DNA Binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors. 13.

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 547–552. doi:10.1016/j.pbi.2004.07.005.

Durrant, W. E., and Dong, X. (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. Annu. Rev. Phytopathol. 42, 185–209. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.

Eyles, A., Chorbadjian, R., Wallis, C., Hansen, R., Cipollini, D., Herms, D., et al. (2007). Cross-induction of systemic induced resistance between an insect and a fungal pathogen in Austrian pine over a fertility gradient. Oecologia 153, 365–374. doi:10.1007/s00442-007-0741-z.

Fagard, M., Dellagi, A., Roux, C., Périno, C., Rigault, M., Boucher, V., et al. (2007). Arabidopsis thaliana Expresses Multiple Lines of Defense to Counterattack Erwinia chrysanthemi. Mol. Plant. Microbe Interact. 20, 794–805. doi:10.1094/MPMI-20-7-0794. Fagard, M., Launay, A., Clement, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., et al. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. J. Exp. Bot. 65, 5643–5656. doi:10.1093/jxb/eru323.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43, 205–227. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

Hatcher, P. E. (1995). THREE-WAY INTERACTIONS BETWEEN PLANT PATHOGENIC FUNGI, HERBIVOROUS INSECTS AND THEIR HOST PLANTS. Biol. Rev. 70, 639–694. doi:10.1111/j.1469-185X.1995.tb01655.x.

Heil, M. (2002). Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. Ann. Bot. 89, 503–512. doi:10.1093/aob/mcf076.

Janda, M., Navrátil, O., Haisel, D., Jindřichová, B., Fousek, J., Burketová, L., et al. (2015). Growth and stress response in Arabidopsis thaliana, Nicotiana benthamiana, Glycine max, Solanum tuberosum and Brassica napus cultivated under polychromatic LEDs. Plant Methods 11. doi:10.1186/s13007-015-0076-4.

Jourdan, E., Ongena, M., and Thonart, P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnol Agron Soc Env., 13.

Kazan, K., and Manners, J. M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. J. Exp. Bot. 62, 4087–4100. doi:10.1093/jxb/err142.

Khan, G. A., Vogiatzaki, E., Glauser, G., and Poirier, Y. (2016). Phosphate Deficiency Induces the Jasmonate Pathway and Enhances Resistance to Insect Herbivory. Plant Physiol. 171, 632–644. doi:10.1104/pp.16.00278.

Kieu, N. P., Aznar, A., Segond, D., Rigault, M., Simond-CôTe, E., Kunz, C., et al. (2012). Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to Dickeya dadantii and Botrytis cinerea: Plant iron deficiency and resistance to pathogens. Mol. Plant Pathol. 13, 816–827. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x.

Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. Plant Cell 12, 2339–2350.

Kong, L., Xie, Y., Hu, L., Si, J., and Wang, Z. (2017). Excessive nitrogen application dampens antioxidant capacity and grain filling in wheat as revealed by metabolic and physiological analyses. Sci. Rep. 7. doi:10.1038/srep43363.

Koornneef, A., and Pieterse, C. M. J. (2008). Cross Talk in Defense Signaling. PLANT Physiol. 146, 839–844. doi:10.1104/pp.107.112029.

Kutyniok, M., and Müller, C. (2013). Plant-mediated interactions between shoot-feeding aphids and root-feeding nematodes depend on nitrate fertilization. Oecologia 173, 1367–1377. doi:10.1007/s00442-013-2712-x.

Lemaitre, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., and Masclaux-Daubresse, C. (2008). Enzymatic and Metabolic Diagnostic of Nitrogen Deficiency in Arabidopsis thaliana Wassileskija Accession. Plant Cell Physiol. 49, 1056–1065. doi:10.1093/pcp/pcn081. Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S. C. M., et al. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. Planta 232, 1423–1432. doi:10.1007/s00425-010-1265-z.

Manners, J. M., Penninckx, I. A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., et al. (1998). The promoter of the plant defensin gene PDF1. 2 from Arabidopsis is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. Plant Mol. Biol. 38, 1071–1080.

Mao, P., Duan, M., Wei, C., and Li, Y. (2007). WRKY62 Transcription Factor Acts Downstream of Cytosolic NPR1 and Negatively Regulates Jasmonate-Responsive Gene Expression. Plant Cell Physiol. 48, 833–842. doi:10.1093/pcp/pcm058.

Mengiste, T. (2012). Plant Immunity to Necrotrophs. Annu. Rev. Phytopathol. 50, 267–294. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172955.

Mintoff, S. J. L., Rookes, J. E., and Cahill, D. M. (2015). Sub-lethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in Arabidopsis thaliana. Plant Biol. 17, 703–711. doi:10.1111/plb.12286.

Miranda, K. M., Espey, M. G., and Wink, D. A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. Nitric Oxide 5, 62–71. doi:10.1006/niox.2000.0319.

Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., and Karley, A. J. (2016). Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. Front. Plant Sci. 7. doi:10.3389/fpls.2016.01132.

Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003). Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. Cell 113, 935–944. doi:10.1016/S0092-8674(03)00429-X.

Mozafar, A. (1993). Nitrogen fertilizers and the amount of vitamins in plants: A review. J. Plant Nutr. 16, 2479–2506. doi:10.1080/01904169309364698.

Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., and Niu, D. (2017). Induced Systemic Resistance against Botrytis cinerea by Bacillus cereus AR156 through a JA/ET- and NPR1-Dependent Signaling Pathway and Activates PAMP-Triggered Immunity in Arabidopsis. Front. Plant Sci. 8. doi:10.3389/fpls.2017.00238.

Pato, J., and Obeso, J. R. (2013). Effects of clipping and N fertilization on insect herbivory and infestation by pathogenic fungi on bilberry. Basic Appl. Ecol. 14, 347–356. doi:10.1016/j.baae.2013.02.005.

Percival, G. C. (2001). INDUCTION OF SYSTEMIC ACQUIRED DISEASE RESISTANCE IN PLANTS: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR DISEASE MANAGEMENT IN URBAN FORESTRY. 12.

Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 28, 489–521. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154055. Pieterse, C. M., and Van Loon, L. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 456–464. doi:10.1016/j.pbi.2004.05.006.

Poschenrieder, C., Tolrà, R., and Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? Trends Plant Sci. 11, 288–295. doi:10.1016/j.tplants.2006.04.007.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Prot. 20, 1–11. doi:10.1016/S0261-2194(00)00056-9.

Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F., Durand, R., and Reignault, P. (2007). Iodus 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. Phytochemistry 68, 1156–1164. doi:10.1016/j.phytochem.2007.02.011.

Rigault, M., Buellet, A., Masclaux-Daubresse, C., Fagard, M., Chardon, F., and Dellagi, A. (2017). Quantitative Methods to Assess Differential Susceptibility of Arabidopsis thaliana Natural Accessions to Dickeya dadantii. Front. Plant Sci. 8. doi:10.3389/fpls.2017.00394.

Robert, C., Bancal, M.-O., and Lannou, C. (2004). Wheat Leaf Rust Uredospore Production on Adult Plants: Influence of Leaf Nitrogen Content and Septoria tritici Blotch. Phytopathology 94, 712–721. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.7.712.

Rosen, H. A ModSed Ninhydrin Calorimetric Analysis for Amino Acids. 6.

Sauge, M.-H., Grechi, I., and Poëssel, J.-L. (2010). Nitrogen fertilization effects on Myzus persicae aphid dynamics on peach: vegetative growth allocation or chemical defence?: Peach nitrogen fertilization andMyzus persicaedynamics. Entomol. Exp. Appl. 136, 123–133. doi:10.1111/j.1570-7458.2010.01008.x.

Schwessinger, B., Bart, R., Krasileva, K. V., and Coaker, G. (2015). Focus issue on plant immunity: from model systems to crop species. Front. Plant Sci. 6. doi:10.3389/fpls.2015.00195.

Shaner, G., and Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67, 1051–1056.

Sharp, R. (2013). A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. Agronomy 3, 757–793. doi:10.3390/agronomy3040757.

Spoel, S. H. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. PLANT CELL ONLINE 15, 760–770. doi:10.1105/tpc.009159.

Spoel, S. H., Johnson, J. S., and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 18842–18847. doi:10.1073/pnas.0708139104.

Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M., et al. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against Plasmopara viticola. Physiol. Mol. Plant Pathol. 79, 89–96. doi:10.1016/j.pmpp.2012.05.004.

Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. Science 321, 952–956. doi:10.1126/science.1156970.

Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., et al. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 15107–15111. doi:10.1073/pnas.95.25.15107.

Tian, Q., Chen, F., Liu, J., Zhang, F., and Mi, G. (2008). Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. J. Plant Physiol. 165, 942–951. doi:10.1016/j.jplph.2007.02.011.

Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M. C., Rodenburg, N., Pauwels, L., et al. (2013). Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCOI1-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. Plant Cell 25, 744–761. doi:10.1105/tpc.112.108548.

