



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact de la nutrition azotée sur la phase initiale apoplasmique de l'interaction entre *A. thaliana* et *B. cinerea*

Antoine Daviere

## ► To cite this version:

Antoine Daviere. Etude de l'impact de la nutrition azotée sur la phase initiale apoplasmique de l'interaction entre *A. thaliana* et *B. cinerea*. *Phytopathologie et phytopharmacie*. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASB023 . tel-04536637

**HAL Id: tel-04536637**

**<https://theses.hal.science/tel-04536637>**

Submitted on 8 Apr 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.

Étude de l'impact de la nutrition azotée sur la  
phase initiale apoplasmique de l'interaction  
entre *A. thaliana* et *B. cinerea*

*Study of the impact of plant nitrogen nutrition on the initial apoplastic phase of  
the A. thaliana and B. cinerea interaction*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°567 : sciences du végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)  
Spécialité de doctorat : Biologie  
Graduate School : BioSphERA. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche Institut Jean-Pierre Bourgin (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech), sous la direction de Mathilde Fagard, Directrice de recherche, le co-encadrement de Marie-Christine Soulié, Maître de conférences

**Thèse soutenue à Versailles, le 31 mars 2023, par**

**Antoine DAVIÈRE**

**Composition du Jury**

Membres du jury avec voix délibérative

<b>Isabelle FUDAL</b> Directrice de recherche, INRAE (Saclay)	Présidente
<b>Elodie GAULIN</b> Maître de conférences, Université de Toulouse	Rapporteur & Examinatrice
<b>Sylvain RAFFAELE</b> Directeur de recherche, INRAE (Toulouse)	Rapporteur & Examinateur
<b>Jérôme PELLOUX</b> Professeur, Université de Picardie	Examinateur
<b>Nathalie POUSSEREAU</b> Maître de conférences, Université Lyon 1	Examinatrice



**Titre :** Étude de l'impact de la nutrition azotée sur la phase initiale apoplasmique de l'interaction entre *A. thaliana* et *B. cinerea*

**Mots clés :** *Arabidopsis thaliana*, *Botrytis cinerea*, azote, apoplasme, virulence, défense

**Résumé :** *Botrytis cinerea* est un champignon phytopathogène nécrotrophe de la famille des Sclerotiniacées. A ce jour, plus de 1400 espèces de plantes hôtes de *B. cinerea* ont été recensées. Cet agent pathogène représente à lui seul 10% du marché mondial des fongicides et 50% des dépenses pour la protection de la culture de la vigne. Ces caractéristiques lui ont valu d'être classé parmi les modèles d'étude les plus importants économiquement et scientifiquement. Le génome de *B. cinerea* contient un grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans la pathogénicité codant des enzymes de dégradation de la paroi végétale, des enzymes impliquées dans la biosynthèse de toxines ou encore dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, mais aussi des protéases. De plus, l'interaction entre *B. cinerea* et ses hôtes est fortement impactée par les facteurs environnementaux dont notamment la nutrition des plantes. En effet, la quantité d'azote apportée à la plante hôte est capable d'influencer non seulement son immunité mais également la capacité du champignon à produire ses facteurs de virulence. L'objectif de ma thèse a été d'étudier l'impact de la nutrition azotée de la plante sur la phase précoce de l'infection, cruciale pour le devenir de l'interaction. Pour cela nous avons focalisé notre intérêt sur l'apoplasme, constituant la première zone d'échange entre la plante et le champignon. Pour commencer, nous avons réalisé la toute première description du protéome et du métabolome de l'apoplasme de feuilles d'*A. thaliana* lors de la phase initiale de l'infection par *B. cinerea*. Celle-ci a permis de mettre en évidence des protéines et métabolites déjà décrits dans ce pathosystème ainsi que de nouveaux acteurs comme l'allantoïne, AtXTH23, AtPRX62, AtRNS1, AT4G01700 et AtPNP-A côté plante et Bcin13g00960 côté champignon.

La caractérisation fonctionnelle de ces candidats pourrait permettre de mieux comprendre cette interaction. Ensuite, notre étude du gène *BcPNL1*, codant une enzyme de *B. cinerea* appartenant à la famille des pectines lyases et exprimé très précocement lors de l'infection, a révélé son implication dans la pathogénicité. En effet, les longs oligogalacturonides (OGs) produits par BcPNL1 sont capables de réprimer les défenses de la plante pour faciliter l'infection. Enfin, nous avons observé que la nutrition en nitrate de la plante influence grandement l'expression des gènes de pectinases du champignon modulant ainsi la production d'OGs et l'induction des défenses. Parallèlement nous avons étudié le rôle de BcACP1, une protéase glutamique sécrétée précocement lors de l'infection et exprimée différenciellement par le champignon en fonction de la nutrition en nitrate de la plante. La comparaison de la pathogénicité d'une souche mutante du gène *BcACP1* et à celle de la souche sauvage sur un panel d'accessions naturelles d'*A. thaliana* a permis de mettre en évidence une meilleure résistance des plantes au mutant à faible nitrate et une plus grande sensibilité à fort nitrate. Afin de mieux comprendre cette capacité à fonctionner comme un facteur de virulence ou d'avirulence, nous avons recherché des cibles protéiques de cette protéase dans le compartiment apoplasmique lors de la phase précoce de l'infection. Des cibles putatives de BcACP1 ont pu être identifiées dont des chitinases, des protéines de remodelage de la paroi et des régulateurs des défenses. Pour conclure, mes résultats de thèse ont pu mettre en évidence la perturbation par la nutrition azotée de la plante de processus importants mis en oeuvre lors de la phase initiale de l'interaction entre *A. thaliana* et *B. cinerea*.



**Title :** Study of the impact of plant nitrogen nutrition on the initial apoplastic phase of the *A. thaliana* and *B. cinerea* interaction

**Keywords :** *Arabidopsis thaliana*, *Botrytis cinerea*, nitrogen, apoplast, virulence, defense

**Abstract :** *Botrytis cinerea* is a necrotrophic phytopathogenic fungus of the Sclerotiniaceae family. To date, more than 1400 species of *B. cinerea* host plants have been identified. This pathogen alone represents 10% of the global fungicide market and 50% of the total cost for vineyard protection. These characteristics have made it one of the most economically and scientifically important phytopathogenic fungus model. The genome of *B. cinerea* contains a large number of genes potentially involved in pathogenicity coding for plant cell wall degradation enzymes, enzymes involved in the biosynthesis of toxins or in the detoxification of reactive oxygen species, but also proteases. In addition, the interaction between *B. cinerea* and its hosts is strongly impacted by environmental factors, including plant nutrition. Indeed, the amount of nitrogen supplied to the host plant is able to influence not only its immunity but also the ability of the fungus to produce its virulence factors. The aim of my PhD project was to study the impact of nitrogen nutrition of the plant on the early phase of the infection, crucial for the outcome of the interaction. Thus, we focused on the apoplastic space, constituting the first compartment of the interaction. We performed the first description of the apoplastic space proteome and metabolome of *A. thaliana* leaves during the initial phase of *B. cinerea* infection. We identified metabolites and proteins already described in this pathosystem as well as new actors such as allantoin AtXTH23, AtPRX62, AtRNS1, AT4G01700 and AtPNP-A on the plant side and Bcin13g00960 on the fungus side. Functional characterization of these candidates might enable a better understanding of the interaction.

Then, our study of the *BcPNL1* gene, coding for a *B. cinerea* enzyme belonging to the pectin lyases family and expressed early during infection, revealed its involvement in pathogenicity. Indeed, long oligogalacturonides (OGs) produced by BcPNL1 were able to repress plant defenses to facilitate infection. Finally, we observed that plant nitrogen nutrition strongly influences fungal pectinase genes expression, thus modulating the production of OGs and the induction of plant defenses. At the same time, we studied the role of BcACP1, a glutamic protease secreted early during infection and differentially expressed by the fungus depending on the nitrogen nutrition of the plant. Pathogenicity tests with the *BcACP1* mutant strain compared to the wild type B05.10 on a panel of natural accessions of *A. thaliana* revealed better plant resistance to the mutant in low nitrate condition and greater susceptibility in high nitrate. In order to better understand the ability of BcACP1 to function as a virulence or an avirulence factor, we searched for its protein targets in the apoplastic space during the early phase of the infection. We were able to identify putative targets of BcACP1 such as chitinases, cell wall remodeling proteins and defense regulators. Altogether, my thesis results revealed that varying plant nitrogen nutrition influence important processes taking place during the initial phase of the interaction between *A. thaliana* and *B. cinerea*.

## Remerciements :

---

C'est avec plaisir que je souhaiterais remercier ici toutes les personnes qui ont participé à mon projet de thèse qui n'a pu aboutir que grâce au merveilleux travail d'équipe qui existe dans le milieu de la recherche scientifique.

Tout d'abord j'aimerais remercier profondément les professeurs de Sorbonne Université qui m'ont écouté, accueilli à bras ouverts et transmis l'envie de faire de la recherche lors de ma réorientation de médecine en master de biologie : Sophie Louvet-Vallée, Jérôme Lacoste et Yvan Kraepiel. Merci à toute l'équipe des master sessions de l'IJPB et aux scientifiques présents pour m'entraîner avant le concours de l'ED, vos conseils ont grandement impacté ma vie en me permettant d'obtenir cette bourse de thèse. Merci à l'ED SEVE pour ce financement et à sa directrice Marianne Delarue et son assistante Martine Fournier pour leur aide et leurs réponses à mes questions tout au long de la thèse. J'aimerais ensuite remercier toutes les personnes des services communs de l'IJPB avec lesquelles j'ai pu interagir. L'équipe des serristes ayant pris grand soin de mes plantes depuis mon stage M2 jusqu'à la dernière manip de ma thèse : Hervé Ferry et Jean Christophe Gueudet. Merci à Luc Bachelet pour la stérilisation de mon matériel et désolé de t'avoir trop souvent enseveli de mortiers et d'entonnoirs Büchner. Je remercie également l'équipe des RHs pour leur aide dans toutes mes démarches : Vanessa Pace, Maria-Jesus Lacruz et Nazneen Badrouline. Ainsi que Jérôme Basille et Stéphane Raude pour leur aide concernant les commandes de produits pour mes expérimentations.

J'aimerais maintenant remercier les habitants du Bâtiment 3 de l'IJPB pour la super ambiance qui s'y trouve au quotidien, les grandes tablées super animées à la cantine, les pauses café collectives, les barbecues dansants mémorables, les repas de Noël mais également les jeux et activités dont notamment la fameuse récolte de miel de la ruche du Bât 3 ! Petite pensée pour l'équipe de la cafétéria et ces pauses passées à rigoler ensemble : Marie-Christine Soulié, Sylvie Jolivet, Fabienne Soulay, Martine Rigault et Isabelle Quillere. Merci à mes collègues thésards et CDD pour les sorties du vendredi soir et toutes les pauses café/papayoo/cigarette partagées ensemble, ceux encore présents : Garry Duville, Bérengère Decouard, Manon Lardos, Justine Broutin, Violette Martinelli, Alizée Teinturier, Mégane Mahieu et Marina Berthet, et ceux déjà partis pour de nouvelles aventures : Roua Jeridi, Mathilde Grégoire, Camille Ingargiola, Emilie Aubry, et Thomas Sapir. Merci à Fabien Chardon pour son aide dans la sélection de nos lignées naturelles et ses conseils de statistiques pendant mon M2, merci à Céline Masclaux-Daubresse et Thomas Girin d'avoir été rapportrice et rapporteur pour mes exposés de début de thèse et de mi-thèse.

Au-delà de l'ambiance du Bâtiment 3, j'ai passés mes années de thèse dans la super équipe NPI que je tiens à remercier profondément. Merci à Marie-Christine Soulié mon encadrante de M2 et ma co-encadrante de thèse pour m'avoir tout appris au labo, des gestes les plus simples à la rigueur nécessaire à l'organisation des manips. Tu m'as également initié à l'étude des champignons avec *Botrytis* et ainsi transmis ta passion pour ces

organismes et leurs stratégies incroyables d'infection. Je n'oublierai jamais la semaine passée ensemble au congrès BotrySclero sous la chaleur d'Avignon. Je tiens également à remercier ma directrice de thèse Mathilde Fagard pour toutes les discussions que l'on a pu avoir qui m'ont fait grandir scientifiquement, pour tes conseils et idées tout au long de ma thèse et tout ce que tu m'as appris sur le monde de la recherche. Merci de m'avoir emmené à la réunion du conseil scientifique ENVIE où nous avons pu échanger sur le sujet des multi-stress et également prendre un peu le soleil de Sète. Maintenant à nous l'ICPP cet été ! Un grand merci à Sylvie Jolivet pour tous les moments et toutes les discussions partagées au labo ainsi que ton aide précieuse pour les manips. Je remercie également Dominique Expert, bien qu'à la retraite tu m'as conseillé et corrigé à plusieurs reprises pour mes oraux ainsi que pour mes manips. Merci également à Violette Martinelli, ingénieure d'étude dans l'équipe pour nos échanges au labo sur nos deux petites bêtes filamenteuses. Et pour finir je remercie Roua Jeridi, ma binôme au labo, ancienne docteure de l'équipe qui m'a soutenu et a toujours été à l'écoute et avec qui j'ai passé de très bons moments aussi en dehors du labo.

Concernant les autres personnes avec qui j'ai interagi à l'IJPB, je voudrais remercier Fabien Nogué pour m'avoir initié aux rudiments de la technique CRISPR-Cas9 et m'avoir donné ses trucs et astuces. Je remercie également Alexandre de Saint Germain pour tout ce qu'il m'a appris concernant la biochimie et notamment la purification de protéines ainsi que l'ingénieur de son équipe Louis Lambret ayant continué la production de ma protéine. Comment ne pas remercier Aline Voxeur, qui m'a permis par ses analyses d'oligogalacturonides et son enthousiasme incroyable d'apporter une autre dimension à mes travaux de thèse notamment sur la partie BcPNL1 ! Merci également à Aline et à Samantha Vernhettes pour leur relecture du chapitre II de ce manuscrit. Merci aux personnes de l'Observatoire du végétal de l'IJPB avec notamment lors de mes débuts en biochimie : Martine Gonneau, Loïc Rajjou et Boris Collet pour leur pédagogie et en chimie : Stéphanie Boutet et Gilles Clement pour les résultats de métabolomiques et leur aide à l'analyse. En dehors de l'IJPB j'aimerais remercier Thierry Balliau et Mélisande Blein-Nicolas de la plateforme de protéomique PAPPSO pour les résultats de protéomiques et leur retour sur mes analyses. Merci également à Justine Rouffet pour les manips de néphélométrie avec les échantillons d'apoplasme. Je souhaiterais remercier les membres de mon comité de thèse : Jean Colcombet, Rozenn Le-Hir, Marc Bardin et Nathalie Poussereau pour leurs conseils et leur sollicitude lors de mes deux comités.

J'aimerais maintenant remercier mon jury de thèse, Elodie Gaulin et Sylvain Raffaele d'avoir accepté d'être rapportrice et rapporteur de mes travaux ainsi qu'Isabelle Fudal, Jérôme Pelloux et Nathalie Poussereau de jouer le rôle d'examineurs.

Enfin merci à tous mes proches, familles, amis pour leur soutien dans cette épreuve que peut parfois être la réalisation d'une thèse.

# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS:</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE:</b> .....	<b>3</b>
<b>1) LE REGNE DES CHAMPIGNONS : DE LA SYMBIOSE A LA PATHOGENICITE</b> .....	<b>3</b>
A. Phylogénie et diversité .....	3
B. Les agents phytopathogènes .....	6
1. Les biotrophes .....	6
2. Les nécrotrophes .....	7
3. Les hémibiotrophes .....	7
4. Les différents niveaux de spécialisation à l'hôte .....	8
<b>2) LA REPONSE DES PLANTES : D'UNE DEFENSE PASSIVE A UNE DEFENSE ACTIVE</b> .....	<b>10</b>
A. Les défenses préformées .....	10
1. La cuticule .....	10
2. La paroi végétale .....	11
3. Les barrières chimiques .....	13
B. L'induction des défenses : PTI et ETI .....	13
C. Voies hormonales de l'immunité .....	15
1. La voie du SA .....	15
2. La voie du JA .....	16
D. Les protéines de défense .....	18
1. Les chitinases .....	18
2. Les peroxydases .....	19
3. Les inhibiteurs enzymatiques .....	19
4. Les protéases .....	20
E. Métabolisme et stress biotiques .....	20
1. Métabolisme primaire et défense .....	21
2. Métabolisme spécialisé et défense .....	22
<b>3) UN MODELE INCONTOURNABLE : BOTRYTIS CINEREA, L'AGENT DE LA POURRITURE GRISE</b> .....	<b>24</b>
A. Cycle de vie .....	24
1. Cycle de reproduction asexuée .....	24
2. Cycle de reproduction sexuée .....	26
B. Les différentes phases du processus infectieux .....	26
C. Les facteurs de virulence .....	28
1. Les enzymes de dégradation de la paroi végétale .....	28
2. La production et la détoxification des espèces réactives de l'oxygène .....	29
3. La production de métabolites .....	30
4. Les petites protéines induisant la mort cellulaire .....	31
5. Les petits ARNs .....	31
6. Les protéases .....	32
D. Mécanismes de défense des plantes contre <i>B. cinerea</i> .....	36
1. Rôle des hormones et métabolites .....	36
2. Une histoire de cuticule .....	37
3. Remodelage et dégradation de la pectine .....	38
<b>4) L'IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES INTERACTIONS PLANTES-AGENTS PATHOGENES</b> .....	<b>40</b>
A. Changements climatiques et perturbations de l'environnement .....	40
B. La réalité des cultures : combinaison de stress biotiques et abiotiques .....	40
1. Impact des stress thermiques et hydriques sur la défense .....	41
2. Élévation du carbone atmosphérique .....	42
3. Nutrition .....	43
C. La nutrition azotée .....	44
1. Perturbations actuelles du cycle de l'azote .....	45
2. Assimilation, transport et remobilisation de l'azote chez les plantes .....	45
3. Azote et défenses des plantes .....	46
4. Nutrition azotée et expression de la virulence des agents pathogènes .....	51
<b>OBJECTIF DE LA THESE:</b> .....	<b>53</b>
<b>CHAPITRE I: MODIFICATIONS PRECOCES DES METABOLITES ET PROTEINES DANS LE COMPARTIMENT APOPLASMIQUE D'A. THALIANA EN REPONSE A L'INFECTION PAR LE CHAMPIGNON A LARGE SPECTRE B. CINEREA</b> .....	<b>55</b>
ABSTRACT .....	57

INTRODUCTION .....	58
RESULTS .....	60
Apoplast washing fluids (AWF) extraction from early infected leaves .....	60
Antifungal properties of AWF extracts .....	62
Effect of infection on primary metabolite content in AWF.....	63
Specialized metabolites content modifications in AWF from infected leaves .....	65
Early changes in the apoplast proteome of <i>A. thaliana</i> infected leaves.....	68
<i>B. cinerea</i> proteins recovered in AWFs extracts .....	74
DISCUSSION.....	76
MATERIALS AND METHODS .....	83
Fungal and plant material .....	83
Infection experiments .....	83
Detection of ROS and cell death .....	83
Apoplastic Washing Fluid (AWF) extraction.....	83
Test for antifungal effect of ddH <sub>2</sub> O AWF extracts.....	84
AWF primary metabolites content analysis.....	84
AWF specialized metabolites content analysis.....	85
Proteome analysis of AWF extracts .....	86
Statistical analysis .....	86
ACKNOWLEDGMENTS .....	89
<b>CHAPITRE II: LA PECTINE LYASE <i>BcPNLI</i> DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> EST IMPLIQUEE DANS LA PATHOGENICITE ET SON ACTIVITE PECTINOLYTIQUE CONTRIBUTE A L'IMPACT DE LA NUTRITION AZOTEE DE L'HOTE SUR LA SEVERITE DE LA MALADIE .....</b>	<b>91</b>
ABSTRACT .....	93
INTRODUCTION .....	94
RESULTS .....	96
Impact of plant nitrogen nutrition on pectinolytic capacities of <i>B. cinerea</i> .....	96
Targeted gene deletion of the <i>BcPNLI</i> gene in <i>B. cinerea</i> .....	99
<i>BcPNLI</i> is involved in pathogenicity .....	101
Reduced cell death and oxidative burst with the $\Delta BcPNLI$ mutants .....	104
<i>In vivo</i> pectin digestion profile of the $\Delta BcPNLI$ mutant is altered.....	106
Gene expression of fungal pectinases is altered in the $\Delta BcPNLI$ mutants and is differently impacted by plant nitrate nutrition .....	107
Gene expression of defense related genes in plants infected by $\Delta BcPNLI$ mutants is differently impacted by plant nitrate nutrition .....	109
DISCUSSION.....	112
MATERIALS AND METHODS .....	116
Fungal and plant material .....	116
Construction of $\Delta BcPNLI$ mutants.....	116
Infection experiments .....	118
DAB and BT coloration experiments .....	118
Gene expression analysis.....	118
Analysis of OGs production .....	118
Cell wall enzymatic fingerprinting .....	118
ACKNOWLEDGMENTS .....	120
<b>CHAPITRE III: LA PROTEASE <i>BcACPI</i> DE <i>B. CINEREA</i> POSSÈDE DES RÔLES OPPOSÉS LORS DE L'INFECTION D'<i>A. THALIANA</i> EN FONCTION DE LA NUTRITION EN NITRATE DE LA PLANTE.....</b>	<b>121</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>123</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>124</b>
<b>RESULTS .....</b>	<b>126</b>
Regulation of <i>BcACPI</i> and its homologs during <i>B. cinerea</i> infection on wild-type <i>A. thaliana</i> Col-0 accession.....	126
Opposite correlations between <i>BcACPI</i> and pathogenicity depending on plant nitrate nutrition in 21 natural accessions of <i>A. thaliana</i> .....	129
<i>BcACPI</i> deletion impacts the activation of the SA and the JA defense pathways during the infection .....	134
Protease activity and specificity of the purified <i>BcACPI</i> protease .....	136
Proteomic and metabolomic analysis of AWF extracts revealed putative targets of the <i>BcACPI</i> protease .....	137
Gene expression levels of putative targets of <i>BcACPI</i> identified in the proteome.....	142

<b>DISCUSSION</b> .....	144
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	148
Fungal and plant material .....	148
Infection experiments .....	148
<i>B. cinerea</i> transformation .....	148
GUS coloration .....	148
RT-qPCR analysis .....	149
Protein purification and protease activity assay.....	149
AWF extractions .....	152
Proteomic and metabolomic analysis.....	152
Statistical analysis .....	152
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	153
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>155</b>
<b>1) PHASE PRECOCE DE L'INFECTION PAR <i>B. CINEREA</i> ET INTERACTION AVEC LA NUTRITION AZOTEE DE L'HOTE</b> .....	156
A. Composante apoplasmique de l'interaction précoce.....	156
B. Implication des facteurs de virulence du champignon dans la régulation de l'interaction par la nutrition azotée .....	157
1. Les pectinases fongiques et notamment BcPNL1 contribuent à « l'effet azote ».....	157
2. Dualité du rôle de la protéase BcACP1 dans la pathogénicité de <i>B. cinerea</i> .....	158
3. Quels sont les signaux responsables des différences d'expression des facteurs de virulence ?.....	161
<b>2) SPECIFICITE DE LA REPONSE A LA COMBINAISON DE STRESS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES ?</b> .....	163
A. La nutrition azotée et les autres pathosystèmes .....	163
B. Réponse générique aux différentes combinaisons de stress biotiques et abiotiques chez la plante ? .....	163
<b>REFERENCES</b> .....	<b>166</b>

## Liste des abréviations:

---

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>E. amylovora</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
<i>M. oryzae</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
HG	Homogalacturonane
RH1-RH2	Rhamnogalacturonane 1 et 2
GalA	Acide galacturonique
PME	Pectine méthylestérase
PAE	Pectine acétylestérase
PG	Polygalacturonase
PL	Pectate lyase
PNL	Pectine lyase
CWDE	<i>Cell wall-degrading enzyme</i>
CAZyme	<i>Carbohydrate-active enzyme</i>
OG	oligogalacturonide
PR	<i>Pathogenesis-related protein</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
PTI	<i>Pamp triggered immunity</i>
PAMPs/MAMPs/DAMPs	<i>Pathogen/Microbial/Damage associated molecular patterns</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
ETI	<i>Effector triggered immunity</i>
HR	<i>Hypersensitive response</i>
JA	Acide jasmonique
OPDA	Acide 12-oxo-phytodienoïque
SA	Acide salicylique
ET	Ethylène
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i>
NPR1	<i>Non expressor of pathogenesis-related genes 1</i>
JAZ	<i>Jasmonate ZIM-domains protein</i>
JOX	<i>Jasmonate-induced oxygenase</i>
PDF1.2	<i>Plant defensin 1.2</i>
PRX	Peroxydase
OGOX	<i>Oligogalacturonide-oxidase</i>
PGIP	<i>Polygalacturonase-inhibiting protein</i>
PMEI	<i>Pectin methylesterase inhibitor</i>
IPS	<i>Protease inhibitor</i>
cwINV	<i>Cell wall invertase</i>
RNAi	ARN interférence
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
ITC	Isothiocyanate
PAD3	<i>Phytoalexin deficient 3</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cas9	Caspase 9
CDIP	<i>Cell death-inducing protein</i>
ACP1	<i>Acidic protease 1</i>
SGP	<i>Scytalidoglutamic peptidase</i>
AGP	<i>Aspergilloglutamic peptidase</i>

DAB	3, 3'-diaminobenzidine
SARD1	<i>Systemic acquired resistance deficient 1</i>
CBPG60g	<i>Calmodulin-binding Protein 60 g</i>
PCA	<i>Principal component analysis</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
AWF	<i>Apoplast washing fluid</i>
N	Azote
NO	Monoxyde d'azote
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrate
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
hpi, dpi	<i>Hours, days post inoculation</i>

### **Unités internationales**

°C	Degré Celsius
Da	Dalton
g, mg, µg, ng	Gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
d, h	Day, hour
l, ml, µl	Litre, millilitre, microlitre
M, mM, µM, nM	Molaire, millimolaire, micromolaire, nanomolaire



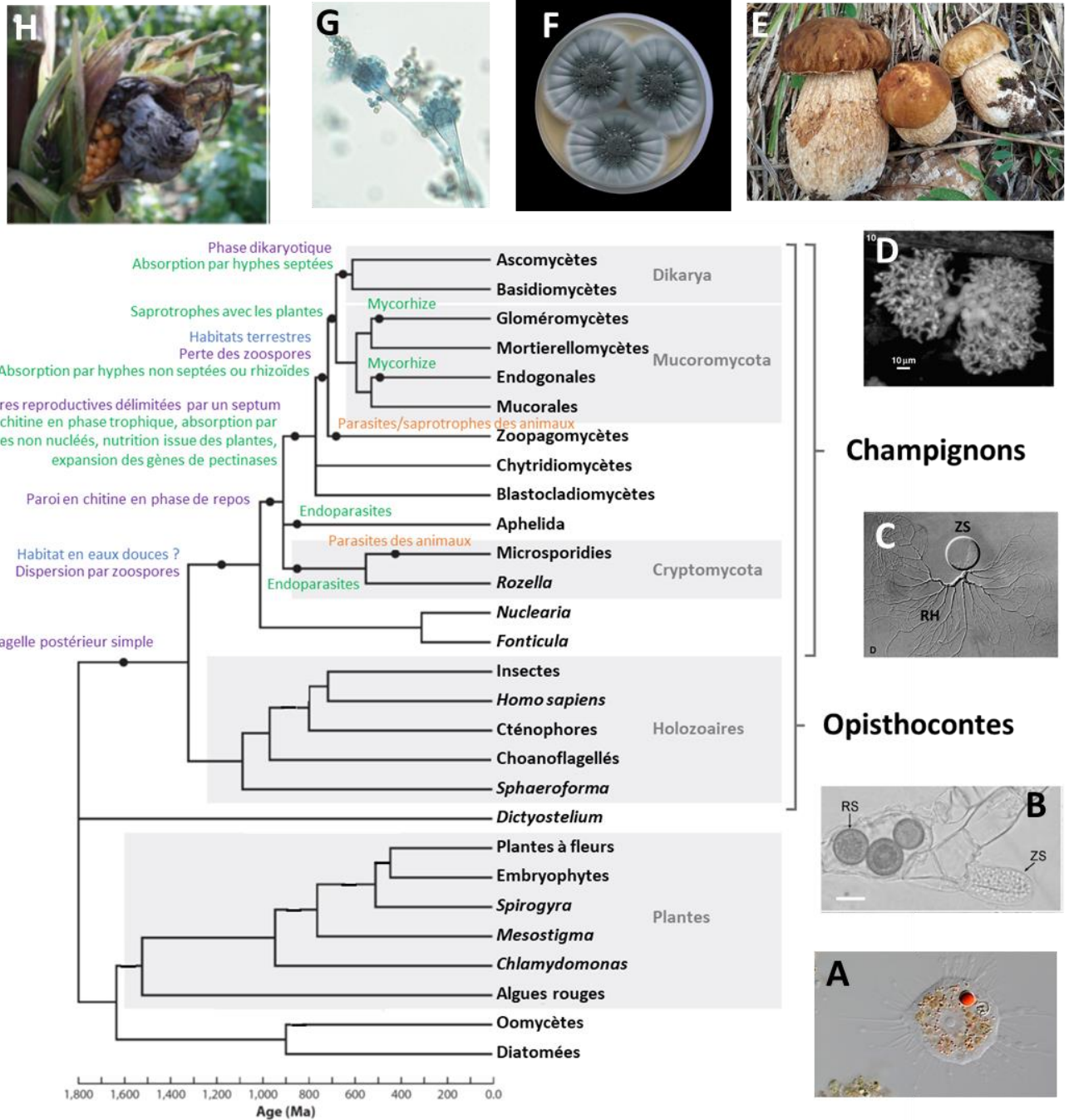
# Introduction générale:

---

## 1) Le règne des champignons : de la symbiose à la pathogénicité

### A. Phylogénie et diversité

Aussi incroyable que cela puisse paraître, nous ne sommes pas si éloignés phylogénétiquement des champignons. En effet, nous avons ensemble un ancêtre commun unicellulaire possédant un flagelle postérieur qui vivait dans l'océan il y a environ 1300 millions d'années (Ma) (Figure 1, Berbee *et al.*, 2017). Les Opisthocontes, nom du clade comprenant le règne des Holozoaires, auquel nous appartenons, et celui des Mycètes (champignons) fait référence à cet ancêtre commun. Grâce au séquençage d'un grand nombre de génomes, l'apparition des champignons a pu être estimée à -1042 Ma dans une fourchette entre -672 et -1259 Ma (Tedersoo *et al.*, 2018). Bien que la majorité des champignons qu'on rencontre aujourd'hui soient des saprotrophes, c'est-à-dire qu'ils absorbent les nutriments solubles préalablement dégradés par des enzymes dans le milieu extérieur, les premières branches divergentes des champignons correspondent à des espèces phagotrophes (genres *Nuclearia* et *Fonticula*, Figure 1A) et endoparasites (Cryptomycota et Aphelida, Figure 1B). Initialement colonisateurs des eaux salées des océans et plus tard des eaux douces, ces champignons comme ceux des divisions des Blastocladiomycota et des Chytridiomycota, possèdent des zoospores qui sont leurs formes de dissémination (Figure 1B, 1C). Suite à la colonisation des habitats terrestres, la perte des zoospores et l'apparition de la saprotrophie, la division des Mucoromycota est apparue comprenant les champignons mycorhiziens à arbuscules (Figure 1D). Ces associations symbiotiques entre les plantes qui fournissent le carbone fixé par la photosynthèse et les champignons, fournissant des sels minéraux prélevés dans le sol, ont vraisemblablement été déterminantes dans la colonisation des habitats terrestres par les plantes (Wang *et al.*, 2010). Le sous-règne des Dikarya comprenant les divisions des Basidiomycètes et des Ascomycètes (Figure 1) est une des branches divergentes la plus récente du règne des champignons et les estimations déterminent son apparition il y a 642 Ma (Tedersoo *et al.*, 2018).



**Figure 1: Arbre phylogénique présentant le règne des champignons.** Adapté de Berbee et al (2017). A, *Nuclearia* sp., Eckhard Voelcker & Steffen Claus (<http://www.wunderkanone.de>). B, *Rozella allomycis* parasitant un hyphes d'*Allomyces*, James et al (2006). RH : spores en dormance, ZS : zoosporangia contient les zoospores immatures. C, *Rhizidium phycophilum* (Chytridiomycota), Picard et al (2009). RH : rhizoïdes. D, Deux arbuscules colorés à la fuchsine dans une cellule de racine de lin, Vierheilig et al (2005). E, Fructifications de *Boletus edulis* en forêt, Tan et al (2022). F, *Penicillium roqueforti* sur boîte de Petri. G, Conidiophores d'*Aspergillus fumigatus*. H, Symptômes du charbon sur feuilles de maïs causés par *Ustilago maydis*, Lanver et al (2017). Les points sur l'arbre correspondent aux changements évolutifs décrits par différentes couleurs de texte, le violet correspond aux changements liés à la morphologie où à la génétique, le bleu aux changements d'habitats, le vert à la nutrition basée sur les plantes et l'orange à la nutrition basée sur les animaux.