Van Wees, S. C. M. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. 13.

Veresoglou, S. D., Barto, E. K., Menexes, G., and Rillig, M. C. (2013). Fertilization affects severity of disease caused by fungal plant pathogens. Plant Pathol. 62, 961–969. doi:10.1111/ppa.12014.

Vos, I. A., Moritz, L., Pieterse, C. M. J., and Van Wees, S. C. M. (2015). Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. Front. Plant Sci. 6. doi:10.3389/fpls.2015.00639.

Walters, D. R. (2009). Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. Crop Prot. 28, 459–465. doi:10.1016/j.cropro.2009.01.009.

Walters, D., Walsh, D., Newton, A., and Lyon, G. (2005). Induced Resistance for Plant Disease Control: Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. Phytopathology 95, 1368–1373. doi:10.1094/PHYTO-95-1368.

Wang, D., Xu, Z., Zhao, J., Wang, Y., and Yu, Z. (2011). Excessive nitrogen application decreases grain yield and increases nitrogen loss in a wheat–soil system. Acta Agric. Scand. Sect. B - Soil Plant Sci. 61, 681–692. doi:10.1080/09064710.2010.534108.

Withers, J., and Dong, X. (2017). Post-translational regulation of plant immunity. Curr. Opin. Plant Biol. 38, 124–132. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.004.

Xu, G., Fan, X., and Miller, A. J. (2012). Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. Annu. Rev. Plant Biol. 63, 153–182. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105532.

Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., et al. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. Plant Biotechnol. J. 5, 313–324. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00243.x.

Zarattini, M., Launay, A., Farjad, M., Wénès, E., Taconnat, L., Boutet, S., et al. (2017). The bile acid deoxycholate elicits defences in Arabidopsis and reduces bacterial infection: Deoxycholate elicits defences in Arabidopsis. Mol. Plant Pathol. 18, 540–554. doi:10.1111/mpp.12416.

Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., et al. NPR1 Differentially Interacts with Members of the TGA/OBF Family of Transcription Factors That Bind an Element of the PR-1 Gene Required for Induction by Salicylic Acid. 12. FIGURES



Figure 1



Partie 6. Annexe

Figure 2



Figure3





Figure 4

Annexe 10 Article scientifique publié (à posteriori de la thèse) :

frontiers in Plant Science

ORIGINAL RESEARCH published: 26 May 2020 doi: 10.3389/fpls.2020.00583



Plant Defense Stimulator Mediated Defense Activation Is Affected by Nitrate Fertilization and Developmental Stage in *Arabidopsis thaliana*

Camille Verly^{1,2}, Atsin Claude Roméo Djoman^{1,2}, Martine Rigault¹, Frédéric Giraud², Loïc Rajjou¹, Marie-Emmanuelle Saint-Macary³ and Alia Dellagi^{1*}

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Versailles, France, ² Staphyt-Service L&G/BIOTEAM, Martillac, France, ³ Staphyt – BIOTEAM, Marsillargues, France

OPEN ACCESS

Edited by: Paolo Carletti, University of Padua, Italy

Reviewed by:

Zhonglin Mou, University of Florida, United States Dongdong Niu, Nanjing Agricultural University, China

> *Correspondence: Alia Dellagi alia.dellagi@agroparistech.fr

Specialty section:

This article was submitted to Crop and Product Physiology, a section of the journal Frontiers in Plant Science

Received: 18 October 2019 Accepted: 17 April 2020 Published: 26 May 2020

Citation:

Verly C, Djoman ACR, Rigault M, Giraud F, Raljou L, Saint-Macary M-E and Dellagi A (2020) Plant Defense Stimulator Mediated Defense Activation Is Affected by Nitrate Fertilization and Developmental Stage in Arabidopsis thaliana. Front. Plant Sci. 11:583. doi: 10.3389/fols.2020.00583 Plant defense stimulators, used in crop protection, are an attractive option to reduce the use of conventional crop protection products and optimize biocontrol strategies. These products are able to activate plant defenses and thus limit infection by pathogens. However, the effectiveness of these plant defense stimulators remains erratic and is potentially dependent on many agronomic and environmental parameters still unknown or poorly controlled. The developmental stage of the plant as well as its fertilization, and essentially nitrogen nutrition, play major roles in defense establishment in the presence of pathogens or plant defense stimulators. The major nitrogen source used by plants is nitrate. In this study, we investigated the impact of Arabidopsis thaliana plant developmental stage and nitrate nutrition on its capacity to mount immune reactions in response to two plant defense stimulators triggering two major defense pathways, the salicylic acid and the jasmonic acid pathways. We show that optimal nitrate nutrition is needed for effective defense activation and protection against the pathogenic bacteria Dickeya dadantii and Pseudomonas syringae pv. tomato. Using an npr1 defense signaling mutant, we showed that nitrate dependent protection against D. dadantii requires a functional NPR1 gene. Our results indicate that the efficacy of plant defense stimulators is strongly affected by nitrate nutrition and the developmental stage. The nitrate dependent efficacy of plant defense stimulators is not only due to a metabolic effect but also invloves NPR1 mediated defense signaling. Plant defense stimulators may have opposite effects on plant resistance to a pathogen. Together, our results indicate that agronomic use of plant defense stimulators must be optimized according to nitrate fertilization and developmental stage.

Keywords: defense (induced), elicitor, *Dickeya dadantii*, nitrate, developmental stage, Bion, Methyl-jasmonate, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

May 2020 | Volume 11 | Article 583

1

INTRODUCTION

As sessile organisms, plants are exposed to many biotic stresses such as pathogenic microorganisms and herbivores. They have developed the capacity to activate defenses in response to pathogen attacks thus leading to different degrees of resistance which may be effective at the site of infection or systemically (Jones and Dangl, 2006; Wirthmueller et al., 2013; Miller et al., 2017; Alhoraibi et al., 2019; Shine et al., 2019). Complex signaling networks are activated according to the type of invading organism (Bürger and Chory, 2019; Shine et al., 2019; Wang et al., 2020). Defense-related signaling responses involve phosphorylation events, ionic fluxes and accumulation of phytohormones leading to transcriptional activation of genes coding for the synthesis of antimicrobial compounds such as phytoalexins or pathogenesis related (PR) proteins (van Loon et al., 2006; Pieterse et al., 2014; Piasecka et al., 2015; Klessig et al., 2018; Wang et al., 2020).

Salicylic acid (SA) is one of the major hormones involved in plant immunity and was described as being mainly involved in plant protection against biotrophic or hemibiotrophic pathogens (Pieterse and Van Loon, 1999; Glazebrook, 2005; Zhang and Li, 2019). Defense genes activated by SA include PR5, encoding a thaumatin-like protein and PR1, encoding an antimicrobial protein with sterol binding and peptide signaling functions (Uknes et al., 1992; Chen et al., 2014; Gamir et al., 2017). Jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) were reported to be involved in plant protection against necrotrophic pathogens (Pieterse and Van Loon, 1999; Glazebrook, 2005; Mengiste, 2012) and may be induced by non-pathogenic plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (Backer et al., 2018). JA/ET-dependent responses promote activities of peroxidases, polyphenol oxidases and lipoxygenases (Van Wees et al., 1999; Ruan et al., 2019). Genes encoding the defensin PDF1.2 and the lipoxygenase LOX2, are widely used as markers of the JA/ET defense pathway (Manners et al., 1998; Thomma et al., 1998; Yang et al., 2019). The JA pathway, with LOX2 as a marker gene, is effective against insect pests (Glauser et al., 2009).

Several reports indicate the existence of cross-talks between those defense signaling pathways (Pieterse et al., 2011; Thaler et al., 2012; Vos et al., 2015; Bürger and Chory, 2019; Yang et al., 2019). An antagonism was generally described between SA dependent defenses and JA/ET dependent defenses (Koornneef and Pieterse, 2008; Leon-Reyes et al., 2010; Van der Does et al., 2013; Caarls et al., 2017; Li et al., 2019; Yang et al., 2019). The mechanisms underlying this antagonism imply transcriptional regulations involving transcription factors such as WRKY70 and ROXY19 (Li et al., 2004, 2019; Ndamukong et al., 2007; Caarls et al., 2015). Interestingly, synergism between SA and JA pathways was also described (Mur et al., 2006; Liu et al., 2016).

The NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 protein (NPR1) (Cao et al., 1997; Mou et al., 2003; Durrant and Dong, 2004) is a key defense regulator, known to be involved in both SA and JA/ET signaling pathways (Pieterse and Van Loon, 2004; Withers and Dong, 2017; Barker, 2018; Backer et al., 2019). Its role in SA defense signaling has been well-studied and described. NPR1 binds SA (Wu et al., 2012;

Manohar et al., 2015) and is thought to be a co-receptor with two other proteins NPR3 and NPR4 which also bind SA and act as transcriptional repressors of the SA response (Kuai et al., 2015; Withers and Dong, 2016; Ding et al., 2018). Following SA perception, NPR1 binds to TGA transcription factors leading to the transcription of PR genes (Després et al., 2000; Kinkema et al., 2000; Zhou et al., 2000; Chern et al., 2001; Kuai et al., 2015). The mechanism by which NPR1 is involved in JA/ET defenses remains unclear. An A. thaliana npr1 mutant plant fails to induce PR gene expression in response to SA, while NPR1 overexpression leads to an up-regulation of the PR genes and enhanced disease resistance (Cao et al., 1998). NPR1 is also involved in the activation of JA/ET dependent defenses but probably via an alternate mechanism. An A. thaliana npr1 mutant is unable to activate the JA/ET dependent defenses in response to PGPR (Koornneef and Pieterse, 2008; Nie et al., 2017). Overexpressing engineered forms of NPR1 retained in the plant cytosol results in the suppression of JA signaling (Spoel et al., 2003, 2007; Yuan et al., 2007) indicating that the antagonistic effect of SA over JA signaling requires cytosolic NPR1. Spoel et al. (2003) suggested a cytoplasmic role of NPR1 in the cross-talk between JA/ET and SA defense pathways.

Different environmental conditions may influence plant pathogen interactions such as the type of light (Kazan and Manners, 2011; De Wit et al., 2013; Janda et al., 2015; Mintoff et al., 2015) mineral nutrition (Poschenrieder et al., 2006; Walters et al., 2007; Fagard et al., 2014; Aznar et al., 2015) or water availability (Nejat and Mantri, 2017). The impact of fertilizers, in particular nitrogen fertilization, on plant-pathogen interactions is well-documented however, the underlying mechanisms remain unclear (Shaner and Finney, 1977; Eyles et al., 2007; Pato and Obeso, 2013; Veresoglou et al., 2013; Fagard et al., 2014; Mur et al., 2017; Sun et al., 2020).

Nitrogen is present in the form of NO_3^- , NH_4^+ or amino acids, the availability of which depends on physical factors such as pH and temperature. Plants adapted to acidic pH tend to take up NH4 or amino-acids and plants adapted to higher pH and aerobic soils (which is the case of most arable lands) tend to prefer NO3 (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Nitrate is taken up at the root level by two different types of transport systems (Krapp et al., 2014; Wang et al., 2018): (1) a high affinity system involving the NRT1/NPF (nitrate transporter 1/peptide transporter family) family of transporters, (2) a low affinity system involving the NRT2 family of transporters. Following uptake, NO₃⁻ is reduced to NO₂⁻ by a cytosolic nitrate reductase, and then NO₂⁻ is further reduced by a plastidial nitrite reductase into NH⁺₄ (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Ammonium is incorporated into amino acids in plastids via glutamate synthase (GS)/glutamine-2-oxoglutarateaminotransferase (GOGAT) cycle (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Krapp et al., 2014; Wang et al., 2018). Nitrogen fertilization has been a major factor in improving crop productivity in the last decades (Hirel et al., 2007; Wang et al., 2018) but may increase disease impact depending on the considered pathosystem (Fagard et al., 2014; Mur et al., 2017; Sun et al., 2020). A better understanding of the mechanisms by which nutrient elements

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

2

influence plant defenses may be useful to improve cultural practices in order to optimize fertilization and reduce pesticide use thus decreasing the environmental impact of agriculture.

Emerging new plant protection strategies based on the exploitation of the capacity of plants to mount efficient immune responses are widely explored and are expected to allow the reduction of pesticide use (Ramamoorthy et al., 2001; Heil and Bostock, 2002; Bektas and Eulgem, 2015). These strategies rely on the use of plant defense stimulators which trigger plant defenses before or upon pathogen attack. Such plant defense stimulators include Bion® which contains the bioactive molecule S-acibenzolar-S-Methyl activating the SA dependent defense pathway and is used in agriculture to protect tomato or apple against pathogens. However the effectiveness of plant defense stimulators in the field remains uncertain and may depend on different internal and/or external factors such as the plant developmental stage, temperature, drought, and/or mineral nutrition (Walters et al., 2007; Steimetz et al., 2012; Carella et al., 2015).

Our work addresses the combined impacts of the plant developmental stage and nitrogen nutrition on the efficiency of plant response to plant defense stimulators. We show that plant response to plant defense stimulators depends on both developmental stage and nitrogen nutrition with a stronger effect of nutrition.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Seeds of *Arabidopsis thaliana* Col-0 WT accession were obtained from Versailles Arabidopsis Stock Center (INRA Versailles France) and seeds of *npr1-1* mutant (N3726) in Col-0 WT background (Cao et al., 1997) were obtained from NASC¹. Seeds were sown in unfertilized soil with different nitrate fertilization conditions 2, 10, and 26 mM of nitrate (**Supplementary Table 1**), in a growth chamber under the following conditions; 18 h of light 21°C, 6 h of dark 19°C, 70% relative humidity). Plants were grown until four different stages: Stage 1: plantlet (2 weeks after sowing (A.S.), Stage 2: vegetative stage (3 weeks A.S.), Stage 3: floral induction (4 weeks A.S.), Stage 4: flowering time (5 weeks A.S.).

Nitrate Content Quantification

Leaves were harvested 48 h after treatment and immediately crushed in liquid nitrogen then stored at -80° C. Nitrate content is measured by a spectrophotometric method by comparison with a NaNO₃ scale (Miranda et al., 2001). Ten milligrammes of frozen leaf powder were incubated in 300 µL of sterile distilled water during 20 min on ice. Samples were centrifuged at 15,000 rpm at 4°C during 20 min and supernatant was harvest twice. Ten microliters of supernatant were mixed with 90 µL of water and 100 µL of Miranda reagent (0.5M HCl, 0.25% Vanadium chloride, 0.005% N-1-naphtyethylendiamin, 0.1% Sulfanilamide) and incubated during

¹http://www.arabidopsis.info

Elicitors and Nitrate Nutrition

2 h at 60°C. Concentration of nitrate was then calculated based on a standard curve obtained with NaNO₃ standard solutions by spectrophotometry at 540 nm. For each experiment 20 rosettes were used.

Amino Acid Quantification

Amino acid content was measured by a spectrophotometric method adapted from Rosen (1957). Amino acids were extracted by vortexing 150 mg of frozen leaf powder with 1 mL of 2% 5-sulfosalicylic acid (w/v in water). Samples were then centrifuged at 13,000 rpm during 10 min and supernatant was harvested for the following steps. Fifty microliters of samples were mixed with 150 µL of water, 100 µL of cyanide acetate solution (0.2 mL of 10 mM KCN, 9.8 mL of 2.65M sodium acetate, 8% acetic acid pH 5.35) and 100 µl of ninhydrine solution (3% ninhydride in Ethylene glycol monomethylether) then incubated during 15 min at 100°C under fume hood, before adding 1 mL of 50% isopropanol. Samples were placed on ice to decrease temperature to room temperature. Two hundred microliters of samples were used to quantify amino acid content by comparison with standard solutions of L-glutamine by spectrophotometry at 570 nm. For each experiment 20 rosettes were used.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described in Aznar et al. (2014). For each experiment 6 to 10 plants were used.

Quantitative PCR

Quantitative PCR reactions were carried out in 10 µL, with 5 µL of SybrGreen® (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) mix, 0.3 µM of each primer, and 2.5 µL of cDNA. Quantitative PCRs were carried out using a CFX-96 Real Time PCR system thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). The raw data obtained were processed using the CFX manager software (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). For each analysis, a cycle threshold (Ct) value was extracted and then transformed into Starting Quantity (SQ) values based on a standard curve equation. Consequently, for each condition, since PCRs were performed in triplicate, 3 SQ values were obtained for each sample and then averaged (geometric mean of SQ values). The geometric mean of the SQ values obtained for each gene of interest was then divided by the geometric mean of SQ values obtained for the reference gene. Normalized transcript level was then obtained and expressed as arbitrary units. Clathrin was used as a reference gene because it was stably expressed under the different stages and the different nutritional conditions. Experiments were performed three times with similar results. Representative data are shown.

Plant Treatment With Plant Defense Stimulators

In all experiments, plants were kept under cover 24 h before plant defense stimulator treatment. Then, plants were sprayed with

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

3

methyl-jasmonate (at 0.1 mM with 0.5% DMSO); the commercial plant defense stimulator Bion® (at 0.015% in water w/v), or water. The Bion® concentration was determined based on a calculation starting from the recommended dose for its agronomic use. The recommended Bion®, dose for tomato in the field (0.05 kg/ha) and was adapted in volume concentration (g/L) considering a field spray at 330 L/ha, this corresponds to a 0.015% in water w/v Bion® solution. Spraying of the different elcicitors was performed separately to avoid cross contamination. Plants were kept under cover and grown in the same growth chamber. For each plant defense stimulator treatment, they were kept in separate boxes. Plants were then harvested 24 or 48 h following treatment, frozen in liquid nitrogen in order to extract RNA and amplify genes by qRT-PCR. For protection assays, plants were inoculated with the pathogenic bacteria as indicated below 48 h following plant defense stimulator treatments.

Bacterial Strains and Inoculation Method

The *Dickeya dadantii* 3937 strain was obtained from our own collection. Bacteria were grown in Luria-Bertani medium. Forty-eight hours following water or plant defense stimulator treatment, bacterial inoculation was performed. For plant inoculation, a bacterial suspension at an OD600 of 0.1 (10⁸ C.F.U./mL) made up in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) was used. Plants were covered during the whole assay to obtain saturating humidity and facilitate infection. To inoculate plants, a small hole was made with a needle in the leaf, and then, 5 μ L of a bacterial suspension was deposited on the hole. In each experiment, 16 plants were inoculated for each condition and two leaves per plant were inoculated.

Disease severity levels were then scored 48 h post-inoculation (p.i) identified as the best timing for comparing disease severity (Rigault et al., 2017). The proportion of macerated surface in each inoculated leaf was calculated. The surface of the maceretad lesion and the surface of the corresponding leaves were measured using the open source software ImageJ https://imagej.nih.gov/ij/. This allowed calculating an average of lesion surface (in cm²) and an average of proportion of macerated surface for each leaf.

The Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 bacterial strain was from our own stock. Forty-eight hours following plant defense stimulator treatment, plants were sprayed with a bacterial suspension at a concentration of 5×10^7 cfu mL⁻¹ in sterile water containing 0.01% Silwett. In planta bacterial populations were monitored 48 h after inoculation. Leaves were harvested then bacterial numbering was performed by tissue grinding followed by serial dilutions plated on King B medium with 60 µg/mL Rifampicin (King et al., 1954).

For each experiment 6 to 8 plants were used and 3 to 4 leaves were harvested or scored. This allowed us to analyze at least 20 leaves for each experiment.

Statistical Analysis

All experiments were performed in three to four independent biological replicate. The size of all the samples is indicated in the figure legends. EXCEL-STAT plugin was used to perform statistical analysis on data.

RESULTS

Plant Growth Modifications Under Different Nitrate Fertilization Conditions

The objective of this work was to evaluate both the effect of nitrogen nutrition and the developmental stage on defense activation by plant defense stimulators. For this purpose, different growth conditions in terms of nitrate supply and plant age were considered. In order to study the effect of developmental stages on defense activation in Arabidopsis, four developmental stages were considered based on the physiological steps representing four key phases in A. thaliana life cycle described in Boyes et al. (2001). In order to study the effect of nitrate nutrition, we chose to study three different levels: (1) limitation, (2) optimal fertilization, and (3) over-fertilization. In order to determine the nitrate concentrations required for these three physiological conditions, the following criteria were considered. A previous work on Arabidopsis nitrogen metabolism showed a differential accumulation of nitrogen related metabolites as well as enzymatic activities in plants cultivated under 2 and 10 mM nitrate (Lemaître et al., 2008). Plants grown under 10 mM nitrate displayed better growth than those grown under 2 mM nitrate (Loudet et al., 2003; Lemaître et al., 2008). Based on these data, the nitrate limitation nutrition used in the present study, was 2 mM nitrate. For the optimal growth conditions, in the present study, we used the 10 mM nitrate. Although, under agronomic conditions over-fertilization occurs quite regularly, it is unclear how over fertilization can affect plant defenses. To address this question, we determined a nitrate level higher than 10 mM, resulting in a reduced plant growth without being lethal or affecting too much plant development. For this purpose, plants grown under 20, 26, and 50 mM nitrate were tested. The 26 mM nitrate concentration slightly affected Arabidopsis growth (Figure 1) without being lethal; while 20 mM did not significantly affect plant growth and 50 mM was toxic (data not shown). To confirm that the three nitrate fertilization conditions have different impacts on plant physiology and/or development under the three growth conditions, we determined the impact of nitrate nutrition on some physiological and/or metabolic traits (Figure 1). Nitrate and amino acid contents were monitored. Plant growth was quantified via the number of leaves per plant and the projected rosette surface. Plants grown under limiting nitrate levels (2 mM) displayed lower nitrate, amino acid and reduced leaf number and rosette surface at stage 2 to stage 4. This indicates that the lower nitrate 2 mM supply has an impact on plant nitrogen metabolism that can be observed starting from the stage 2. Although growing plants under 26 mM nitrate did not result in an increase in nitrate or amino acid content, the number of leaves (stage 4) and the projected rosette area (stage 3) were affected compared to those grown under 10 mM nitrate (Figure 1). This indicates that 26 mM nitrate supply has a negative impact on plant development which can be observed starting from stage 3.

Together these data indicate that the three nutritional regimes impacted differently the plant physiological status and nitrogen metabolism. The 2 mM nitrate nutritional condition is limiting

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

4

Elicitors and Nitrate Nutrition



and 26 mM nitrate nutritional condition corresponds to an over-fertilization, while 10 mM nitrate corresponds to an optimal nitrate supply.

Plant Developmental Stage Affects the Capacity to Activate Defense Gene Expression in Response to Plant Defense Stimulators

During the different phases of plant development, important metabolic and transcriptomic changes occur which may affect basal defenses and activation of immune responses. These modifications could account for the variability of plant defense stimulator activity under agronomic conditions. To address this point, Arabidopsis plants were grown until the four developmental stages considered as key steps in Arabidopsis life cycle (Boyes et al., 2001). Three nitrate fertilization levels were applied (2, 10, and 26 mM). Plants were treated with either MeJA, which is known to activate the JA/ET defense pathway, or with Bion®, which is known to activate the SA pathway. Expression profiles of two marker genes of the SA pathway (PR1 and PR5) and two marker genes of the JA/ET pathway (LOX2 and PDF1.2) were monitored by qRT-PCR. To determine the time post-plant defense stimulator treatment the most relevant to monitor defense gene expression, plants were collected 24 and 48 h following Bion® treatment at the four developmental stages and under 2 and 10 mM nitrate nutritional conditions. These experiments showed that the highest level of gene expression was reached 48 h after treatment (Supplementary Figure 1). Thus, the rest of the experiments were performed by analyzing gene expression 48 h after plant defense stimulator treatment. In order to determine the effect of the plant developmental stage on defense gene expression, normalized transcript levels were compared under each treatment and each nitrate nutrition separately (Figure 2). Figure 2 shows that plant developmental stage significantly affects most of the defense responses. Basal defenses are significantly affected by developmental stage as indicated by the expression profiles of the four marker genes in control pants (Figures 2A-D). The effect of developmental stage on defense activation by plant defense stimulators is significant under the three nutritional conditions. Interestingly, nitrate supply impacts the effect of stage on defense activation (Figure 2 and Supplementary Figures 2, 3). For example, at 2 mM nitrate supply, PR1 and PR5 transcript levels in response to Bion® are significantly reduced at stage 4 compared to other stages, while at 10 mM nitrate supply PR1 and PR5 transcript levels are globally high at all stages. Although the transcript level of PR1 and PR5 are low following MeJA treatment, they accumulate differentially depending on the developmental stage when plants are grown under 10 mM nitrate. There is no stage effect on PR1 and PR5 transcript levels in response to MeJA under limiting nitrate or over-fertilization. The transcript levels of the two JA/ET markers genes PDF1.2 and LOX2 are affected by the developmental stage whatever the nitrate nutrition. These two markers are more highly expressed at stage 2 following MeJA treatment under 2 and 10 mM nitrate, compared to the other stages. Together these data indicate that depending on the nutrition, developmental stage plays crucial role in the plant defense system.

Nitrate Fertilization Affects Plant Capacity to Activate Defense Gene Expression in Response to Plant Defense Stimulators

To determine whether nitrate fertilization affects defense activation, plants were treated with either MeJA or with ${\rm Bion}^{\odot}$

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

5



and expression profiles of two maker genes of the SA pathway (*PR1* and *PR5*) and two marker genes of the JA/ET pathway (*LOX2* and *PDF1.2*) were monitored by qRT-PCR 48 h after plant defense stimulator treatment (Figure 3). Figure 3 shows that nitrate nutrition significantly affects most of the defense

responses. Basal defenses are in most cases significantly affected by nitrate as indicated by the expression profiles of the four marker genes in control pants (Figure 3). At all developmental stages, nitrate supply significantly affected the expression of the SA markers following Bion[®] treatment and the highest expression

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

6

Elicitors and Nitrate Nutrition

of these markers was obtained under 10 mM nitrate. Nitrate supply significantly affected the expression levels of the JA/ET defense markers following MeJA treatment. Interestingly, Bion® treatment results in the down regulation of PDF1.2 and LOX2 genes under all nitrate treatments (Supplementary Figures 2, 3).