Concernant les Dikarya, la majorité des organismes que l'on appelle dans le langage courant des « champignons à chapeaux », en référence aux fructifications que l'on peut trouver en forêt, appartiennent à la division des Basidiomycètes. Certains d'entre eux ainsi que quelques Ascomycètes sont capables de réaliser des symbioses avec les plantes, ce sont les ectomycorhizes avec par exemple le genre *Boletus* (Figure 1E). Les Basidiomycètes sont aujourd'hui très utilisés à des fins de bioremédiation car leur grande richesse enzymatique leur permet non seulement de dégrader des composés d'origine naturelle comme la lignine mais également des composés d'origine industrielle nocifs pour l'environnement (Treu & Falandysz, 2017). La division des Ascomycètes comprend également beaucoup d'espèces utilisées dans nos sociétés mais plutôt à des fins alimentaires avec leur capacité à dégrader des molécules végétales telles que la pectine et la cellulose. Les enzymes à l'origine de ces dégradations sont notamment utilisées dans l'industrie pour la clarification des jus de fruits et du vin. De plus, les capacités de fermentation des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées dans la boulangerie, la vinification et la brasserie. Au-delà de leurs capacités à dégrader différentes molécules, les champignons sont aussi utilisés pour produire des molécules importantes dans l'industrie ou la médecine comme certaines espèces du genre *Penicillium* bien connues pour leur capacité à produire la pénicilline, le premier antibiotique découvert en 1928. On parle aujourd'hui de domestication pour certaines espèces comme *Penicillium roqueforti* sélectionné pour sa capacité à dégrader les protéines du fromage lors de son développement (Figure 1F). Enfin beaucoup d'espèces classées chez les Dikarya sont des champignons pathogènes des plantes et des animaux. Nous pouvons citer par exemple les Ascomycètes *Aspergillus fumigatus* (Figure 1G) et *Candida albicans* qui sont ensemble responsables de la majorité des infections fongiques chez l'être humain (Brown *et al.*, 2012) et le Basidiomycète *Ustilago maydis* responsable du charbon du maïs (Figure 1H, (Lanver *et al.*, 2017))

La diversité fongique sur terre est estimée à 12 millions d'espèces alors que seulement 100 000 environ ont pu être décrites jusque-là (Wu *et al.*, 2019). Ces données présagent encore beaucoup de découvertes sur ces organismes. Actuellement, un peu plus de 1000 génomes d'espèces différentes de champignons ont été séquencés (Grigoriev *et al.*, 2014). Etant donné la diversité des modes de vie et des capacités des champignons, ces génomes sont de précieuses ressources pour la recherche de sources d'énergie alternatives ainsi que de techniques de bioremédiation, de séquestration du carbone, d'agriculture et de sylviculture durable (Grigoriev *et al.*, 2011).

## B. Les agents phytopathogènes

Comme nous avons vu ci-dessus, certains champignons peuvent infecter des plantes. On estime qu'un tiers de la perte annuelle des récoltes dans le monde est due aux champignons phytopathogènes (Fisher *et al.*, 2012). Le champignon le plus dévastateur économiquement parlant est *Magnaporthe oryzae* un champignon Ascomycète hémibiotrophe s'attaquant principalement au riz, suivi de *Botrytis cinerea* un autre Ascomycète à mode de vie nécrotrophe possédant un très large spectre d'hôtes, puis enfin de Basidiomycètes du genre *Puccinia* comprenant différentes espèces biotrophes responsables de la rouille du blé (Dean *et al.*, 2012). Aujourd'hui, la demande gouvernementale de réduction des produits phytosanitaires, le changement climatique ainsi que l'accroissement de la population sont des enjeux cruciaux auxquels l'agriculture moderne doit faire face. Ainsi, la compréhension des différents types d'interactions entre les plantes et les champignons phytopathogènes est capitale afin de permettre une production agricole suffisante et respectueuse de l'environnement et de la santé humaine.

### 1. Les biotrophes

Les champignons phytopathogènes biotrophes sont des organismes développant un lien étroit avec leur hôte. Ils dépendent entièrement de leur hôte pour compléter leur cycle de vie. Leurs stratégies reposent sur le contournement de l'immunité des plantes et le prélèvement de nutriments au dépend des cellules de l'hôte sans entraîner leur mort (Figure 2). Les champignons biotrophes les plus importants appartiennent à l'ordre des Pucciniales responsables de la rouille du blé avec par exemple *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *P. striiformis* f. sp. *tritici* et *P. triticina*, et aussi à l'ordre des Erysiphales responsables de l'oïdium avec *Blumeria graminis* pathogène chez le blé et l'orge (Dean *et al.*, 2012). Après pénétration du mésophylle foliaire par les stomates ou l'épiderme grâce à un appressorium, ces organismes vont produire des structures spécialisées appelées haustoria (Figure 2; Doehlemann *et al.*, 2017). Celles-ci traversent la paroi végétale et vont former des invaginations de la membrane plasmique des cellules hôtes sans la détruire. Des transporteurs vont ensuite permettre de prélever des nutriments de la cellule hôte et de les acheminer dans l'haustorium pour soutenir la croissance de l'agent pathogène. Les champignons biotrophes produisent un grand nombre d'effecteurs à partir des haustoria afin de réduire la réponse de défense des plantes. Lors d'une interaction plante-pathogène, les effecteurs correspondent aux molécules sécrétées par l'agent pathogène entraînant une manipulation de la structure et de la fonction de la cellule végétale (Kamoun, 2006). Ils peuvent ainsi faciliter l'infection (facteur de virulence) et/ou provoquer l'induction des défenses (facteur d'avirulence) (voir section « L'induction des défenses : PTI et ETI

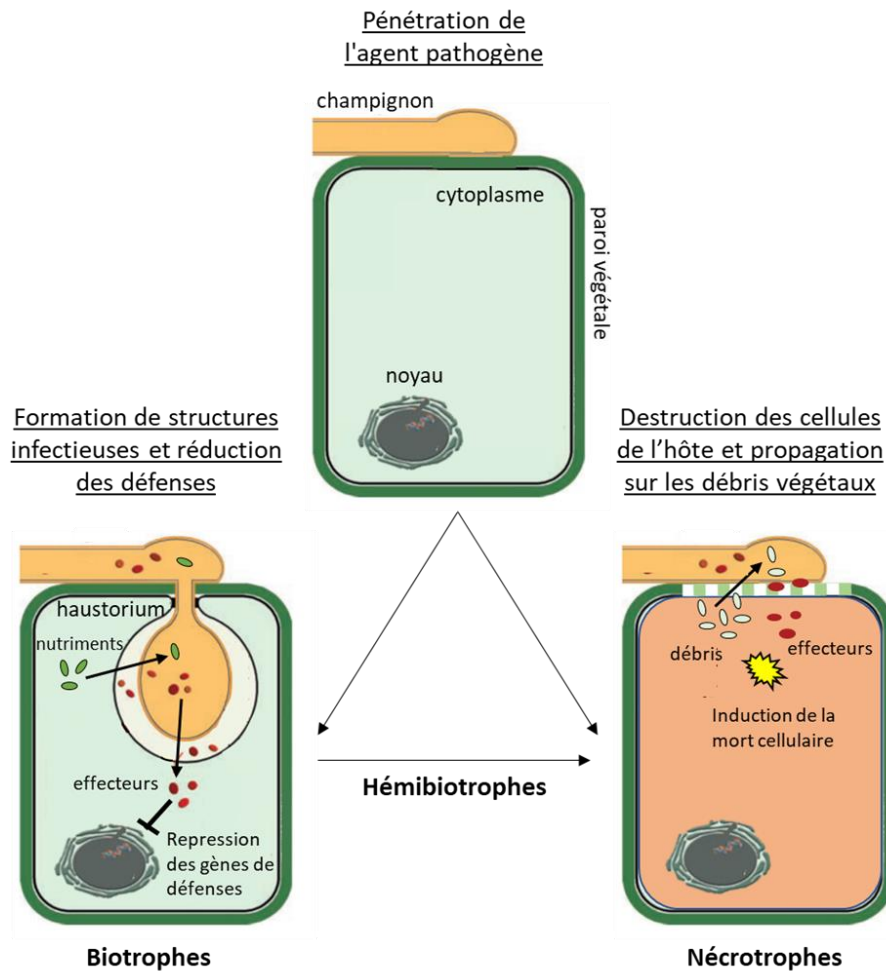
» et « les facteurs de virulence »). On distingue les effecteurs apoplasmiques et les effecteurs cytoplasmiques ayant respectivement des cibles dans l'apoplasme et dans le cytoplasme.

## 2. Les nécrotrophes

Contrairement aux champignons biotrophes se nourrissant sur des tissus vivants, les nécrotrophes vont induire rapidement la mort des cellules de leurs hôtes et se nourrir à partir des débris de tissus végétaux morts. Ces champignons sont dotés d'un arsenal de facteurs de virulences riche contenant notamment des enzymes lytiques et des toxines qui vont affecter l'intégrité cellulaire (Figure 2). Néanmoins ils sont aussi capables d'agir finement par le détournement des stratégies de défense de la plante en stimulant la mort cellulaire programmée et en inhibant les défenses (Shao *et al.*, 2021). Le champignon nécrotrophe le plus important économiquement parlant est *Botrytis cinerea*, en partie grâce à sa capacité à infecter un très large spectre d'hôtes (voir section « Un modèle incontournable : *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise » ; Dean *et al.*, 2012). Arrivent ensuite deux espèces du genre *Fusarium*, *F. graminearum* phytopathogène important chez le blé et *F. oxysporum*, agent pathogène à large spectre d'hôte pouvant même infecter l'espèce humaine. Les *Fusarium* sont réputés aussi pour leurs mycotoxines très dangereuses pour les êtres humains et les animaux même à faibles doses conduisant à un contrôle systématique de leur teneur dans les récoltes de blé dans un grand nombre de pays.

## 3. Les hémibiotrophes

Comme leur nom l'indique, les champignons hémibiotrophes vont alterner d'un mode de vie biotrophe initial à un mode de vie nécrotrophe dans la phase finale de l'infection (Figure 2). La durée de la phase biotrophe est variable en fonction des organismes, elle peut aller d'un à plusieurs jours voire des semaines. Les champignons du genre *Colletotrichum* notamment responsables de l'anthracnose chez le haricot et le champignon *Magnaporthe oryzae* responsable de la pyriculariose du riz sont des exemples de champignons hémibiotrophes. Ils pénètrent leurs hôtes, produisent des structures spécialisées, appelées chez ces organismes hyphes spécialisées et non haustoria, qui vont permettre de prélever les nutriments depuis les cellules végétales vivantes (Doehlemann *et al.*, 2017). Puis, s'en suit une transition vers la phase nécrotrophe avec une production de toxines, d'enzymes de dégradation de la paroi végétale et d'effecteurs spécialisés. Enfin, la définition de ces types trophiques est actuellement sujette à débat car des champignons décrits comme purement nécrotrophes semblent posséder en premier lieu une courte phase de prolifération non-destructive et asymptomatique (Bi *et al.*, 2022; Spanu, 2012).



**Figure 2:** Représentation schématique des différents modes de vie chez les champignons phytopathogènes. Adapté de Catanzariti et al (2007).

#### 4. Les différents niveaux de spécialisation à l'hôte

Comme il a été mentionné dans certains exemples ci-dessus, certaines espèces de champignons sont spécialisées dans l'infection d'une espèce d'hôte alors que d'autres sont plus généralistes, possédant jusqu'à plusieurs centaines d'espèces d'hôtes comme c'est le cas pour le nécrotrophe *B. cinerea* ou encore le biotrophe *Claviceps purpurea*. Cette considération est donc à séparer du type trophique. De plus, certains isolats d'agents pathogènes généralistes peuvent avoir une agressivité plus forte sur l'hôte dont ils sont issus et moins forte sur d'autres plantes hôtes, c'est le cas de *B. cinerea* (Mercier *et al.*, 2021). Chez l'oomycète *Aphanomyces euteiches*, la préférence de certaines souches à parasiter le pois ou la luzerne pourrait s'expliquer par une partie spécifique de leur sécrétome contenant de petites molécules à fonctions inconnues (Kiselev *et al.*, 2022). Ceci illustre bien que même chez les agents pathogènes généralistes il existe au sein des populations des

mécanismes poussant à la spécialisation partielle sur certaines espèces d'hôtes. Au niveau évolutif, il arrive dans certains cas que la restriction du spectre d'hôte soit due à l'apparition d'un gène de résistance chez l'hôte reconnaissant un facteur d'avirulence, rendant ainsi impossible l'infection (Doehlemann *et al.*, 2017). Le modèle classique de coévolution est comme une course à l'armement entre hôte et agent pathogène, il soutient l'existence d'une pression poussant les agents pathogènes à la spécialisation à la suite d'un gain de virulence (Leggett *et al.*, 2013). Néanmoins il a été démontré récemment que ce modèle ne peut s'adapter à *B. cinerea* pour qui la spécialisation partielle s'accompagne non pas d'un gain mais d'une perte de virulence affectant son interaction avec d'autres plantes hôtes (Caseys *et al.*, 2021). La spécialisation chez certains agents pathogènes pourrait ainsi provenir d'une contrainte naturelle limitant les contacts avec seulement une espèce d'hôte entraînant au cours du temps une perte de facteurs de virulence non essentiels mais qui de ce fait limiterait les infections sur d'autres hôtes. Kusch *et al* (2022) ont observé chez *Sclerotinia trifoliorum* une absence de réponse transcriptionnelle à la camalexine, un composé toxique produit par les plantes de la famille des Brassicacées ne faisant pas partie du spectre d'hôte de *S. trifoliorum*. Néanmoins ce champignon possède le même bagage génétique que son proche parent *S. sclerotiorum* capable de répondre à ce composé et d'infecter les plantes de cette famille. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que les variations du spectre d'hôte peuvent également provenir de la plasticité des réponses transcriptionnelles et pas seulement de l'acquisition ou de la perte de gènes de virulence.

## 2) La réponse des plantes : d'une défense passive à une défense active

Comme discuté ci-dessus, il existe une multitude de champignons phytopathogènes disposant de stratégies différentes d'infection. Les plantes, constamment sujettes aux stress causés non seulement par des champignons et autres microorganismes pathogènes (stress biotiques) mais également par l'environnement (stress abiotiques), ont dû développer des stratégies efficaces de défense pour survivre. Contrairement aux humains, les plantes ne possèdent pas de cellules immunitaires spécialisées mais ont développé un système de défense basé sur des barrières préformées constitutives et une immunité innée inductible pour se défendre contre les bioagresseurs (Spoel & Dong, 2012).

### A. Les défenses préformées

Ces défenses préformées préexistent à l'infection par les agents pathogènes et reposent sur des barrières physiques telles que la cuticule et la paroi végétale. Il existe aussi les barrières chimiques constituées de protéines et de métabolites possédant une activité antimicrobienne et circulant dans le fluide apoplasmique. Elles permettent de restreindre les agents pathogènes avant même leur perception et favorisent l'induction d'une réponse de défense. Ces barrières sont localisées dans la matrice extracellulaire et ses fluides qui définissent ensemble le compartiment apoplasmique.

#### 1. La cuticule

La cuticule est une structure hydrophobique qui couvre la couche de cellules épidermiques des parties aériennes de la plante. Cette cuticule représente une des adaptations des plantes au cours de l'évolution qui a permis une résistance aux stress biotiques et abiotiques (Jeffree, 2006; Nawrath *et al.*, 2013). La composition de la cuticule varie en fonction des espèces, des organes et des stades de développement mais est généralement composée de deux grands types de lipides : les cutines et les cires. La cutine est un polymère formé d'acides gras  $\omega$ -hydroxylés alors que les cires sont composées d'acides gras à longues chaînes et leurs dérivés incluant des alcanes, des alcools et des aldéhydes ainsi que des métabolites spécialisés comme les flavonoïdes et les triterpénoïdes (Jeffree, 2006). La cuticule a un rôle important dans les interactions plantes-agents pathogènes non seulement comme barrière physique mais également par la capacité de ses composés à agir comme molécules de signalisation et de défense (Ziv *et al.*, 2018).