Together these data indicate that plant defense stimulator mediated defense gene activation depends both on the stage and on nitrate nutritional condition.

Nitrate Supply Affects Plant Defense Stimulator Mediated Protection Against Dickeya dadantii and Pseudomonas syringae pv. tomato

The enterobacterium D. dadantii is a necrotrophic plant pathogen able to infect A. thaliana plants causing maceration symptoms as a results of the secretion of large amounts of plant cell degrading enzymes (Reverchon and Nasser, 2013). The model plant A. thaliana, in turn, activates different defenses to limit infection, such as the JA/ET defense pathway and the accumulation of reactive oxygen species (Fagard et al., 2007). The Gram negative bacterium *P. syringae* pv. tomato is a model plant pathogen (Xin and He, 2013). The SA signaling pathway is known to promote Arabidopsis defense against P. syringae pv. tomato and it is commonly used to monitor plant defense stimulator activities (McCann et al., 2012; Rufián et al., 2019). To know whether nitrate fertilization may influence the plant defense stimulators mediated protection, we decided to use plants at vegetative stage (stage 2). Indeed, at stage 2, differential expression profiles of defense genes were observed in response to Bion® and MeJA allowing a better interpretation of the putative connection between protection and defenses. In addition, this stage is commonly used in most studies, allowing a better interpretation of the data compared to the literature (Rufián et al., 2019). Two days after plant defense stimulator or water treatment, plants were inoculated with P. syringae pv. tomato or D. dadantii.

To know whether nitrate supply affects *A. thaliana* defenses against *P. syringae* pv. *tomato*, bacterial populations were monitored in control plants and compared with Bion[®] or MeJA treated plants under the three nitrate supply conditions. Symptoms caused by *P. syringae* pv. *tomato* can be seen in **Supplementary Figure 5**. Nitrate limitation (2 mM) resulted in reduced plant susceptibility to *P. syringae* pv. *tomato* in control plants, indicating that basal defenses against *P. syringae* pv. *tomato* are more efficient in nitrate starved plants than in optimally or over-fertilized plant (Figure 4A). Bion[®] treatment resulted in plant protection under 2 and 10 mM nitrate supply but was inefficient on over-fertilized plants. Interestingly, over-fertilization resulted in enhanced plant susceptibility to *P. syringae* pv. *tomato* following MeJA treatment (Figure 4B).

To know whether nitrate supply affects basal *A. thaliana* susceptibility to the *D. dadantii*, symptom severity on water treated control plants were compared under the three nitrate supply conditions. The level of nitrate fertilization had no effect on the proportion of macerated leaf surface in non-elicited plants (Figure 5A). Following MeJA treatment, the proportion

of leaf macerated surface was decreased under optimal nitrate supply (10 mM), but no effect of MeJA was observed when plants were under-fertilized or over-fertilized (Figures 3B,D and Supplementary Figure 4). These data indicate that MeJA is efficient to protect *A. thaliana* against *D. dadantii* under optimal nitrate supply only. The proportion of leaf macerated surface was increased following Bion[®] treatment under 2 mM nitrate fertilization but unaffected by Bion[®] under 10 or 26 mM nitrate nutritional conditions.

These data indicate that the level of nitrate fertilization influences the capacity of the plant to activate efficient defenses following plant defense stimulator treatments against necrotrophic pathogens such as *D. dadantii* and hemibiotrophic pathogens such as *P. syringae* pv. tomato.

NPR1 Gene Is Involved in Nitrate Dependent Plant Defense Stimulator Mediated Defense Responses

As a key player in plant immunity, NPR1 was shown to be involved in both SA and JA/ET signaling pathways (Spoel et al., 2003; Pieterse and Van Loon, 2004; Mao et al., 2007). We investigated whether nitrate supply affected susceptibility of the npr1-1 mutant to D. dadantii. For this purpose, symptom severity on Col-0 WT plants were compared to that of npr1-1 mutant in water treated control plants under the three nitrate supply conditions. Over-fertilization and under-fertilization increased npr1-1 mutant susceptibility compared to WT (Figure 5A) indicating that NPR1 is required for the plant basal defense against D. dadantii. Plant defense stimulators activity was monitored in the npr1-1 mutant background to know whether NPR1 was involved in the plant response to plant defense stimulators under the different nitrate nutritional conditions. Interestingly, both plant defense stimulator treatments failed to show any effect on plant disease severity in the npr1-1 mutant whatever the level of fertilization used (Figure 5B). Thus, while we observed on WT plants an impact of Bion® and MeJA on plant protection against D. dadantii, no effect was observed on the *npr1-1* mutant plants.

These data suggest that nitrate dependent defense activation by plant defense stimulators requires a functional plant defense signaling machinery which likely involves *NPR1*.

To investigate whether the role of *NPR1* in protection against *D. dadantii* following MeJA treatment and increased susceptibility to *D. dadantii* following Bion[®] treatment would involve the SA and/or the ET/JA, defense gene expression was monitored in the *npr1-1* mutant and compared to their expression in the Col-0 WT. For this purpose, *npr1-1* mutant plants were grown until stage 2 under 2, 10, or 26 mM, treated with water (control), Bion[®] or MeJA and transcript levels of defense genes were monitored by qRT-PCR. Figures 6A,B indicates that, as expected, the expression level of the two SA markers genes *PR1* and *PR5* is drastically reduced in the *npr1-1* mutant compared to Col-0 WT. The expression profiles of *LOX2* was similar in Col-0 WT and *npr1-1* under the nutrition conditions of 2 and 10 mM nitrate. Interestingly, the *LOX2* transcript level was globally lower in *npr1-1* plants under 26 mM

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

7



Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

8


Elicitors and Nitrate Nutrition



nitrate compared to Col-0 WT plants (Figure 6C) which could explain the enhanced susceptibility of to *D. dadantii* in *npr1-1* naive plants compared to Col-0 WT naïve plants (Figure 5A). The increased susceptibility of Col-0 WT plants to *D. dadantii* under 2 mM nitrate following Bion[®] treatment (Figure 5B) is consistent with a down-regulation of *PDF1.2* and *LOX2* expression in Col-0 following Bion[®] treatment under 2 mM nitrate (Figures 6C,D). Although this increased susceptibility is abolished in the *npr1-1* mutant under these conditions, the down-regulation of *PDF1.2* and *LOX2* is still observed.

The protection of Col-0 WT plants agianst *D. dadantii* under 10 mM nitrate following MeJA treatment (Figure 5B) is consistent with an up-regulation of *LOX2* expression in Col-0 following MeJA treatment under 10 mM nitrate (Figure 6C). Although this protection is abolished in the *npr1-1* mutant, under these conditions, the up-regulation of *LOX2* is still observed.

Taken together, these data indicate that *NPR1* plays an important role in modulating Arabidopsis defenses depending on nitrate supply.

DISCUSSION

Most of the plant protection treatments directly target invading pathogens. In general, this kind of practices has proven to cause pathogen resistance toward pesticides, thus reducing their efficiency (Hahn, 2014). In addition, pesticide use has detrimental effects on animal health and environment. It is nowadays obvious that alternate and sustainable plant protection strategies are needed to avoid the detrimental effects of pesticide and reduce pathogen adaptation (Pretty, 2018). The use of plant defense stimulators is one of the proposed alternate crop protection strategies which is being investigated by scientists and farmers because they don't directly target the pathogen and they provide a wide protection range. However, plant defense stimulators efficiency is controversial. While they can protect plants from pathogen infections under controlled conditions, their efficiency in the field is often unstable (Bektas and Eulgem, 2015).

In this work, we investigated the possibility that plant responses to plant defense stimulators could be affected by the developmental stage and nitrogen nutrition. The objective was to determine whether by adjusting fertilization and targeting specific developmental stages, plant defense stimulators use could be optimized.

Plant intrinsic susceptibility to pathogens depends on plant developmental stage and nitrogen status. For instance, the bacterial fire blight causing pathogen Erwinia amylovora preferentially infects growing tissues and apple flowers (Malnoy et al., 2011). Conversely, senescence can be a factor which favors necrotrophic pathogen infection while it prevents biotrophic pathogen infections (Häffner et al., 2015). On the other hand, plant intrinsic susceptibility to pathogens can vary depending on the nitrogen fertilization. Complex interactions have been described concerning the connection between plant nitrogen status and tolerance to pathogens (Fagard et al., 2014; Mur et al., 2017; Sun et al., 2020). For instance, nitrate fertilization increases tomato tolerance to the fungal necrotroph Botrytis cinerea (Lecompte et al., 2010); while it increases the susceptibility of A. thaliana to this fungus (Fagard et al., 2014). Nitrogen fertilization has an impact on defense activation (Kruse et al., 2007; Kutyniok and Müller, 2013; Mur et al., 2017; Zarattini et al., 2017; Farjad et al., 2018) as well as on pathogen virulence factors (Van den Ackerveken et al., 1994; Snoeijers et al., 2000; Robert et al., 2004). Thus, the impact of nitrogen

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

9



Elicitors and Nitrate Nutrition



status on plant tolerance/susceptibility does not exclusively depend on nutritional availability to pathogen, but involves complex mechanisms.