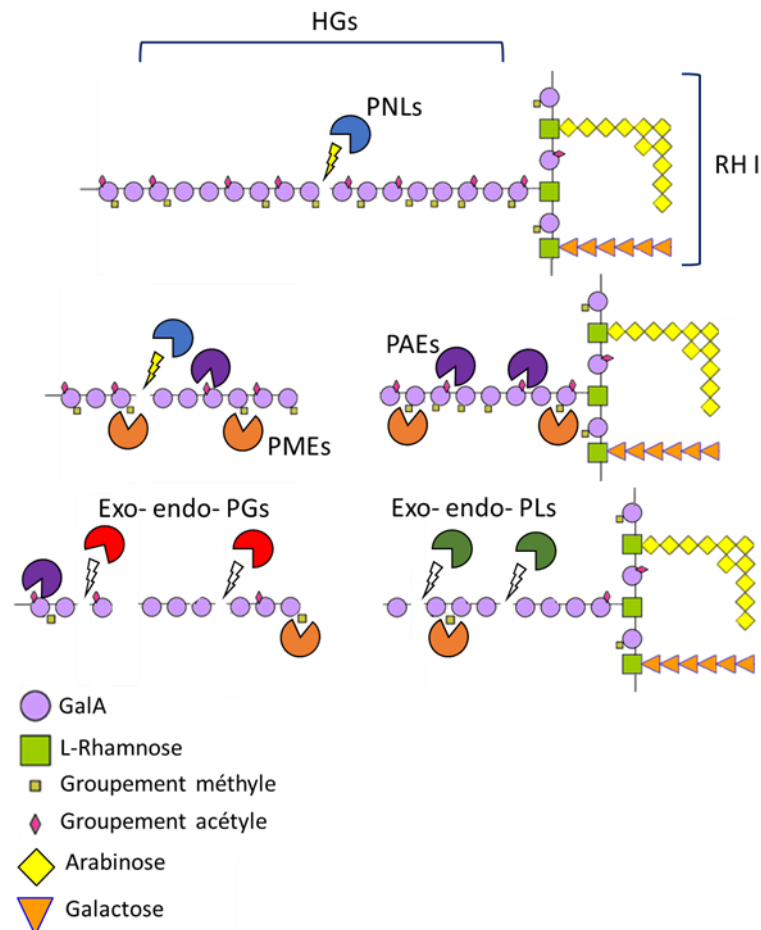


## 2. La paroi végétale

La paroi végétale primaire est la seconde barrière que va devoir surmonter un agent pathogène afin d'atteindre la cellule végétale. Celle-ci contient des polymères de carbohydrates comme la pectine, la cellulose et l'hémicellulose mais également des glycoprotéines et d'ions calcium liés étroitement. Les pectines sont principalement composées d'homogalacturonanes (HGs) formant le squelette du polymère et de rhamnogalacturonanes 1 et 2 (RH1, RH2) (Figure 3). Les HGs sont composés d'un enchaînement de monomères d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique (GalA) alors que les RH1 sont constitués de dimères de GalA et de  $\alpha$ -L-rhamnose. Les RHs 1 et 2 possèdent aussi des ramifications composées de différentes molécules dont des sucres comme le galactose et l'arabinose. De plus, ces polymères sont définis par leur degré d'estérification qui va faire varier la rigidité de la paroi. En effet les GalA peuvent être méthylés sur leurs fonctions acides ou acétylés sur leur fonctions alcools. Ces estérifications sont dépendantes de l'activité d'enzymes appelées les pectine estérases comprenant les pectine méthylestérases (PMEs) et les pectine acétylestérases (PAEs). La pectine est constamment remodelée par ces estérases et également par les dépolymérase dont font partie les hydrolases avec les endo- et exo-polygalacturonases (PGs) et les lyases avec les endo- et exo- pectates lyases (PLs) et les pectine lyases (PNLs). Une fois déméthylée et désacétylée par les estérases, la pectine peut être dégradée par les PGs ainsi que les PLs alors que sous sa forme hautement méthylé et acétylé elle ne pourrait être dégradé que par les PNLs (Sénéchal *et al.*, 2014). Contrairement à la pectine, la cellulose et l'hémicellulose sont des polymères composés de sucres. La cellulose est composée exclusivement de glucose et forme des microfibrilles associées en plusieurs couches alors que l'hémicellulose est composée de différents sucres et permet le pontage des fibres de celluloses aux autres composants de la paroi. La paroi est également dotée de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) comme les extensines s'associant en polymères et formant un réseau avec les autres composants de la paroi, permettant ainsi son renforcement. Les extensines sont notamment fortement accumulées lors des interactions plantes-agents pathogènes (Mishler-Elmore *et al.*, 2021). Certaines cellules spécialisées vont également être dotées d'une paroi végétale secondaire composée des mêmes polymères que la paroi primaire avec en plus de la lignine. Cette lignine est un dérivé du métabolisme des phenylpropanoïdes et se compose de molécules phénoliques regroupées sous le terme de monolignols polymérisés par oxydation (Vogt, 2010). L'importance de la lignine dans la défense a été démontrée par exemple dans l'interaction entre le blé et *B. graminis*. Lors de l'infection par ce champignon, la plante répond par l'accumulation de composants de la paroi, dont la lignine, au point de pénétration du champignon. Il se forme alors ce qu'on appelle une papille. Bhuiyan *et al* (2009) ont montré que l'extinction de gènes impliqués dans la synthèse des monolignols chez le blé

empêche la formation de la papille et réduit la résistance de la plante. Finalement, comme il a été montré dans un grand nombre de travaux portant sur des mutants de délétion ou des surexprimeurs de gènes impliqués dans le remodelage de la paroi, la composition de la paroi a un impact important sur la réponse des plantes aux stress biotiques (Bacete *et al.*, 2018).

En plus de son rôle de barrière passive la paroi végétale est impliquée dans la perception de signaux de l'agent pathogène. En effet, sa dégradation par les agents pathogènes est également perçue grâce à la reconnaissance des produits de dégradation, dont notamment les oligogalacturonides (OGs) dérivés de la pectine et les cello-oligosaccharides (COS) dérivés de la cellulose, conduisant ainsi à l'activation des défenses (Claverie *et al.*, 2018; Voxeur *et al.*, 2019; Howlader *et al.*, 2020; Zarattini *et al.*, 2021). De même, la tension exercée par l'agent pathogène sur la paroi lors de l'infection peut être traduite en signaux activant les réactions de défense à des sites distants, cette réaction est appelée mécanoperception (Léger *et al.*, 2022).



**Figure 3: Représentation schématique des principales enzymes de dégradation de la pectine.** Adapté de Niture (2008).

### 3. Les barrières chimiques

En plus des barrières physiques, la plante possède un arsenal de barrières chimiques prêtes à répondre à tout moment à l'infection par les agents pathogènes. Parmi-elles, le pH acide de l'apoplasme constitue un frein à l'action des enzymes de certains agents pathogènes nécessitant un pH basique. De plus, on trouve à un niveau basal dans l'apoplasme des enzymes de la plante impliquées dans la défense comme les bien connues *pathogenesis related proteins* (PRs) faisant également partie des défenses induites. Il existe par exemple une très forte corrélation entre le niveau basal d'expression de ces protéines de défense chez différentes lignées du riz et la résistance partielle à l'infection par *M. oryzae* (Vergne *et al.*, 2010). Ces protéines, classées en familles de PR1 à PR14, jouent néanmoins un rôle majeur dans la défense induite (voir section « L'induction des défenses : PTI et ETI »). Nous pouvons citer entre autres les chitinases qui vont dégrader la paroi des champignons pathogènes et permettre l'élicitation des défenses, les peroxydases impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*) toxiques et impliqué dans la signalisation des défenses, les inhibiteurs d'enzymes fongiques et les protéases (voir section « Les protéines de défense »). La plante produit également des métabolites primaires comme le glutathion et l'ascorbate constamment présents dans l'apoplasme et impliqués dans de nombreux processus dont la détoxification des ROS et autres molécules toxiques (Noctor, 2006). Des métabolites spécialisés appelés phytoanticipines comme les glucosinolates et les saponines sont présents de façon constitutive chez les plantes pour la défense contre les agresseurs, en opposition aux phytoalexines synthétisées suite à la perception de l'agent pathogène (voir section « Métabolisme et défense »).

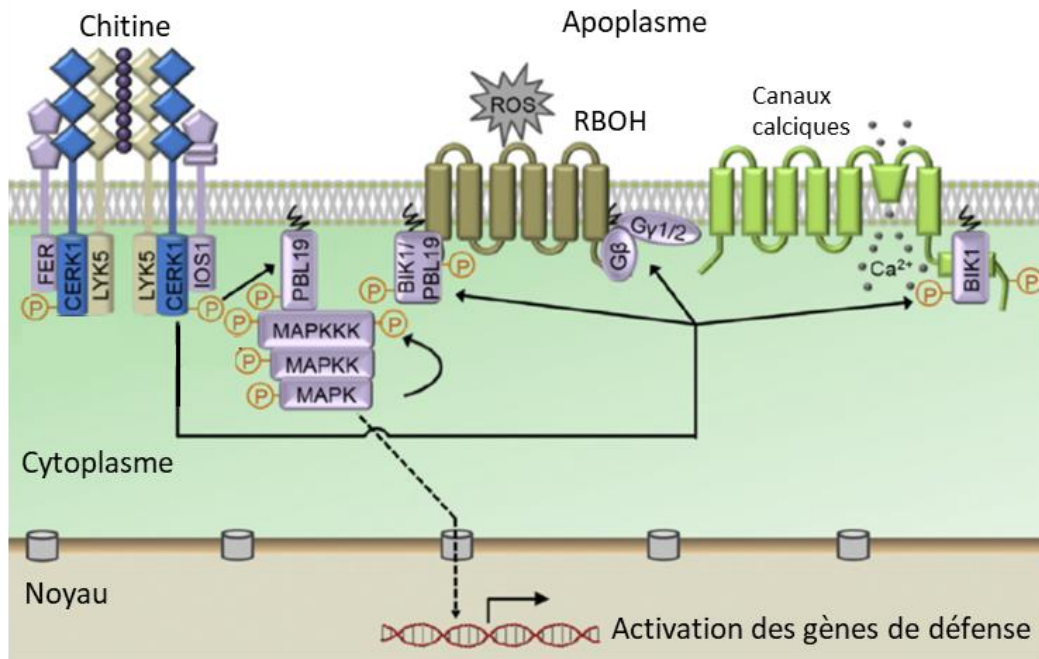
#### B. L'induction des défenses : PTI et ETI

L'induction des défenses fait suite à la perception par la plante d'une agression externe par un agent pathogène. Contrairement aux barrières préformées, l'induction des défenses est spécifique du bioagresseur auquel la plante va être confrontée. Une des réactions principales d'induction des défenses est la *pamp triggered immunity* (PTI) qui s'initie par la perception des *pathogen, microbial or damage associated molecular patterns* (PAMPs, MAMPs ou DAMPs). Ces molécules sont reconnues par des récepteurs membranaires appelés *pattern recognition receptors* (PRRs). Lors de l'interaction entre un champignon phytopathogène et son hôte, les oligomères de chitine sont parmi les premières molécules perçues par la plante. La chitine, polymère de  $\beta$ -1,4-N-acetylglucosamine, et les  $\beta$ -glucanes sont deux composants essentiels de la paroi des champignons, tous deux capables d'induire la PTI. Ces polymères hautement conservés chez les champignons sont perçus sous leur

forme d'oligomères après dégradation préalable notamment par les chitinases et  $\beta$ -glucanases apoplasmiques de la plante. La reconnaissance des oligomères de chitine est très bien décrite chez *Arabidopsis thaliana* et dépend d'un complexe de récepteurs membranaires composé de *lysM domain receptor-like kinase 5* (AtLYK5), un récepteur à activité kinase contenant des motifs Lysin (LysM-RLK) possédant une forte affinité pour la chitine, et de son corécepteur *chitin elicitor receptor kinase 1* (AtCERK1) (Figure 4, Gong *et al.*, 2020). Cette liaison ligand-récepteur conduit rapidement à un influx de calcium par activation des canaux membranaires et à une réaction appelée le *burst* oxydatif. Ce *burst* oxydatif consiste en une rapide et forte production de ROS dans l'apoplasme impliquant les NADPH oxydases membranaires, aussi appelée les *respiratory burst oxidase homologs* (RBOHs) ainsi que les peroxydases apoplasmiques (Daudi *et al.*, 2012; Galletti *et al.*, 2008). La perception de la chitine et autres activateurs de la PTI conduit aussi à une cascade de signalisation médiée par les *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPKs) mais aussi par la production de ROS. De plus, la perception des agents pathogènes entraîne une augmentation de la production de phytohormones impliquées dans l'induction des gènes de défense comme l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET). D'autres phytohormones possédant un rôle dans les défenses seront produites comme notamment l'acide abscissique (ABA) impliqué dans la fermeture des stomates pour limiter la pénétration de l'agent pathogène. Cette perception de l'agent pathogène entrainera *in fine* la transcription des gènes de défense dont notamment les gènes codant les PRs et une activation du métabolisme spécialisé avec la production de molécules antimicrobiennes (Yu *et al.*, 2017). On observe également une réorganisation du cytosquelette des cellules infectées avec notamment une polarisation du réseau formé par les filaments d'actine permettant le transport du matériel antimicrobien au point d'infection (Higaki *et al.*, 2011). Il se produira également un remodelage de la paroi avec l'apposition de callose, un polymère de glucose, et de lignine afin de renforcer les barrières physiques. Ferrari *et al* (2013) ont observé à l'aide d'OGs synthétiques que la perception des OGs chez *A. thaliana* est médiée par leur liaison au RLK *wall-associated kinase 1* (AtWAK1) et conduit à une réaction similaire à celle induite par la chitine et autres éliciteurs microbiens. Celle-ci implique de plus la production d'oxyde nitrique (NO) pour la régulation des gènes induits par les OGs (Rasul *et al.*, 2012).

La seconde réponse immunitaire connue chez les plantes est l'*effector triggered immunity* (ETI). Cette réaction, décrite initialement chez les bactéries, s'initie par la reconnaissance spécifique de facteurs d'avirulence (*Avr*) de l'agent pathogène par des protéines de résistance de la plante (protéine R). L'interdépendance entre protéine *Avr* et protéine R dans la résistance des plantes médiée par l'ETI est appelée la relation gène pour gène. Cette réponse est plus rapide et intense que la PTI et conduit à une résistance totale de la plante. Elle est souvent associée à la réaction hypersensible (HR). Celle-ci consiste en un type de mort cellulaire programmée de la plante (PCD

pour *programmed cell death*) conférant un avantage contre les pathogènes biotrophes nécessitant des cellules vivantes à parasiter. En revanche, elle apparaît désavantageuse contre les agents pathogènes nécrotrophes qui dans certains cas produisent des effecteurs qui induisent cette HR (Frías *et al.*, 2011; Locato & De Gara, 2018).



**Figure 4:** Représentation schématique de la PTI induite par la reconnaissance de la chitine. Adapté de Gong *et al* (2020).

### C. Voies hormonales de l'immunité

Les hormones des plantes sont bien connues pour leur rôle dans la régulation de la croissance, du développement et de la reproduction mais possèdent également un rôle important dans la régulation de l'immunité. Leurs voies de signalisation sont interconnectées dans un réseau complexe permettant une régulation fine des réactions de défense et adaptée à l'agresseur perçu par la plante. Nous traiterons ici plus en détail des deux voies les plus importantes dans la défense contre les agents phytopathogènes fongiques, la voie du JA et celle du SA.