The above-cited reports describe the impact of the developmental stage and nitrogen fertilization on plant intrinsic susceptibility to pathogens. However, very few data are available about the impact of the developmental stage and nitrogen fertilization on plant defense stimulator mediated defense activation. Our data show that the plant defense responses to two plant defense stimulators, which trigger two major defense signaling pathways are affected by both the developmental stage and nitrate nutrition in *A. thaliana*. Activation of SA pathway by Bion[®] was dependent of both the nitrate supply and the developmental stage (Figures 2, 3), indicating that the fertilization and physiological stage parameters should be considered when using Bion[®] as an plant defense stimulator. Optimal nitrate nutritional conditions were the most favorable conditions for SA defense activation by Bion[®]. Dietrich et al. (2004) showed that nitrogen limitation resulted in reduced defense

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

10





induction by Bion[®]. In a transcriptomic approach to characterize the combined effect of pathogen and nitrogen deficiency, Farjad et al. (2018) showed that the upregulation of a set of defense related genes was higher under nitrogen limitation. Thus, depending on the biotic stress and the defense pathway considered, nitrogen deficiency can differentially affect immune responses. These studies did not investigate over-fertilization conditions.

Regulation of *LOX2* and *PDF1* transcript levels following MeJA treatment was strongly affected by nitrate supply and developmental stage (Figures 2, 3). Up-regulation was not observed in all cases and it was surprising to observe repression of these markers following MeJA treatment in some cases (**Supplementary Figure 3**). Both ET and JA play important roles in plant development (Huang et al., 2017; Dubois et al., 2018). Thus, the differential expression observed between stage 1 and 4 may be in part due to their accumulation level during these key developmental phases. Interestingly, an up-regulation of *PR1* and *PR5* was observed following MeJA treatment although to a lower level than those observed following Bion[®] treatment. This dual activation of SA and JA pathways was also recently described in the context of plant resistance mediated by a specific resistance gene in Arabidopsis (Liu et al., 2016) and may be more common than usually assumed. The ET/JA pathway is recruited during induced systemic resistance (ISR) triggered by PGPR (Backer et al., 2018). It would be interesting to determine whether ISR is affected by plant developmental stage and nutrition.

The impact of nitrate supply on effective protection of MeJA and Bion[®] against two bacterial pathogens with different lifestyles was investigated. Bion[®] conferred protection against the hemibiotrohoic bacterium *P. syringae* pv. *tomato* under low and optimal nutrition but failed to protect under high nitrate. Conversely, MeJA treatment resulted in an increased plant susceptibility. Protection was conferred by MeJA against *D. dadantii* when plants were cultivated under optimal nitrate nutritional conditions with 10 mM nitrate, while no protection was observed under low or over-fertilization conditions. This optimal protection is not perfectly correlated with transcriptional activation of *PDF1.2* and *LOX2*, indicating that these two defense markers do not fully explain the protection at optimal nitrate nutritional conditions. Interestingly, *LOX2* expression, is up-regulated at stage 2 and under optimal nitrate nutrition

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

11

Verly et al.

which correspond to the conditions where MeJA protects plants against D. dadantii (Supplementary Figure 3) indicating that the JA pathway could be acting here via ISR. These data are consistent with the fact that JA is involved in A. thaliana defense against D. dadantii (Fagard et al., 2007; Reverchon and Nasser, 2013). While MeJA conferred protection against D. dadantii, Bion® treatment resulted in an increased susceptibility. This increased susceptibility could be explained by the repression of ET/JA defenses we observed following Bion® treatment which activates the SA pathway (Supplementary Figure 2). An antagonistic effect of the SA pathway over the ET/JA pathway was previously described (Koornneef and Pieterse, 2008; Leon-Reyes et al., 2010; Van der Does et al., 2013; Caarls et al., 2017; Li et al., 2019; Yang et al., 2019). Care must be taken when fighting diverse bioagressors in the field since plant defense stimulators can have opposite effects.

In order to determine the defense signaling contribution in the plant protection mediated by MeJA against D. dadantii, the npr1-1 mutant was used because this mutant was described as being affected in both the SA and the ET/JA defense responses (Pieterse and Van Loon, 2004; Withers and Dong, 2017; Barker, 2018; Backer et al., 2019). The enhanced susceptibility of the npr1-1 mutant could be surprising since this gene is commonly known to activate SA response which is effective against biotrophs. In the npr1-1 mutant, one could expect the increase in JA signaling leading to enhanced resistance to the necrotroph D. dadantii. However, several examples show that NPR1 overexpression leads to tolerance to necrotrophic pathogens (Wally et al., 2009; Ali et al., 2017). Our data show that MeJA mediated A. thaliana protection against D. dadantii requires NPR1. Similarly, Bion® mediated plant increased susceptibility to D. dadantii is abolished in the npr1-1 mutant. It is intriguing that both increased and decreased protection involve NPR1. To tackle this issue, the role of the SA and ET/JA defense signaling pathways in the defense modulation by NPR1 was investigated by monitoring the expression of defense gene markers of these pathways in the npr1-1 mutant under the different nutritional conditions and following plant defense stimulator treatments. Interestingly, LOX2 expression seems to both depend on NPR1 and nitrate supply. Indeed, LOX2 expression was strongly reduced in npr1-1 mutant plants under 26 mM nitrate correlating with enhanced susceptibility to D. dadantii. Our data illustrate the complexity by which NPR1 is involved in the balance between the SA and the ET/JA signaling pathways that remains to be further investigated (Pieterse et al., 2011; Li et al., 2019).

The role of NPR1 in the nitrate dependent defense modulation by plant defense stimulators suggests a role of nitrate nutrition on defense signaling mechanisms. One

REFERENCES

Alhoraibi, H., Bigeard, J., Rayapuram, N., Colcombet, J., and Hirt, H. (2019). Plant immunity: the MTI-ETI model and beyond. *Curr. Issues Mol. Biol.* 30, 39–58. doi: 10.21775/cimb. 030.039

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

possible mechanism by which nitrate nutrition can interact with defense signaling is via NO accumulation which can be a byproduct of nitrate reductase. *A. thaliana* plants fertilized with nitrate accumulated higher levels of NO than ammonium fed plants suggesting an involvement of NO in the higher tolerance of nitrate fertilized plants to the pathogenic bacterium *P. syringae* (Gupta et al., 2012). The role of NO could be related to the activity of the NPR1 protein which is known to be S-nitrosylated (Tada et al., 2008; Withers and Dong, 2017).

These data support the idea that the impact of nitrate nutrition in plant immunity is complex and probably involves interactions between defense signaling pathways and metabolic pathways.

Our data could be useful to the design of performant agronomic practices by choosing and adapting the best fitted conditions for the use of plant defense stimulators taking into account the stage of development and the nitrogen status.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AD and M-ES-M conceived conceptually the work. CV and AD wrote the manuscript. CV, ACRD, and MR performed the experiences. AD, M-ES-M, LR, and FG supervised the project.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank the Staphyt Company and the National Agency of Research and Technology (ANRT) which funded the Ph.D. fellowship of CV supported by Paris Saclay University and the Jean-Pierre Bourgin Institut (IJPB) for the provision of scientific equipment and the reception within the institute that led to this work. The IJPB benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). This work has benefited from the support of IJPB's Plant Observatory technological platforms.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00583/ full#supplementary-material

Ali, S., Mir, Z. A., Tyagi, A., Mehari, H., Meena, R. P., Bhat, J. A., et al. (2017). Overexpression of NPR1 in *Brassica juncea* confers broad spectrum resistance to fungal pathogens. *Front. Plant. Sci.* 8:1693. doi: 10.3389/fpls.2017. 01693

Aznar, A., Chen, N. W. G., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaële, D., et al. (2014). Scavenging Iron: a novel mechanism of plant immunity activation by

12

Verly et al.