#### 1. La voie du SA

Faisant partie intégrante de notre pharmacopée quotidienne de par ses propriétés anti-inflammatoires sous sa forme acétylée, le SA est un composé phénolique synthétisé dans le chloroplaste des plantes à partir du chorismate. Il existe deux voies distinctes de biosynthèse du SA,

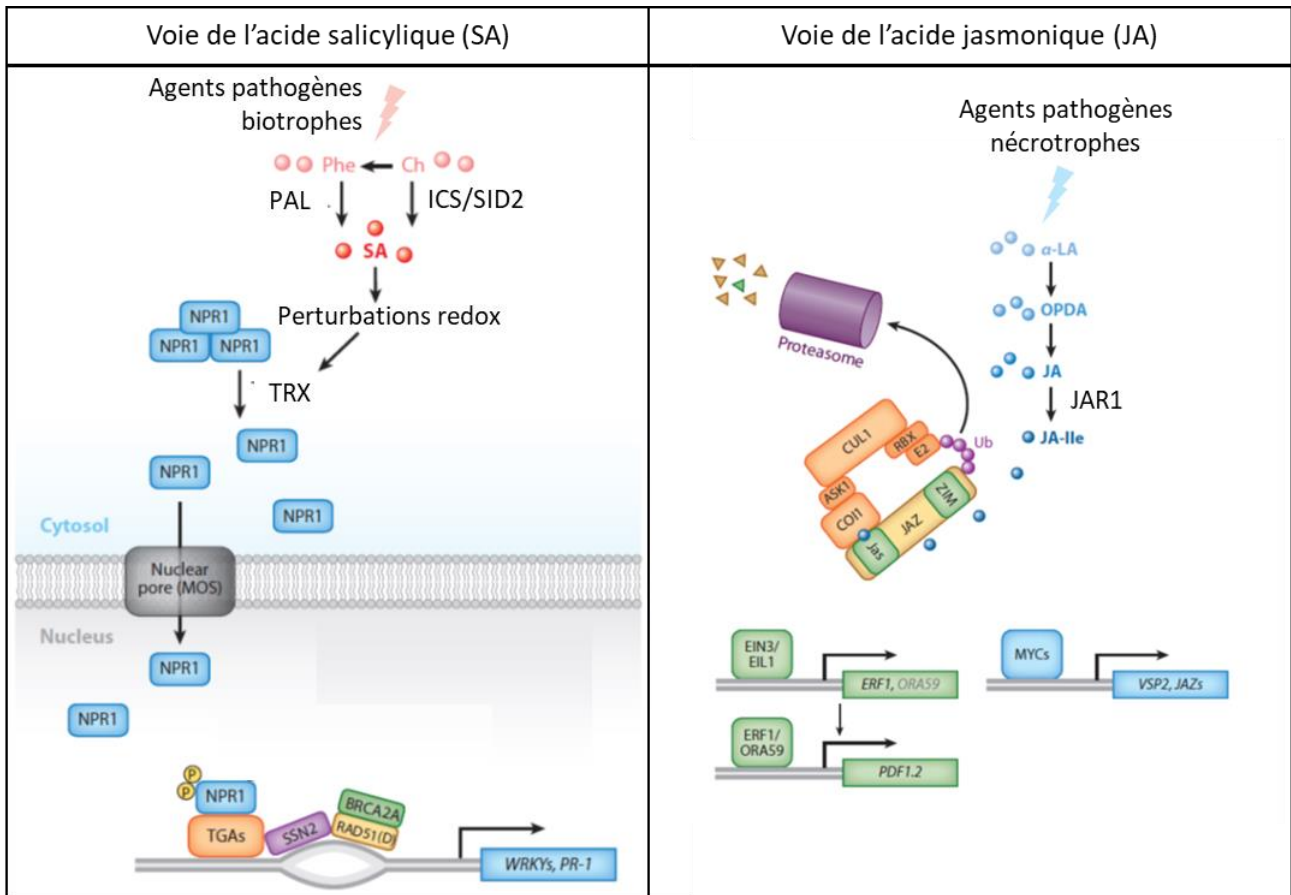
la première impliquant la phénylalanine ammonia lyase (PAL) et la seconde l'isochorismate synthase (ICS/SID2, Figure 5). Le SA ainsi produit est majoritairement stocké sous ses formes inactives glycosylées, méthylées ou conjuguées aux acides aminés. Lors de la réaction de défense le SA est transporté dans le cytoplasme par *enhanced disease susceptibility 5* (EDS5) où il induit des changements dans l'état redox de la cellule ce qui va permettre la monomérisation sous l'action de thioredoxines (TRXs) et la translocation dans le noyau de *non-expressor of pathogenesis-related genes 1* (NPR1). Ce coactivateur transcriptionnel va interagir dans le noyau avec des facteurs de transcription de la famille des *basic leucine zippers* (bZIPs) de la sous classe des TGAs (se liant aux motifs TGACG) pour activer l'expression d'un large set de gènes impliqués dans la défense comme les facteurs de transcription WRKYs et certaines protéines PRs (Pieterse *et al.*, 2012). L'une d'entre elles, la protéine PR1 est souvent utilisée comme marqueur de l'activation de la voie du SA. Cette voie hormonale est importante dans la défense contre les agents pathogènes biotrophes comme l'ont montré des études sur les mutants *sid2* et *eds5* chez *A. thaliana* déficients dans l'activation de la voie du SA et plus sensibles à ces bioagresseurs (Dewdney *et al.*, 2000; Nawrath, 1999). En revanche, contre les nécrotrophes la voie du SA semble moins efficace voire défavorable dû à sa capacité à induire la PCD chez la plante par HR. Par exemple, El Rahman *et al* (2012) ont observé qu'un traitement de la tomate au SA favorise l'infection par les champignons nécrotrophes *B. cinerea* et *alternaria solani*. Cependant le lien précis entre la voie du SA et l'induction de la HR n'est pas encore totalement compris (Radojčić *et al.*, 2018). Enfin le SA semble fortement impliqué dans l'activation systémique des défenses de la plante afin de parer aux infections à d'autres sites plus distants que le point de contact initial avec l'agent pathogène. Cette réaction de défense systémique est appelée la *systemic acquired resistance* (SAR) et est dépendante de NPR1 car le mutant de délétion correspondant est incapable de l'induire lors de son interaction avec la bactérie *Pseudomonas syringae* (Dong, 2004; Gao *et al.*, 2015).

## 2. La voie du JA

Le JA et les différents composés qui lui sont associés sont issus de la voie de synthèse des oxylipines et sont produits dans le chloroplaste à partir des lipides triénoïques dont l'acide  $\alpha$ -linoléique ( $\alpha$ -LA) et l'acide hexadécatriénoïque. L'acide 12-oxo-phytodienoïque (OPDA) est un des premiers précurseurs transformés par  $\beta$ -oxydation pour donner le JA et ses différentes formes conjuguées comme le JA-isoleucine (JA-Ile), le JA-tryptophane (JA-Trp) ainsi que le méthyl-JA (MeJA) et l'hydroxyl-JA (Figure 5). Les différentes formes conjuguées du JA ainsi que l'OPDA sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes de réponse aux stress biotiques et abiotiques (Pieterse *et al.*, 2012). Le mécanisme d'action le mieux décrit implique

le JA-Ile, formé par l'action de *jasmonate conjugate synthase 1* (JAR1), qui se lie à la protéine *coronatin insensitive 1* (COI1). Ce complexe permet l'inactivation, par ubiquitination puis dégradation par le protéasome, des *jasmonate ZIM-domains proteins* (JAZs) impliqués dans la répression des gènes répondant au JA (Figure 5, F. Zhang *et al.*, 2015). Cette dégradation permet l'activation de facteurs de transcriptions comme MYC2, 3 et 4 régulant l'activation de gènes de défense (Niu *et al.*, 2011). L'activation d'une autre voie que celle des MYCs, appelée la voie *ethylen response factor* (ERF) nécessite l'activation conjointe de la voie de signalisation du JA et de l'ET permettant ainsi la transcription de gènes comme *plant defensin 1.2* (PDF1.2) souvent utilisé comme marqueur de la voie du JA (Pieterse *et al.*, 2012). La voie MYC est généralement associée à la défense contre les insectes herbivores bien que MYC2 ait un rôle important contre les agents-pathogènes alors que la voie ERF est généralement associée à la défense contre les agents pathogènes nécrotrophes (Lorenzo *et al.*, 2003).

Il existe une interconnexion entre les voies du SA et du JA. Celle-ci permet une flexibilité dans les voies de signalisation pour favoriser un contrôle précis de l'activation des défenses en fonction de l'agent pathogène perçu par la plante. Le lien entre ces deux voies peut être de nature antagoniste ou synergique en fonction de la situation. L'antagonisme entre ces voies est notamment dépendant de NPR1 et de l'activation de la voie de l'ET (Leon-Reyes *et al.*, 2009). Celui-ci est parfois exploité par les bioagresseurs afin de promouvoir la répression de la voie entraînant une meilleure résistance. La coronatine, une phytotoxine produite par la bactérie *P. syringae* en est un très bon exemple puisque celle-ci, agissant comme un analogue du JA, entraîne une inhibition de la voie du SA et donc une perte de résistance de la plante vis-à-vis de la bactérie (Laurie-Berry *et al.*, 2006).



**Figure 5: Représentation schématique de l'activation des voies hormonales du SA et du JA lors de la réaction de défense.** Adapté de Pieterse et al (2012).

#### D. Les protéines de défense

Lors de la réaction de défense des plantes contre les bioagresseurs, un grand nombre de protéines de défense vont être produites. Celles-ci vont favoriser la défense contre l'infection en permettant une meilleure perception des signaux de l'agent pathogène ou bien grâce à leur activité antimicrobienne ou enfin par leur capacité à renforcer les barrières physiques.

##### 1. Les chitinases

Les chitinases sont des enzymes importantes dans la défense des plantes contre les agents-pathogènes fongiques. Elles sont également impliquées dans différents processus comme la synthèse de l'éthylène, l'embryogénèse et la réponse aux stress abiotiques (Vaghela *et al.*, 2022). Il existe quatre classes de chitinases (I, II, III et IV) regroupées selon leurs homologues de séquence peptidique. Celles-ci sont présentes de façon ubiquitaire dans un grand nombre d'organes des plantes et leur expression est fortement induite lors d'un stress biotique (Vaghela *et al.*, 2022). Elles



sont capables d'entraîner la dégradation de la chitine constituant la paroi des champignons, ce qui a pour conséquence une activité antifongique directe, ainsi qu'une action antifongique indirecte par la libération d'oligomères de chitine perçus par la plante, entraînant ainsi l'activation des défenses (voir section « L'induction des défenses : PTI et ETI »). Les chitinases sont souvent la cible de protéases fongiques comme cela a été montré dans l'interaction entre *Verticillium dahliae* et le coton (Han *et al.*, 2019). Dans cette étude les auteurs ont montré qu'une protéine nommée *cystein-rich repeat protein 1* (CRR1) pouvait s'associer à la chitinase 28 du coton afin de prévenir sa dégradation par une protéase du champignon, montrant ainsi l'importance des chitinases pour la plante.

## 2. Les peroxydases

Les peroxydases (PRXs) des plantes et notamment les PRXs apoplasmiques de classe III sont essentielles à la défense des plantes. En effet, celles-ci sont impliquées dans la production de ROS lors du *burst oxydatif* associé à la PTI et l'ETI entraînant un stress oxydatif chez l'agresseur. Elles permettent également l'ajustement de l'état redox lors de l'interaction afin de maintenir une stimulation des défenses mais aussi d'éviter les effets délétères du stress oxydatif pour la plante. De plus, ces PRXs sont impliquées dans le renforcement de la paroi notamment par l'assemblage du réseau d'extensines et la polymérisation des monolignols pour la formation de la lignine (Mishler-Elmore *et al.*, 2021). Il a également été montré que les PRXs de classe III pouvaient utiliser dans l'apoplasme les OGs oxydés par les OG oxidases (OGOXS) lors de l'infection afin de réaliser la polymérisation de la lignine (Scortica *et al.*, 2022).

## 3. Les inhibiteurs enzymatiques

Afin de bloquer l'invasion par les agents pathogènes, les plantes produisent également des inhibiteurs enzymatiques ayant pour but de réduire l'activité des enzymes microbiennes (Misas-Villamil & van der Hoorn, 2008). On peut citer par exemple les inhibiteurs d'enzymes de dégradation de la paroi végétales comme les inhibiteurs de polygalacturonases (PGIPs), les inhibiteurs de pectine méthylestérases (PMEIs) et les inhibiteurs de xylanases (XIPs) ainsi que des inhibiteurs de protéases (IPs). Ces protéines font partie des PRs et leur expression est fortement induite lors de l'interaction plante-agent pathogène. Il existe un lien évolutif fort entre les enzymes microbiennes et les inhibiteurs produits par les plantes qui participe au modèle évolutif de la course à l'armement (Misas-Villamil & van der Hoorn, 2008; A. Raiola *et al.*, 2008).

#### 4. Les protéases

La superfamille des protéases (aussi appelées protéinases ou peptidases) représenterait environ 2% des protéines produites chez tous les organismes. La protéolyse médiée par les protéases est impliquée dans de nombreux grands processus biologiques comme la maturation des protéines, le turnover protéique, la transduction de signaux, la mort cellulaire programmée ou encore le développement. De plus, il a été montré dans un grand nombre d'études qu'il existe une accumulation, dans la région apoplasmique, de protéases produites par la plante lors des interactions plantes-agents pathogènes (Wang *et al.*, 2020). Les protéases et plus précisément les protéases apoplasmiques permettent une meilleure résistance des plantes dans un grand nombre de pathosystèmes. Un de leurs rôles dans la défense des plantes est la génération de DAMPs par la dégradation de précurseurs protéiques endogènes. Un exemple est la systémine, un peptide impliqué dans l'élicitation des défenses chez la tomate dont le précurseur, la prosystémine, est clivé par deux protéases de *Solanum lycopersicum*, SIPhytaspase-1 et SIPhytaspase-2 (Beloshistov *et al.*, 2018). Des protéases sont également impliquées dans la dégradation de PRRs et la libération d'ectodomains permettant la régulation des défenses comme il a été montré pour le RLK AtCERK1 chez *A. thaliana* (Petutschnig *et al.*, 2014). Une autre fonction des protéases dans la défense des plantes est l'activation de l'ETI. On peut citer par exemple une protéase à cystéine de la tomate, SIRCR3, impliquée dans la résistance à un grand nombre d'agents pathogènes comme le champignon *Cladosporium fulvum*. En effet, SIRCR3 fixée par l'effecteur d'avirulence CfAvr2 permet sa reconnaissance par la protéine R Cf-2 entraînant la résistance de la plante par induction de la HR (Rooney *et al.*, 2005). Bien d'autres protéases apoplasmiques ont un rôle dans l'induction de la HR. C'est le cas de la Cathepsine B, un régulateur positif de la HR chez *A. thaliana* et *Nicotiana benthamiana* impliqué dans la résistance basale contre les bactéries, ou Pip1, une protéase de la tomate impliquée dans l'induction de la HR en réponse au champignon *C. fulvum* (Salguero-Linares & Coll, 2019; Thomas & van der Hoorn, 2018). Enfin un rôle dans l'activation de la SAR a été identifié pour certaines protéases de plante comme *constitutive disease resistance 1* (AtCDR1) qui est impliqué dans l'activation locale et systémique des défenses d'*A. thaliana* contre *P. syringae* DC3000 (Xia *et al.*, 2004). Son action serait médiée par la libération d'un peptide induisant l'activation de la voie du SA.

#### E. Métabolisme et stress biotiques

Une des réponses de défense chez la plante lors de l'infection est la répression de la photosynthèse et des autres processus associés au métabolisme primaire qui sont essentiels à sa

croissance. Une théorie émise par la communauté scientifique explique que cette répression aurait pour but d'économiser de l'énergie afin d'optimiser la défense et notamment la production de métabolites spécialisés décrits comme impliqués dans les interactions entre la plante et son environnement. Néanmoins, de nombreuses études récentes suggèrent que certaines voies du métabolisme primaire peuvent également être induites lors des interactions plantes-agents pathogènes. De même, certains métabolites spécialisés peuvent être impliqués dans la régulation de la croissance et non pas seulement dans la réponse aux stress (Erb & Kliebenstein, 2020).

## 1. Métabolisme primaire et défense

L'activation du métabolisme primaire lors des interactions plantes-agents pathogènes permet de moduler les cascades de signalisation conduisant à l'activation des réactions de défenses. D'une part, les processus du métabolisme primaire impliquant la production rapide d'énergie sont induits après exposition soit à des agents pathogènes soit à des éliciteurs microbiens dans le but de soutenir les réactions de défense coûteuses en énergie (Less *et al.*, 2011). D'autre part, le métabolisme des carbohydrates, des acides aminés et des lipides permet non seulement la production de précurseurs permettant le renforcement des polymères de la paroi et la production des phytohormones mais également la production de ROS induisant l'activation de réactions spécifiques comme la HR (Rojas *et al.*, 2014). Les sucres notamment sont étroitement liés aux réactions de défense. Par exemple, chez *A. thaliana* le glucose est capable d'induire la production de AtPR1 et AtPR5 sous la dépendance d'enzymes comme l'hexokinase 1 impliquée dans la formation de glucose-6-phosphate (W. Xiao *et al.*, 2000). Il a également été mis en évidence que lors des interactions plantes-agents pathogènes un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates sont induits comme notamment les invertases de la paroi (cwINV) transformant le sucrose en glucose et fructose dans l'apoplasme. Chez *N. benthamiana* il a été montré que la répression des cwINV par ARN interférence (RNAi) conduit à une réaction de défense moins intense et une résistance diminuée vis-à-vis de l'oomycète *Phytophthora nicotianae* (Essmann *et al.*, 2008). L'implication des acides aminés dans la défense a pu être mise en évidence chez des mutants d'*A. thaliana* comme le mutant *lysine histidine transporter 1 (lht1)* affecté dans son accumulation de glutamine, alanine et proline ayant pour conséquence une plus grande sensibilité à l'infection par un grand nombre d'agents pathogène différents (Liu *et al.*, 2010). Concernant les lipides, leur accumulation est nécessaire à la production de ROS et à l'induction de la HR lors des interactions plantes-agents pathogènes. En effet le double mutant *fatty acid desaturase 7 et 8 (fad7fad8)* chez *A. thaliana* ayant un défaut d'accumulation d'acides gras triénoïques chloroplastiques présente une HR réduite et une résistance plus faible à l'infection par

*P. syringae* (Yaeno *et al.*, 2004). Enfin, une accumulation de *long-chain sphingoid bases* (LCBs), précurseurs des sphingolipides, à la suite de la perception d'un agent pathogène notamment lors de l'ETI permettrait la stimulation de la PCD (Berkey *et al.*, 2012).

## 2. Métabolisme spécialisé et défense

Les métabolites spécialisés sont généralement décrits comme impliqués dans les interactions entre la plante et son environnement, comme par exemple dans la réponse aux stress abiotiques. Ils ont également un rôle important dans les interactions avec les plantes voisines, les microorganismes bénéfiques et les agents pathogènes (Zaynab *et al.*, 2018a). Il existe trois grandes classes de métabolites spécialisés impliqués dans la défense contre les agents pathogènes : les terpènes, les composés phénoliques et les composés à base d'azote ou de soufre. Parmi les métabolites spécialisés importants pour la défense on peut citer les phytoanticipines, comme les glucosinolates et les saponines, qui sont des substances préformées et les phytoalexines, comme les isoflavones, les sesquiterpènes et les composés indoliques, produites lors de l'infection (voir section « l'induction des défenses : PTI et ETI »).