Elicitors and Nitrate Nutrition

microbial siderophores. Plant Physiol. 164, 2167-2183. doi: 10.1104/pp.113.23 3585

- Aznar, A., Chen, N. W. G., Thomine, S., and Dellagi, A. (2015). Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Sci.* 240, 90–97. doi: 10.1016/j.plantsci. 2015.08.022
- Backer, R., Naidoo, S., and van den Berg, N. (2019). The NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATEDGENES 1 (NPR1) and related family: mechanistic insights in plant disease resistance. *Front Plant Sci.* 10:102. doi: 10.3389/fpls. 2019.00102
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., et al. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostiulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473
- Barker, C. (2018). Systemic acquired resistance. Annu. Plant Rev. 209–229. doi: 10.1002/9781119312994.apr0032
- Bektas, Y., and Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense plant defense stimulators. Front. Plant Sci. 5:804. doi: 10.3389/fpls.2014.00804
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., et al. (2001). Growth Stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13, 1499–1510. doi: 10.2307/3871382
- Bürger, M., and Chory, J. (2019). Stressed out about hormones: how plants orchestrate immunity. *Cell Host Microbe* 26, 163–172. doi: 10.1016/j.chom. 2019.07.006
- Caarls, L., Der Does, D., Van Hickman, R., Jansen, W., Van Verk, M. C., Proietti, S., et al. (2017). Assessing the role of ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcriptional repressors in salicylic acid-mediated suppression of jasmonic acid-responsive genes. *Plant Cell Physiol.* 58, 266–278. doi:10.1093/pcp/pcw187
- Caarls, L., Pieterse, C. M., and Van Wees, S. C. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.* 6:170. doi: 10.3389/fpls.2015.00170
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57–63. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81858-9
- Cao, H., Li, X., and Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 11, 6531–6536. doi: 10.1073/pnas.95.11. 6531
- Carella, P., Wilson, D. C., and Cameron, R. K. (2015). Some things get better with age: differences in salicylic acid accumulation and defense signaling in young and mature Arabidopsis. Front. Plant Sci. 5:775. doi: 10.3389/fpls.2014.00775
- Chen, Y. L., Lee, C. Y., Cheng, K. T., Chang, W. H., Huang, R. N., Nam, H. G., et al. (2014). Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from PR-1 regulates immune signalling in tomato. *Plant Cell* 26, 4135–4148. doi: 10.1105/tpc.114.131185
- Chern, M. S., Fitzgerald, H. A., Yadav, R. C., Canlas, P. E., Dong, X., and Ronald, P. C. (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis. Plant J.* 27, 101–113. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.01070.x
- De Wit, M., Gommers, C. M. M., Voesenek, L. A. C. J., Pierik, R., Spoel, S. H., Sanchez-Perez, G. F., et al. (2013). Perception of low red: far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis. Plant J.* 75, 90–103. doi: 10.1111/tpj.12203
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P. R. (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12, 279L–290. doi: 10.1105/tpc.12.2.279
- Dietrich, R., Ploß, K., and Heil, M. (2004). Constitutive and induced resistance to pathogens in Arabidopsis thaliana depends on nitrogen supply. Plant Cell Environ. 27, 896–906. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01195.x
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., et al. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell* 6, 1454–1467.e15. doi: 10.1016/j.cell.2018. 03.044
- Dubois, M., Van den Broeck, L., and Inzé, D. (2018). The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends Plant Sci.* 23, 311-323. doi: 10.1016/j.tplants.2018. 01.003

- Durrant, W. E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 1, 179–184. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421
- Eyles, A., Chorbadjian, R., Wallis, C., Hansen, R., Cipollini, D., Herms, D., et al. (2007). Cross-induction of systemic induced resistance between an insect and a fungal pathogen in Austrian pine over a fertility gradient. *Oecologia* 153, 365–374. doi: 10.1007/s00442-007-0741-z
- Fagard, M., Dellagi, A., Roux, C., Périno, C., Rigault, M., Boucher, V., et al. (2007). Arabidopsis thaliana expresses multiple lines of defense to counterattack Erwinia chrysanthemi. Mol. Plant-Microbe Interact. 20, 794–805. doi: 10.1094/ MPMI-20-7-0794
- Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., et al. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. J. Exp. Bot. 65, 5643–5656. doi: 10.1093/jxb/eru323
- Farjad, M., Rigault, M., Pateyron, S., Martin-Magniette, M.-L., Krapp, A., Meyer, C., et al. (2018). Nitrogen limitation alters the response of specific genes to biotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* 19:3364. doi: 10.3390/ijms19113364
- Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., et al. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J.* 89, 502–509. doi: 10.1111/tpj.13398
- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S. A., Rudaz, S., Wolfender, J. L., and Farmer, E. E. (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis. J. Biol. Chem.* 284, 34506– 34513. doi: 10.1074/jbc.M109.061432
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43, 205–227. doi: 10.1146/ annurev.phyto.43.040204.135923
- Gupta, K. J., Brotman, Y., Segu, S., Zeier, T., Zeier, J., Persijn, S. T., et al. (2012). The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas* syringae pv. phaseolicola in tobacco. *J. Exp. Bot.* 64, 553–568. doi: 10.1093/jxb/ers348
- Häffner, E., Konietzki, S., and Diederichsen, E. (2015). Keeping control: the role of senescence and development in plant pathogenesis and defense. *Plants* 4, 449–488. doi: 10.3390/plants4030449
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: botrytis as a case study. J. Chem. Biol. 7, 133-141. doi: 10.1007/s12154-014-0113-1
- Heil, M., and Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Ann. Bot. 89, 503–512. doi: 10.1093/aob/mcf076
- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. J. Exp. Bot. 58, 2369–2387. doi: 10.1093/jxb/erm097
- Huang, H., Liu, B., Liu, L., and Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. J. Exp. Bot. 68, 1349–1359. doi: 10.1093/jxb/erw495
- Janda, M., Navrátil, O., Haisel, D., Jindřichová, B., Fousek, J., Burketová, L., et al. (2015). Growth and stress response in Arabidopsis thaliana, Nicotiana benthamiana, Glycine max, Solanum tuberosum and Brassica napus cultivated under polychromatic LEDs. Plant Methods 11:31. doi: 10.1186/s13007-015-0076-4
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. Nature 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Kazan, K., and Manners, J. M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. J. Exp. Bot. 62, 4087–4100. doi: 10.1093/jxb/err142
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44, 301–307.
- Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of &dt;em>PR&dt;/em> gene expression. *Plant Cell* 12, 2339L–2350L. doi: 10.1105/tpc.12.12.2339
- Klessig, D. F., Choi, H. W., and Dempsey, D. A. (2018). Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31, 871–888. doi: 10.1094/mpmi-03-18-0067-cr
- Koornneef, A., and Pieterse, C. M. J. (2008). Cross talk in defense signaling. Plant Physiol. 146, 839–844. doi: 10.1104/pp.107.112029
- Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A. S., et al. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis. J. Exp. Bot.* 65, 789–798. doi: 10.1093/jxb/eru001

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

13

- Kruse, C., Jost, R., Lipschis, M., Kopp, B., Hartmann, M., and Hell, R. (2007). Sulfur-enhanced defence: effects of sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle. *Plant Biol.* 9, 608–619. doi: 10.1055/s-2007-965432
- Kuai, X., MacLeod, B. J., and Després, C. (2015). Integrating data on the Arabidopsis NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. Front. Plant Sci. 6:235. doi: 10.3389/fpls.2015.00235
- Kutyniok, M., and Müller, C. (2013). Plant-mediated interactions between shoot-feeding aphids and root-feeding nematodes depend on nitrate fertilization. Oecologia 173, 1367–1377. doi: 10.1007/s00442-013-2712-x
- Lecompte, F., Abro, M. A., and Nicot, P. C. (2010). Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathol.* 59, 891–899. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010. 02320.x
- Lemaitre, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., and Masclaux-Daubresse, C. (2008). Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in Arabidopsis thaliana Wassileskija accession. Plant Cell Physiol. 49, 1056–1065. doi: 10.1093/pcp/pcn081
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S. C. M., et al. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonateresponsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232, 1423–1432. doi: 10.1007/s00425-010-1265-z.
- Li, J., Brader, G., and Palva, E. T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16, 319–331. doi: 10.1105/tpc.016980
- Li, N., Han, X., Feng, D., Yuan, D., and Huang, L. J. (2019). Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? *Int. J. Mol. Sci.* 20:E671. doi: 10.3390/ jims20030671
- Liu, L., Sonbol, F. M., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., et al. (2016). Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a noncanonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat. Commun.* 7:13099. doi: 10.1038/ncomms13099
- Loudet, O., Chaillou, S., Merigout, P., Talbotec, J., and Daniel-Vedele, F. (2003). Quantitative trait loci analysis of nitrogen use efficiency in Arabidopsis. Plant Physiol. 1, 345–358. Erratum in: Plant Physiol. 2003 Mar;131(3):1508. doi: 10. 1104/pp.102.010785
- Malnoy, M., Martens, S., Norelli, J. L., Barny, M.-A., Sundin, G. W., Smits, T. H. M., et al. (2011). Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 475–494. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172931
- Manners, J. M., Penninckx, I. A. M. A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., et al. (1998). The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from Arabidopsis is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. Plant Mol. Biol. 38, 1071–1080. doi: 10.1023/A:1006070413843
- Manohar, M., Tian, M., Moreau, M., Park, S. W., Choi, H. W., Fei, Z., et al. (2015). Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Front. Plant Sci.* 5:777. doi: 10.3389/fpls.2014.00777
- Mao, P., Duan, M., Wei, C., and Li, Y. (2007). WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant Cell Physiol.* 48, 833–842. doi: 10.1093/pcp/pcm058
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105, 1141–1157. doi: 10.1093/aob/mcq028
- McCann, H. C., Nahal, H., Thakur, S., and Guttman, D. S. (2012). Identification of innate immunity elicitors using molecular signatures of natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 4215–4220. doi: 10.1073/pnas.1113893109
- Mengiste, T. (2012). Plant immunity to necrotrophs. Annu. Rev. Phytopathol. 50, 267–294. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172955
- Miller, R. N., Costa Alves, G. S., and Van Sluys, M. A. (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. Ann. Bot. 119, 681–687. doi: 10.1093/aob/mcw284
- Mintoff, S. J. L., Rookes, J. E., and Cahill, D. M. (2015). Sub-lethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*. 17, 703–711. doi: 10.1111/plb.12286

- Miranda, K. M., Espey, M. G., and Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide – Biol. Chem.* 5, 62–71. doi: 10.1006/niox.2000.0319
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935–944. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00429-X
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., and Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140, 249–262. doi: 10.1104/pp.105.072348
- Mur, L. A. J., Simpson, C., Kumari, A., Gupta, A. K., and Gupta, K. J. (2017). Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. Ann. Bot. 119, 703–709. doi: 10.1093/aob/mcw179
- Ndamukong, I., Abdallat, A. A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., et al. (2007). A-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J.* 50, 128–139. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03039.x
- Nejat, N., and Mantri, N. (2017). Plant immune system: crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. *Curr. Issues Mol. Biol.* 23, 1–16. doi: 10.21775/cimb.023.001
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., and Niu, D. (2017). Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis. Front. Plant Sci.* 8, 238. doi: 10.3389/fpls.2017.00238
- Pato, J., and Obeso, J. R. (2013). Effects of clipping and N fertilization on insect herbivory and infestation by pathogenic fungi on bilberry. *Basic Appl. Ecol.* 14, 347–356. doi: 10.1016/j.baae.2013.02.005
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., and Bednarek, P. (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytol.* 3, 948–964. doi: 10.1111/nph.13325
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S. C. M. (2011). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055
- Pieterse, C. M. J., and Van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52–58. doi: 10.1016/S1360-1385(98) 01364-8
- Pieterse, C. M. J., and Van Loon, L. C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 456–464. doi: 10.1016/j.pbi.2004.05.006
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., and Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. doi: 10.1146/ annurev-phyto-082712-102340
- Poschenrieder, C., Tolrà, R., and Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* 11, 288–295. doi: 10.1016/j.tplants.2006. 04.007
- Pretty, J. (2018). Intensification for redesigned and sustainable agricultural systems. Science (80-) 362:eaav0294. doi: 10.1126/science.aav0294
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20, 1–11. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00056-9
- Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 622–636. doi: 10.1111/1758-2229.12073
- Rigault, M., Buellet, A., Masclaux-Daubresse, C., Fagard, M., Chardon, F., and Dellagi, A. (2017). Quantitative methods to assess differential susceptibility of *Arabidopsis* thaliana natural accessions to *Dickeya dadantii. Front. Plant Sci.* 8:394. doi: 10.3389/fpls.2017.00394
- Robert, C., Bancal, M.-O., and Lannou, C. (2004). Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and Septoria tritici blotch. Phytopathology 94, 712–721. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.7.712
- Rosen, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. Biochem. Biophys. 67, 10–15. doi: 10.1016/0003-9861(57)90241-2
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., et al. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20:2479. doi: 10.3390/ ijms20102479

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

14

Verly et al.

- Rufián, J. S., Rueda-Blanco, J., Beuzón, C. R., and Ruiz-Albert, J. (2019). Protocol: an improved method to quantify activation of systemic acquired resistance (SAR). *Plant Methods*. 15:16. doi: 10.1186/s13007-019-0400-5
- Shaner, G., and Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051–1056. doi: 10.1094/Phyto-67-1051
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., and Kachroo, A. (2019). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Sci.* 279, 81–86. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.01.001
- Snoeijers, S. S., Pérez-García, A., Joosten, M. H. A. J., and De Wit, P. J. G. M. (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 493–506. doi: 10.1023/A:1008720704105
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 104, 18842–18847. doi: 10.1073/pnas.0708139104
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., et al. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760–770. doi: 10.1105/tpc.009159
- Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M., et al. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 79, 89–96. doi: 10.1016/j.pmpp. 2012.05.004
- Sun, Y., Wang, M., Mur, L. A. J., Shen, Q., Guo, S., and Unravelling the Roles of Nitrogen. (2020). Nutrition in plant disease defences. *Int. J. Mol. Sci.* 21:E572. doi: 10.3390/ijms21020572
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., et al. (2008). Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* (80-) 321, 952L–956. doi: 10.1126/ science.1156970
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., and Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17, 260–270. doi: 10.1016/j. tplants.2012.02.010
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., et al. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15107–15111. doi: 10.1073/pnas.95.25. 15107
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., et al. (1992). Acquired resistance in Arabidopsis. Plant Cell. 6, 645–656.
- Van den Ackerveken, G. F. J. M., Dunn, R. M., Cozijnsen, A. J., Vossen, J. P. M. J., Van den Broek, H. W. J., and De Wit, P. J. G. M. (1994). Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene avr9 in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum. MGG Mol. Gen. Genet.* 243, 277–285. doi: 10.1007/ BF00301063
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M. C., Rodenburg, N., Pauwels, L., et al. (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCF COI1 -JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* 25, 744–761. doi: 10.1105/tpc.112. 108548
- van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135– 162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- Van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. *Plant Mol. Biol.* 41, 537–549. doi: 10.1023/A: 1006319216982
- Veresoglou, S. D., Barto, E. K., Menexes, G., and Rillig, M. C. (2013). Fertilization affects severity of disease caused by fungal plant pathogens. *Plant Pathol.* 62, 961–969. doi: 10.1111/ppa.12014

- Vos, I. A., Moritz, L., Pieterse, C. M. J., and Van Wees, S. C. M. (2015). Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. *Front. Plant Sci.* 6:639. doi: 10.3389/fpls.2015.00639
- Wally, O., Jayaraj, J., and Punja, Z. K. (2009). Broad-spectrum disease resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens in transgenic carrots (*Daucus carota* L.) expressing an Arabidopsis NPR1 gene. Planta 231, 131–141. doi: 10.1007/ s00425-009-1031-2
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., and Lyon, G. (2007). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance plant defense stimulators. *Phytopathology* 95, 1368–1373. doi: 10.1094/phyto-951368
- Wang, W., Feng, B., Zhou, J. M., and Tang, D. (2020). Plant immune signaling: advancing on two frontiers. J. Integr. Plant Biol. 62, 2–24. doi: 10.1111/jipb. 12898
- Wang, Y.-Y., Cheng, Y.-H., Chen, K.-E., and Tsay, Y.-F. (2018). Nitrate transport, signaling, and use efficiency. Annu. Rev. Plant Biol. 69, 85–122. doi: 10.1146/ annurev-arplant-042817-040056
- Wirthmueller, L., Maqbool, A., and Banfield, M. J. (2013). On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:761. doi: 10.1038/nrmicro3118
- Withers, J., and Dong, X. (2016). Posttranslational modifications of NPR1: a single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLoS Pathog*. 12:e1005707. doi: 10.1371/journal.ppat.1005707
- Withers, J., and Dong, X. (2017). Post-translational regulation of plant immunity. Curr. Opin. Plant Biol. 38, 124–132. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.004
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., et al. (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. Cell Rep. 6, 639–647. doi: 10.1016/j.celrep.2012.05.008
- Xin, X. F., and He, S.-Y. (2013). Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. Annu. Rev. Phytopathol. 51, 473–498. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102321
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., et al. (2019). The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 10:1349. doi: 10.3389/fpls.2019.01349
- Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., et al. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol. J.* 5, 313–324. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007. 00243.x
- Zarattini, M., Launay, A., Farjad, M., Wénès, E., Taconnat, L., Boutet, S., et al. (2017). The bile acid deoxycholate elicits defences in *Arabidopsis* and reduces bacterial infection. *Mol. Plant Pathol.* 18, 540–554. doi: 10.1111/mpp.12416
- Zhang, Y., and Li, X. (2019). Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50, 29-36. doi: 10. 1016/j.pbi.2019.02.004
- Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., et al. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the pr-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 191–202. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.2. 191

Conflict of Interest: ACRD, CV, MM, and FG were employed by the company STAPHYT.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Verly, Djoman, Rigault, Giraud, Rajjou, Saint-Macary and Dellagi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Frontiers in Plant Science | www.frontiersin.org

15