Le groupe le plus étudié des phytoanticipines est sans aucun doute celui des glucosinolates. Ces composés sont dérivés de différents acides aminés dont l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et aussi l'acide glutamique conduisant à une diversité structurale importante de ces métabolites (Piasecka *et al.*, 2015). Chez *A. thaliana*, deux groupes majoritaires de glucosinolates sont accumulés, les glucosinolates aliphatiques dérivés de la méthionine et les glucosinolates indoliques dérivés du tryptophane. Ces composés stables et inactifs sont lors d'une perte de l'intégrité cellulaire rapidement transformés en composés toxiques appelés les isothiocyanates (ITCs) par des enzymes connues sous le nom de myrosinases. L'importance des ITCs dans l'immunité a été démontrée par la résistance d'*A. thaliana* à des souches non adaptées de *P. syringae* ne possédant pas les enzymes de détoxification des ITCs aliphatiques (Fan *et al.*, 2011). De plus ce rôle n'est pas restreint aux bactéries étant donné que des mutants d'*A. thaliana* affectés dans la production d'ITCs aliphatiques sont plus sensibles au champignon pathogène *S. sclerotiorum* (Stotz *et al.*, 2011). Un autre groupe de phytoanticipines impliquées dans la défense sont les saponines de la famille des terpènes. Parmi elles la bien connue  $\alpha$ -tomatine a un rôle important dans l'immunité de la tomate par son action antimicrobienne et antifongique notamment sur *F. oxysporum* chez qui elle induit la mort cellulaire programmée (Ito *et al.*, 2007).

Dans le groupe des phytoalexines, la camalexine est la phytoalexine caractéristique d'*A. thaliana* bien connue pour son rôle antimicrobien. Celle-ci est un indole alcaloïde dérivé du

tryptophane faisant partie des composés azotés et soufrés et sa synthèse finale est réalisée par *phytoalexin deficient 3* (AtPAD3). Des études sur des mutants d'*A. thaliana* ne produisant plus de camalexine ont montré son importance dans la résistance à différents agents pathogènes fongiques dont *Alternaria brassicicola*, *B. cinerea* et *Plectosphaerella cucumerina* alors que celle-ci n'est pas essentielle pour la résistance à la bactérie *P. syringae* (Ahuja *et al.*, 2012). Les isoflavones sont des phytoalexines produites notamment par les plantes de la famille de Fabacées. Parmi ces composés, la medicarpine est fortement accumulée par *Medicago truncatula* suite à la perception d'éliciteurs microbiens (Naoumkina *et al.*, 2007). Les isoflavones sont des flavonoïdes produits par la voie du shikimate et des phenylpropanoïdes, cette voie du métabolisme spécialisé est très importante lors des interactions plantes-agents pathogènes et dépend d'un grand nombre d'enzymes de biosynthèse. Cette voie de biosynthèse semble être entièrement localisée dans les chloroplastes et débute à partir de la transformation de la phénylalanine, produite à partir du shikimate, en cinnamate par la *phenylalanine* ou *tyrosine amonia lyase* (PAL ou TAL) puis en p-Coumaroyl CoA, le métabolite central de cette voie (Zaynab *et al.*, 2018b). Les flavonoïdes, issus du p-Coumaroyl CoA transformé par l'action des chalcone synthases et isomérases, ont des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes les rendant incontournables pour la défense contre les agents pathogènes (Mierziak *et al.*, 2014). En effet, ils permettent le renforcement des tissus lors de l'infection et sont impliqués dans l'inhibition d'enzymes microbiennes grâce à leur activité chélatrice des ions métalliques (Mierziak *et al.*, 2014). Leur toxicité envers les agresseurs fongiques passe par l'inhibition de la germination des spores et de la croissance des hyphes. Les flavonoïdes peuvent entre autres augmenter la fluidité des membranes des cellules du bioagresseur et affecter la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 3) Un modèle incontournable : *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise

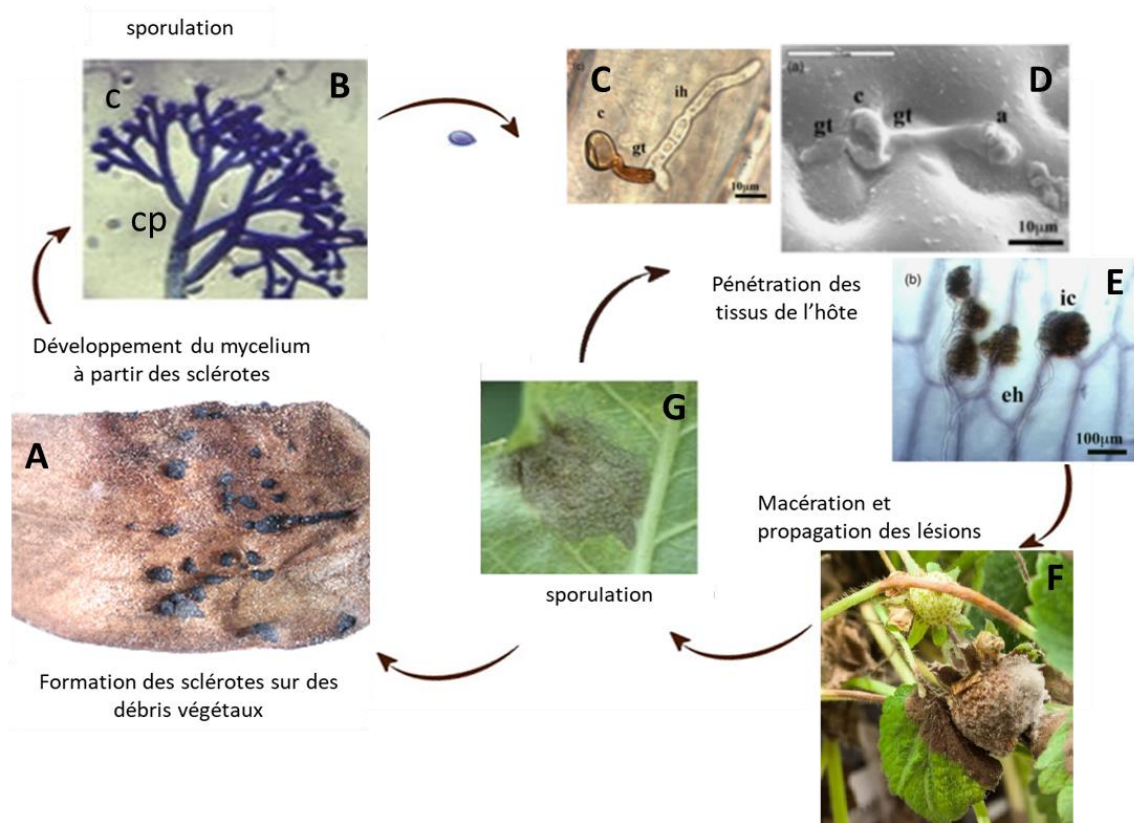
*Botrytis cinerea* (Pers.) est un champignon phytopathogène polyphage capable de s'adapter à des passages successifs de vie quasi saprophytique à vie parasitaire. Il fait partie des champignons nécrotrophes et appartient à la division des Ascomycètes, à l'ordre des Helotiales, à la classe des Leotiomycètes et la famille des Sclerotiniacées. Il est responsable de la pourriture grise, maladie très répandue sur un large spectre d'hôte. On estime aujourd'hui que *B. cinerea* aurait plus de 1400 espèces d'hôte, parmi lesquelles des plantes d'intérêt agronomique majeur comme la vigne, la tomate et le fraisier (Elad *et al.*, 2016). Les pertes financières dues à ce champignon sont difficiles à estimer du fait de son large spectre d'hôte mais on estime qu'environ 50% des pesticides utilisés sur la vigne aujourd'hui sont destinés à combattre la pourriture grise (Dean *et al.*, 2012). Malgré les recommandations de réduction de l'utilisation des pesticides, la technique principale de lutte contre ce champignon reste l'application de fongicides (Botryticides). Néanmoins plusieurs souches de *Botrytis cinerea* multi-résistantes aux fongicides ont été identifiées et certains phénomènes de contournement de la toxicité ont pu être décrits (Fillinger & Elad, 2016; Rupp *et al.*, 2017). D'autres méthodes relativement plus exigeantes existent pour lutter contre la maladie comme l'optimisation des pratiques culturales (le contrôle de la fertilisation des plantes, la réduction de densité de la plantation, une bonne aération de la canopée ou encore la récolte par temps sec) ainsi que l'utilisation d'agents de biocontrôle (Elad *et al.*, 2016). Néanmoins, une attaque tardive de ce champignon est recherchée en particulier chez la vigne car l'apparition de composés comme le glycérol et une concentration en sucre dans les baies de raisin permettent la réalisation de vin liquoreux comme le Sauternes, on l'appelle dans ce cas la pourriture noble. D'autre part, *B. cinerea* appartient à la même famille que l'agent pathogène responsable de la pourriture blanche, *Sclerotinia Sclerotiorum*. Ces deux agents pathogènes sont très souvent comparés du fait de leur proximité phylogénétique, de leur mode de vie nécrotrophe ainsi que de leur capacité à infecter un grand panel d'hôtes (Amselem *et al.*, 2011).

#### A. Cycle de vie

##### 1. Cycle de reproduction asexuée

Lorsque les conditions climatiques sont défavorables (hiver), *B. cinerea* forme des organes de résistance appelés sclérotes à l'intérieur desquels se trouve un amas mycélien (Figure 6A). A l'arrivée du printemps (humidité et températures plus favorables) le mycélium va pouvoir émerger des sclérotes. Ce mycélium va développer des conidiophores portant les macroconidies, spores

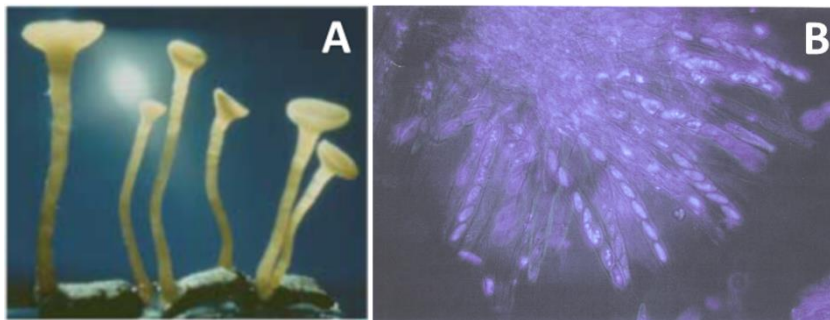
asexuées du champignon (Figure 6B). Ces spores vont ensuite être disséminées par le vent, la pluie et les insectes jusqu'à atteindre la surface d'un hôte potentiel. Lors de l'infection, les conidies arrivées à la surface de l'hôte vont commencer leur processus de germination. Celui-ci débute par la formation et l'élongation du tube germinatif qui va permettre la pénétration des tissus végétaux soit par des blessures déjà présentes soit par les stomates ou encore au niveau des sillons intercellulaires de l'épiderme de l'hôte. *B. cinerea* est capable de produire des structures ressemblant aux appressoriums afin de pénétrer les tissus (Figure 6C, D). Ces structures sont proches des véritables appressoriums comme ceux bien décrit de *M. oryzae* qui utilisent la pression produite par la turgescence des cellules pour percer les barrières (cuticule et paroi) de la plante (Dean *et al.*, 2012). L'infection de l'hôte peut se faire après colonisation mycélienne de la surface de l'hôte, c'est ce qu'on appelle les coussins d'infections qui sont un lieu de production intensive d'enzymes de dégradations et d'effecteurs du champignon (Figure 6E, Choquer *et al.*, 2021). Lorsque l'infection est bien établie et les symptômes observés, le champignon va de nouveau produire des macroconidies pour coloniser de nouvelles plantes (Figure 6F, 6G).



**Figure 6: Cycle de vie asexué de *Botrytis cinerea*.** Représentation schématique modifiée d'après la plateforme ephytia de l'INRAE (<http://ephytia.inra.fr/fr/Home/index>). B, conidiophore (cp) de *B. cinerea* portant des conidies (c) coloré au bleu de trypan. C, pénétration des hyphes infectieux (ih) à partir du tube germinatif (gt) de conidies germées de *B. cinerea* observée au microscope. D, formation d'appressorium-like (a) lors de la pénétration du champignon observée au microscope électronique à balayage. E, formation des coussins d'infections (ic) à partir d'hyphes externes (eh) lors de l'infection. Les photos C, D et E sont issues de Choquer *et al* (2007), la photo E de Petrasch et al (2019) et les autres de ephytia.inra.fr.

## 2. Cycle de reproduction sexuée

Le cycle sexué de ce champignon est effectué par sa forme dite téléomorphe appelée *Botryotinia Fuckeliana* (De Bary) Whetzel en opposition à la forme anamorphe appelée *Botrytis cinerea* (Pers.). En tant que champignon hétérothallique, deux souches de types sexuels opposés (MAT1-1 et MAT1-2) doivent se croiser pour réaliser la reproduction sexuée. Ce cycle a rarement été observé dans la nature mais a été décrit en laboratoire (Groves and Drayton, 1939). Cependant, le fort taux de recombinaison observé dans des populations naturelles du champignon isolé de six régions en France indique un brassage génétique régulier dû à une reproduction sexuée dans la nature (Fournier & Giraud, 2008). Le cycle sexué de *B. cinerea* repose sur la formation de microconidies (spermaties) produites en même temps que les macroconidies mais sur des structures différentes peu différenciées appelées les microconidiophores. Les spermaties servent à la fécondation des sclérotés ayant donc à la fois un rôle d'organe femelle (ovogonies) et un rôle de conservation de la souche. La fécondation entraîne la formation d'apothécies portant des asques (Figure 7A). Chaque asque contient généralement 8 ascospores unicellulaires donnant naissance à de nouvelles souches issues de la reproduction sexuée (Figure 7B).



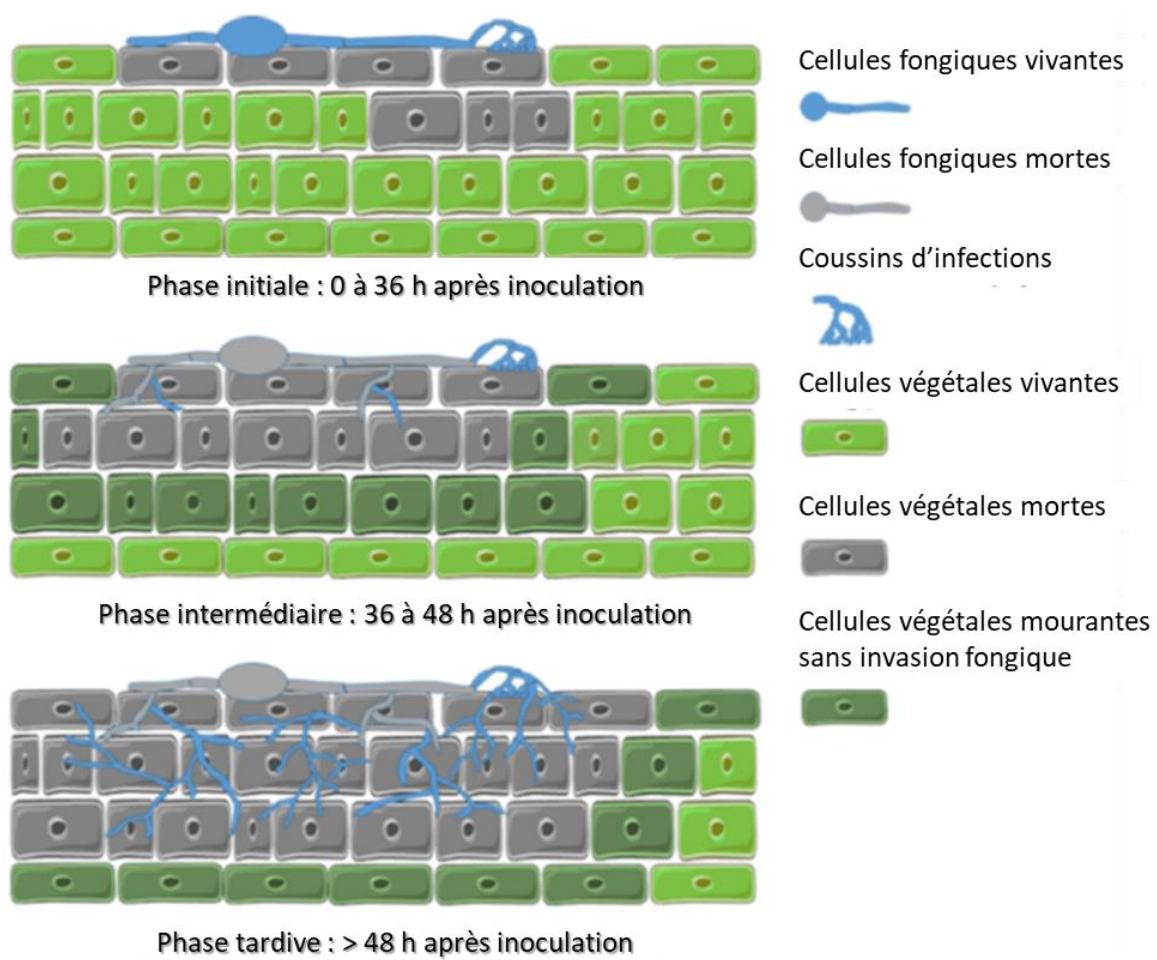
**Figure 7: Structures du cycle de vie sexuée de *B. cinerea*.** A, Apothécies se développant sur des sclérotés fécondés. Photo issue de Williamson et al (2007). B, Photo d'asques contenant chacun huit ascospores issues de la reproduction sexuée. Photo produite par Marie-Christine Soulié.

### B. Les différentes phases du processus infectieux

Le processus infectieux de *B. cinerea* comporte 3 phases (Figure 8; Shlezinger *et al.*, 2011; Bi *et al.*, 2022). La première comprend l'adhésion et la germination de la spore ainsi que la pénétration des tissus. Lors de cette phase le champignon, encore à la surface de l'hôte, produit des facteurs de virulence (voir section « Les facteurs de virulence ») qui vont permettre non seulement d'induire une nécrose locale des tissus végétaux mais aussi de se protéger des défenses de la plante avec



lesquelles il se retrouve en contact (voir section « Les mécanismes de défense des plantes contre *B. cinerea* »). Il existe un débat dans la communauté scientifique sur cette phase chez *B. cinerea* et plus largement chez les champignons nécrotrophes pour savoir si le champignon pénètre les tissus vivants, se développe dans la zone intercellulaire et possède donc une phase initiale biotrophe ou si celui-ci induit directement la mort cellulaire des cellules de l'hôte par la production d'effecteurs et d'enzymes avant même d'envahir les tissus (Bi *et al.*, 2022). Néanmoins, il a été suggéré que *B. cinerea* possède bien une phase de développement inter-cellulaire, sans parler de phase biotrophe, mais plutôt de phase initiale non-destructive (Veloso & van Kan, 2018). La deuxième phase a lieu lorsque le champignon a réussi à pénétrer les tissus et à produire une zone de nécrose. Il va alors pouvoir commencer à se développer à partir du mycélium encore vivant à l'intérieur de cette zone protectrice riche en nutriments où il n'est plus en contact direct avec les défenses de la plante. Cette phase correspond à l'initiation des symptômes de macération et à la progression des lésions autour des zones de lésion initiales. Enfin la dernière phase correspond à la progression rapide des lésions ayant atteint sa vitesse maximale de progression avec l'apparition de larges plages de macération.



**Figure 8:** Les trois phases du processus infectieux de *B. cinerea*. D'après Bi et al (2022).

## C. Les facteurs de virulence

Grâce au séquençage du génome de plusieurs souches sauvages de *B. cinerea*, dont les souches B05.10 et T4, un grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans la pathogénicité ont pu être identifiés (Amselem *et al.*, 2011). Les approches génétiques ont permis de valider l'importance d'un nombre relativement faible de ces gènes par rapport à la grande quantité de facteurs identifiés dans son génome. D'une part la production de mutant chez cet organisme multinucléé est difficile, bien que la récente application de la technique CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats-caspase 9*) ait grandement facilité ce type d'approches (Leisen *et al.*, 2020). D'autre part, les facteurs de virulence de ce champignon faisant souvent partie de familles multigéniques, des phénomènes de redondance fonctionnelle ou de compensation limiterait l'efficacité des approches génétiques. De plus, plusieurs travaux étudiant la grande diversité génétique de ce champignon suggèrent qu'il serait nécessaire d'utiliser un panel de souche, une diversité de plantes hôtes et différentes conditions environnementales afin de pouvoir réellement affirmer l'importance d'un gène dans la pathogénicité, ce qui est rarement le cas (Atwell *et al.*, 2015; Caseys *et al.*, 2021; Corwin *et al.*, 2016; Soltis *et al.*, 2019). Nous décrirons ici les principaux mécanismes décrits de la pathogénicité de *B. cinerea* avec une attention particulière pour les enzymes de dégradation de la paroi et pour les protéases, classes de molécules auxquels appartiennent des gènes étudiés dans mes travaux de thèse (voir chapitre II et III).

### 1. Les enzymes de dégradation de la paroi végétale

Les enzymes de dégradation de la paroi, *cell wall degrading enzymes* (CWDEs) sont les enzymes les plus abondantes du sécrétome de *B. cinerea* lors de l'infection (Espino *et al.*, 2010). Les prédictions à partir du génome montrent que *B. cinerea* sécrèterait 275 *carbohydrates-active enzymes* (CAZymes), enzymes impliquées dans la dégradation ou la synthèse des polysaccharides. On estime qu'une grande partie de ces CAZymes servirait de CWDEs lors de l'infection (Bi *et al.*, 2022). Blanco-Ulate *et al* (2014) ont montré que parmi ces 275 enzymes, 229 sont exprimés lors de l'infection de la tomate, du raisin et de la laitue dont 28 enzymes de dégradation de la pectine, 21 enzymes de dégradation de l'hémicellulose, 18 enzymes ciblant les ramifications du squelette de pectine et d'hémicellulose et 16 enzymes ciblant la cellulose. Les auteurs ont également montré que certaines CAZymes prédites ne s'expriment que chez certains hôtes, ayant une composition de paroi spécifique. Ces enzymes favorisent la pénétration de l'agent pathogène et libèrent des glucides nécessaires à son développement. Néanmoins, elles sont pour la plupart codées par des familles multigéniques ce qui rend leur étude difficile. De ce fait, l'inactivation d'un ou deux gènes a souvent

peu d'effet comme cela a été observé pour la cutinase BcCUTA impliquée dans la dégradation des lipides de la cuticule (Van Kan *et al.*, 1997). En revanche un rôle important a pu être démontré pour les PGs. BcPG1 et BcPG2 sont notamment essentielles à la pathogénicité sur plusieurs hôtes (Ten Have *et al.*, 1998; Kars, Krooshof, *et al.*, 2005). Ces auteurs ont également montré que ces enzymes ainsi que les 4 autres homologues sont capables d'induire la nécrose des tissus lorsqu'elles sont injectées dans la plante. De plus, les gènes codant ces enzymes sont différentiellement exprimés non seulement en fonction de l'hôte étudié mais également en fonction du tissu et de la phase de l'infection, suggérant un rôle précis pour chacune d'entre-elles (Ten Have *et al.*, 2001). Concernant les PME, il a d'abord été montré que la délétion de *BcPME1* dans la souche sauvage Bd90 entraîne une réduction de la virulence alors que cette même délétion de *BcPME1* et/ou *BcPME2* n'a aucun effet sur la virulence de la souche B05.10 (Kars, McCalman, *et al.*, 2005; Valette-Collet *et al.*, 2003). Ces facteurs de virulence peuvent donc non seulement avoir des effets variés d'un hôte à l'autre mais également d'une souche de champignon à une autre. En effet, il existe un panel de souches sauvages d'agressivités différentes exprimant plus ou moins certains facteurs de virulence (Soulie *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2019). Plus récemment et comme il sera discuté dans le chapitre II, BcPME1 et BcPME2 ont été impliquées, chez la souche B05.10, dans la régulation des défenses de l'hôte lors de l'infection d'*A. thaliana*. En effet, leur capacité à influencer la dégradation de la paroi et à libérer des OGs éliciteurs s'est traduit au niveau phénotypique par une virulence accrue du double mutant (Voxeur *et al.*, 2019). Afin de dégrader la cellulose et l'hémicellulose, autres composants importants des parois, le champignon produit également des  $\beta$ -glucosidases, des cellobiohydrolases, des endoglucanases et des xylanases. Certaines d'entre elles sont capables d'induire une réaction de la plante de façon indépendante de leur activité mais peu ont été identifiées/montrées comme étant essentielles à la virulence (Bi *et al.*, 2021; Frías *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2017). Parmi celles ayant un rôle important dans la pathogénicité nous pouvons citer BcARA1, enzyme impliquée dans la dégradation de l'arabinane qui est un polymère d'arabinose présent dans la paroi et dont un mutant de délétion est moins virulent sur *A. thaliana* mais pas sur *N. benthamiana* (Nafisi *et al.*, 2014).

## 2. La production et la détoxication des espèces réactives de l'oxygène

Chez *Botrytis cinerea* et beaucoup d'autres champignon phytopathogènes les ROS ont un rôle important dans le développement et la différenciation. Par exemple, les complexes NADPH oxydase (NOXA et NOXB) impliqués dans la production des ROS sont nécessaires pour la formation des sclérotés (Heller & Tudzynski, 2011). On sait également que *B. cinerea* produit des ROS lors de l'infection afin de stimuler le *burst oxydatif* de la plante et la HR qui permettent une

meilleure colonisation du champignon (Choquer *et al.*, 2007; Govrin & Levine, 2000). Un mutant de délétion du gène codant une superoxyde dismutase, BcSOD1, impliquée dans la transformation du  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  a une virulence réduite sur la tomate (López-Cruz *et al.*, 2017). Cette résistance de la tomate s'explique par une plus forte production de callose et une induction de la signalisation de l'OPDA, montrant ainsi que le contrôle du type de ROS produit à l'interface entre la plante et le champignon a un impact important. Les scientifiques se sont aussi posé la question concernant l'impact sur le champignon de ces ROS produits par le champignon et par la plante lors du *burst oxydatif*. Il a été montré que la catalase BcCAT2, importante dans la détoxification de l' $H_2O_2$ , n'a pas de rôle essentiel dans la pathogénicité de *B. cinerea*. Par contre Schouten *et al* (2002) suggérèrent l'existence d'une compensation de la perte de fonction par l'induction d'autres systèmes antioxydants. Temme & Tudzynski (2009) n'ont trouvé aucune réduction de pathogénicité chez un mutant de délétion d'un facteur de transcription important dans la réponse au stress oxydant, ils en ont conclu que le champignon ne souffre pas des ROS produits lors de l'infection. En revanche il a été montré que le contrôle du statut redox par le système des thioredoxines et à moindre mesure du glutathion est important à la fois pour la virulence du champignon mais aussi pour son développement (Viefhues *et al.*, 2014).

### 3. La production de métabolites

Une des stratégies de *B. cinerea* est d'acidifier le milieu par la production d'acide citrique, malique, succinique et oxalique afin d'optimiser l'activité de certaines enzymes et affecter les réponses de la plante (Billon-Grand *et al*, 2012). Botrytis produit également des métabolites spécialisés dont deux toxines, le sesquiterpène botrydial et le polycétides acide botcinique. Ces deux toxines sont décrites comme importantes à la pathogénie et leurs clusters de biosynthèse ont été identifiés (Dalmais *et al*, 2011). Néanmoins ces toxines ont des spécificités d'hôtes puisque le mutant de délétion de *BcBOT2* codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse du botrydial est capable d'infecter des tissus foliaires de haricot avec la même intensité que la souche sauvage alors qu'il est non pathogène sur *A. thaliana* (Dalmais *et al.*, 2011; Soulie *et al.*, 2020). Dalmais *et al* (2011) ont néanmoins trouvé une réduction des symptômes importante chez le double mutant *ΔBcbot2ΔBcboa6* ne produisant plus ni botrydial ni acide botcinique sur le haricot révélant ainsi un rôle redondant de ces toxines dans la pathogénicité de *B. cinerea*. Enfin, *B. cinerea* produit un exopolysaccharide (EPS) de  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucanes impliqué dans la pathogénicité sur tomate par son activité élicitrice de la voie du SA (El-Oirdi *et al.*, 2011). En effet, ces auteurs ont montré que l'élicitation de la voie du SA par l'EPS entraîne une répression de la voie du JA dépendante de NPR1 et une plus forte sensibilité de la plante à l'infection.

#### 4. Les petites protéines induisant la mort cellulaire

De petites protéines secrétées appelées *cell death inducing proteins* (CDIPs) regroupant les *necrosis and ethylene inducing proteins* (NEPs) mais aussi les *NEP-like proteins* (NLPs) ont été mises en évidence chez *B. cinerea*. Ces protéines secrétées possèdent généralement un motif protéique conservé reconnu par des récepteurs de la plante induisant diverses réactions conduisant à la nécrose initiale des tissus (Denton-Giles *et al.*, 2020). Parmi elles nous pouvons citer BcNEP1 et BcNEP2, BcSPL1 une cerato-platanin, BcIEB1 et BcHIP1 pour *hypersensitive response inducing protein 1* (Frías *et al.*, 2011, 2016; Jeblick *et al.*, 2023; Schouten *et al.*, 2008). Il a été également rapporté une activité nécrosante pour un grand nombre de CWDEs dont notamment les PGs mentionnées ci-dessus et des enzymes de dégradation de la cellulose et l'hémicellulose comme la xyloglucanase BcXYG1 et la glucanase BcGs1 (Zhang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017). Pour les xylanase BcXYN11a et la transglycosidase BcCRH1, des séquences peptidiques d'environ 20 acides aminés ont été incriminées dans l'activité nécrosante de ces protéines, activité indépendante de leurs activités enzymatiques (Bi *et al.*, 2021; Frías *et al.*, 2019). Récemment Leisen *et al* (2022) ont montré qu'il existe une grande redondance fonctionnelle dans l'activité phytotoxique de ces CDIPs et des toxines produites par *B. cinerea*. En effet, en fonction de l'hôte il leur a été nécessaire de supprimer jusqu'à onze gènes du champignon afin d'observer un effet sur la pathogénicité.

#### 5. Les petits ARNs

Récemment des études ont montré que *Botrytis cinerea* produit lors de l'infection un grand nombre de siRNAs (*small interfering RNAs*) dont certains inhiberaient les défenses de la plante de par la grande conservation chez les organismes du système de l'ARN interférence. Ces siRNAs sont produits par les protéines BcDCL1 et BcDCL2 (*Dicer-like 1* et *2*) puis pris en charge par les protéines Argonaute (AGOs) de la plante afin de se fixer et d'inhiber la traduction des ARNm cibles. Initialement Weiberg *et al* (2013) ont démontré que la production de ces siRNA est essentielle à la pathogénicité puisqu'un double mutant  $\Delta Bcdcl1\Delta Bcdcl2$  ne produisant plus aucun de ces petits ARNs présentait un fort phénotype pléiotropique avec notamment une réduction de virulence. Il a ensuite été montré chez *A. thaliana* que le petit ARN produit par *B. cinerea* Bc-siR37 possède 15 cibles identifiées dont des facteurs de transcription WRKYs impliqués dans la défense, des enzymes de modifications de la paroi et des RLKs impliquées dans la perception de l'agent pathogène (Ming Wang *et al.*, 2017). Enfin Porquier *et al* (2021) ont postulé qu'un grand nombre de petits ARNs produits par le champignon lors de l'infection sont produits par les rétro-transposons de deux familles appelés BcGypsy et BcCopia ce qui expliquerait la plus grande agressivité des souches de

*B. cinerea* les possédant comme B05.10. Néanmoins, plus récemment Qin *et al* (2022) ont montré que l'effet des petits ARNs produits par *B. cinerea* est moins important que ce qui avait été montré précédemment puisque le double mutant  $\Delta Bcdcl1\Delta Bcdcl2$ , nouvellement obtenu avec la technique CRISPR-Cas9, est toujours aussi virulent bien qu'il ne produise plus de siRNAs. En revanche les auteurs ont pu mettre en évidence un grand nombre de gènes cibles de la plante et du champignon régulés par les petits ARNs produits lors de l'interaction avec la tomate, montrant bien que l'ARN interférence inter-espèces joue un rôle lors de l'interaction.

## 6. Les protéases

Bien qu'elles aient un rôle important dans la défense (voir section « Les protéine de défense des plantes ») les protéases des agents pathogènes jouent aussi un rôle dans la virulence. Trois grands rôles leurs ont été attribués dans la littérature : éviter la détection de l'agent pathogène, entraîner des dommages à l'hôte et enfin se protéger des dommages entraînés par l'hôte (Hou *et al.*, 2018). D'après la base de données MEROPS répertoriant de nombreuses informations sur les protéases et leurs substrats, *B. cinerea* possède 172 protéases (Rawlings *et al.*, 2018). Celles-ci sont réparties dans les classes suivantes : protéases aspartiques, protéases à sérine, protéases à cystéine, metalloprotéases, *mixed* et protéases glutamiques. Ci-dessous sont décrites ces différentes protéases exceptées les *mixed*. De plus les protéases glutamiques seront particulièrement détaillées car celles-ci feront l'objet du chapitre III de ma thèse.

### a) Les protéases aspartiques

Des études précédemment menées sur les 13 protéases aspartiques sécrétées par *B. cinerea* ont montré qu'elles sont produites sous forme de propeptide s'auto-activant, qu'elles sont actives à pH acide et inhibées par la pepstatine (Have *et al.*, 2010). La protéase BcAP8 représente à elle seule 20% des protéines sécrétées par *B. cinerea* dans différentes conditions de culture et a été retrouvée dans son sécrétome dans différentes études de protéomique (Espino *et al.*, 2010; Fernández-Acero *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2009). En revanche aucun mutant simple ou double des protéases aspartiques 1 à 5 et 8 n'a montré de réduction de pathogénicité sur différents hôtes (Have *et al.*, 2010). Néanmoins, le rôle de BcAP8 dans la dégradation d'une chitinase de la vigne a été mis en évidence grâce à sa synthèse et sa purification en système hétérologue (Van Sluyter *et al.*, 2013). De plus, l'ajout à l'inoculum d'un inhibiteur spécifique de cette classe de protéase, la pepstatine, entraîne une forte réduction de la pathogénie du champignon sur différents hôtes (Movahedi & Heale, 1990). Une étude récente a fait la comparaison entre le sécrétome de la souche

sauvage du champignon et celui de quatre mutants non pathogènes issus d'une banque de mutants générées par mutagenèse aléatoire avec *Agrobacterium tumefaciens* (de Vallée *et al.*, 2019). Cette étude montre que BcAP8 et d'autres protéases aspartiques sont moins exprimées et moins sécrétées chez ces quatre mutants comparés à la souche sauvage, suggérant un rôle de ces protéases dans la virulence. L'étude de de Vallée *et al* (2020) révèle également l'implication potentielle des protéases à sérine, des protéases à cystéine, des métalloprotéases et des protéases glutamiques dans la virulence de *B. cinerea*.

#### b) Les protéases à sérine, à cystéine et les métalloprotéases

D'après la base de données MEROPS et les séquences protéiques disponibles, on trouve/il existe chez *B. cinerea* 23 protéases à sérine, une protéase à cystéine et 9 métalloprotéases susceptibles d'être sécrétées étant donné la présence de signal peptides. Les protéases de deux familles de protéases à sérine, les subtilisines actives à pH neutre ou basique et les sedolisines actives à pH acide, ainsi qu'une famille de métalloprotéases, les deutérolisines, sont fréquemment retrouvées dans les études portant sur le sécrétome de *B. cinerea* (Espino *et al.*, 2010; González-Fernández *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2009). Liu *et al* (2020) se sont intéressés à la subtilisine BcSER2, ils ont montré que cette protéase est impliquée non seulement dans la croissance des hyphes, la sporulation et la formation des sclérotés mais aussi dans le développement des coussins d'infection. Ainsi un mutant de ce gène n'est capable d'infecter des feuilles d'*A. thaliana* et de tomate que lorsque celle-ci sont préalablement blessées. Une étude a montré que des métalloprotéases de *B. cinerea* sont surexprimées lorsque celui-ci est en contact avec des métaux lourds comme le cuivre et le zinc (Cherrad *et al.*, 2012). Ces auteurs suggèrent qu'elles pourraient être impliquées dans la résistance aux métaux lourds grâce à leur capacité de les piéger. Enfin, d'après nos connaissances aucune étude n'a révélé la sécrétion de protéases à cystéine chez *B. cinerea*. En revanche, il a été montré que la protéase à sérine intracellulaire BcATG4 joue un rôle dans l'autophagie et est nécessaire au développement et à la pathogénie du champignon (Liu *et al.*, 2019).

#### c) Les protéases glutamiques

Trois protéases glutamiques potentiellement sécrétées sont présentes dans le génome de *B. cinerea* dont une déjà décrite, *acidic protease 1* (BcACP1) (Rolland & Bruel, 2008). La classe des protéases glutamiques, aussi appelée Eqolisines en relation avec les deux résidus catalytiques identifiés que sont l'acide glutamique (E) et la glutamine (Q), est la dernière classe de protéases

identifiée en date. Ce sont des endopeptidases actives à pH acide et sécrétées sous forme de prepropeptide portant un peptide signal et un propeptide clivé par autocatalyse. Cette classe de protéase a été découverte et caractérisée tout d'abord avec la protéase Scytilidoglutamique (SGP) aussi appelée Scytilidopepsine B représentant la famille G1 des protéases glutamiques dans MEROPS. Celle-ci a été isolée du champignon *Scytilidium lignicolum*, un champignon saprophyte lignivore (Kataoka *et al.*, 2005; Murao *et al.*, 1972). L'observation d'une activité protéolytique résiduelle à pH acide du surnageant de culture de *S. lignicolum* après ajout d'une gamme d'inhibiteurs ciblant les différentes classes de protéases connues a permis l'identification de ces nouvelles protéases initialement appelée « pepstatin-insensitive carboxypeptidases ». Par la suite, d'autres protéases chez d'autres champignons filamenteux ont été assignées à cette famille. La protéase aspergilloglutamique (AGP) a été identifiée chez *Aspergillus niger*, les protéases EapA et EapB chez *Chrophonectria parasitica*, SsACP1 chez *S. sclerotiorum*, BcACP1 chez *Botrytis cinerea* et enfin TGP1 chez *Talaromyces emersonii* (Jara *et al.*, 1996; O'Donoghue *et al.*, 2008; Poussereau *et al.*, 2001; Rolland & Bruel, 2008; Takahashi, 2013). Aujourd'hui des protéases glutamiques ont été trouvées chez des bactéries (Jensen *et al.*, 2010), des archaées et des virus (Mann *et al.*, 2019). En revanche chez les eucaryotes ces protéases ne sont présentes que parmi les champignons filamenteux. Leur présence chez ces organismes serait issue d'un transfert latéral de gène d'une bactérie à un champignon (Stocchi *et al.*, 2018).

Afin d'étudier plus en détails ces protéases glutamiques *in vitro*, des inhibiteurs ont été produits. Tout d'abord le TA1 un « peptide-based transition state » (Ac-FRK(3S,4S)-Phenylstatinyl-LR-NH<sub>2</sub>) peu spécifique a permis d'étudier la structure 3D de la SGP liée à un substrat (Kataoka *et al.*, 2005). Il a ensuite été découvert une inhibition plus spécifique de l'AGP par un peptide de 20 acides aminés correspondant à la séquence entre le 12<sup>e</sup> et le 31<sup>e</sup> acide aminé de son propeptide (Kubota *et al.*, 2005). Cette inhibition a également été retrouvée sur la TGP1 avec son propre propeptide (O'Donoghue *et al.*, 2008). La spécificité de ces protéases a été étudiée en décrivant les zones de clivages de substrats *in vitro* comme l'insuline, l'angiotensine, la ribonucléase pancréatique bovine oxydée et des substrats fluorescents (bibliothèques de FRET-25Xaa). Ces travaux montrent que ces protéases ont une gamme de spécificité assez restreinte et originale avec pour préférence les petits acides aminés basiques, contrairement aux protéases aspartiques préférant les résidus hydrophobes (Oda *et al.*, 1974 ; Takahashi, 1997 ; Kataoka *et al.*, 2005 ; Sasaki *et al.*, 2005 ; Pillai *et al.*, 2007 ; Stocchi *et al.*, 2018).

Le rôle de seulement quelques protéases de cette famille a été étudié chez les champignons. Concernant le saprophyte *Talaromyces emersonii* la protéase glutamique TGP1 semble importante pour la croissance à partir de substrats protéiques (O'Donoghue *et al.*, 2008). Chez *A. fumigatus* la protéase glutamique GrpA et la protéase aspartique Pep ont un rôle redondant dans la croissance du



champignon sur milieu protéique à pH acide (Sriranganadane *et al.*, 2011). Ces études semblent évoquer un rôle aspécifique de ces protéases dans la dégradation des protéines pour permettre la libération de nutriments et la croissance. Néanmoins, la présence de ces protéases chez différents champignons phytopathogènes suggère un rôle dans l'interaction avec la plante. La première observation dans ce sens vient de l'équipe de Poussereau *et al* (2001) ayant montré que la protéase SsACP1 de *S. sclerotiorum* est produite lors de l'infection de cotylédons de tournesol. De plus, l'activité/l'expression de cette protéase est dépendante du pH du milieu et de la présence de nutriments. Chez *B. cinerea*, Rolland *et al* (2008, 2009) ont montré que la protéase BcACP1 est produite lors de l'infection et qu'elle est soumise à la même régulation que SsACP1. Il existe donc une forte répression catabolique par le carbone, l'azote et le soufre ainsi qu'une régulation pH-dépendante de la transcription, de la traduction et de la maturation de ces deux protéases glutamiques. Les auteurs suggèrent que ces régulations transcriptionnelles viendraient de la fixation de facteurs de transcription sur des motifs présents sur les promoteurs, ces facteurs de transcription étant AREA, CREA, CYS3, responsables respectivement de la répression catabolique par l'azote, le carbone et le soufre et PACC responsable de la régulation en fonction du pH. Chez *B. cinerea*, le mutant  $\Delta BcpacC$  présente *in vitro* un défaut d'acidification du milieu due à une moindre production d'acide oxalique et une réduction de pathogénicité sur différentes plantes hôtes (Rasclé *et al.*, 2018). De plus, lorsque le mutant  $\Delta BcpacC$  est placé en milieu acide il présente une induction de la sécrétion de BcACP1 moins importante que la souche sauvage. Kunz *et al* (2006) ont également observé *in vitro* chez un mutant aléatoire avirulent de *B. cinerea*, une absence de production d'acide oxalique quel que soit le pH et une absence de sécrétion de BcACP1 à pH acide. D'autre part, les études portant sur le sécrétome de *B. cinerea* rapportent très fréquemment la présence de BcACP1. Enfin, une étude récente s'intéressant à l'infection quiescente des baies de raisin immatures par *B. cinerea* montre que le passage à un stade plus agressif après maturation des fruits coïncide avec l'expression d'un set de gènes du champignon dont fait partie *BcACP1* (Haile *et al.*, 2020). Récemment, notre équipe a montré que le niveau d'expression de *BcACP1* est différent lors de l'infection d'*A. thaliana* en fonction de la nutrition azotée de la plante avec une plus forte expression du gène en condition de plus forte sensibilité de la plante (Soulie *et al.*, 2020). Cette étude a aussi révélé qu'un mutant de délétion  $\Delta Bcacp1$  est moins pathogène sur *A. thaliana* mais les mécanismes expliquant cette différence de pathogénicité restent inconnus. La recherche de ces mécanismes et le lien avec la nutrition azotée de l'hôte font l'objet du chapitre III de ma thèse.

## D. Mécanismes de défense des plantes contre *B. cinerea*

Les mécanismes de défense des plantes contre *B. cinerea* conduisent à un phénotype de résistance partielle appelé résistance quantitative car dépendante d'une multitude de gènes de défense ayant chacun un impact modéré, en opposition à la résistance qualitative dépendante de peu de gènes ayant un fort impact et souvent associés à l'ETI et la relation gène pour gène (Roux *et al.*, 2014). En effet, la défense contre cet agent pathogène repose principalement sur l'activation de la PTI, le renforcement de la paroi végétale et la production d'un grand nombre de protéines et de métabolites impliqués dans la défense (AbuQamar *et al.*, 2017).

### 1. Rôle des hormones et métabolites

Les phytohormones et leurs voies de signalisation sont fortement impliquées dans la défense contre *B. cinerea*. Le mutant d'*A. thaliana* *coi1*, affecté dans sa réponse au JA, a une sensibilité accrue vis-à-vis de *B. cinerea* alors que des lignées affectées dans la réponse au SA, comme le mutant *npr1* et la lignée exprimant le transgène *NahG* induisant une dégradation du SA, ne sont pas affectées, montrant ainsi que la défense contre cet agent pathogène est dépendante du JA et pas du SA (Thomma *et al.*, 1998). De plus, El-Oirdi *et al* (2011) ont observé une augmentation SA-dépendante de la sensibilité de la tomate à l'infection par *B. cinerea*, celle-ci étant lié à un antagonisme avec la voie du JA médié par NPR1 conduisant à une répression d'inhibiteurs de protéases (IPs) impliqués dans la défense. Ces auteurs montrent également que la production de la prosystémine par la plante et sa dégradation en systémine lors de l'infection par ce champignon est impliquée dans l'activation des défenses et la production de ces IPs. La même équipe a ensuite approfondi la compréhension du phénomène en démontrant que la répression des gènes d'IPs par le SA est dépendante du facteur de transcription TGA1 $\alpha$  et que ce phénomène est conservé lors de l'infection par un autre champignon nécrotrophe, *A. solani* (El Rahman *et al.*, 2012). Néanmoins un autre article a montré que la résistance locale d'*A. thaliana* contre *B. cinerea* est en partie dépendante du SA synthétisé spécifiquement par la voie de la PAL mais que ce mécanisme est indépendant de AtNPR1 (Ferrari *et al.*, 2003). De plus, les auteurs ont montré que la résistance contre *B. cinerea* est également dépendante de l'ET, puisque les mutants *ethylene insensitive 2* (*ein2*) et *ethylene response 1* (*etr1*) sont plus sensibles à l'infection. Lloyd *et al* (2011) ont pu connecter l'activation de la voie de l'ET lors de l'infection à la production de précurseurs de la lignine comme l'hydroxycinnamate et les monolignols, suggérant donc un rôle de renforcement des parois joué par l'ET lors de la défense contre *B. cinerea*. Enfin, Asselbergh & Höfte (2007) ont

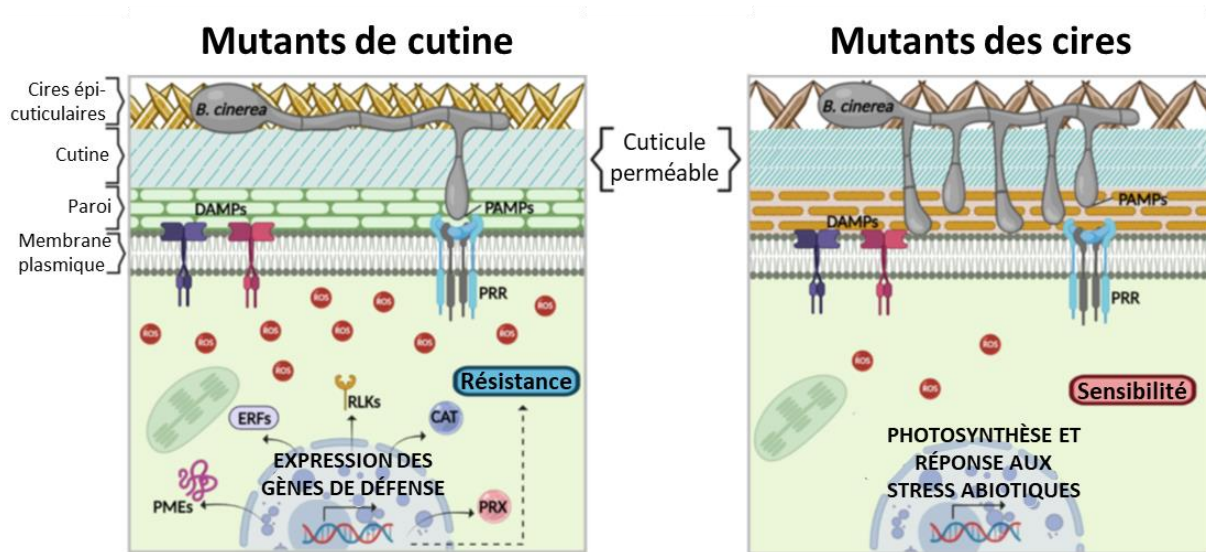
observé une accumulation de callose dans la paroi dépendante de l'ABA et augmentant la résistance de la tomate à *B. cinerea*.

Concernant la production de métabolites, chez *A. thaliana* la camalexine joue un rôle crucial dans la défense contre cet agent pathogène puisque les mutants de biosynthèse *pad3* et *pad2* sont plus sensibles à l'infection (Ferrari *et al.*, 2003). Il a également été montré qu'une plus forte accumulation de phénylalanine et de métabolites dérivés de la voie des phenylpropanoïdes permet une plus grande résistance des plantes suite à l'infection par *B. cinerea* (Oliva *et al.*, 2020). Parmi les phytoanticipines, l' $\alpha$ -tomatine a un rôle dans l'infection puisque certaines souches de *B. cinerea*, incapables d'effectuer sa détoxification, ont une agressivité très réduite sur la tomate (Quidde *et al.*, 1998). Concernant les sucres, la récupération intracellulaire de glucose à partir du compartiment apoplasmique est importante pour la résistance contre *B. cinerea* car elle contribue à supporter la demande énergétique liée à la défense et à réduire l'accès aux nutriments pour le champignon (Lemonnier *et al.*, 2014).

## 2. Une histoire de cuticule

Une équipe a mis en évidence que des défauts dans la structure de la cuticule peuvent entraîner une forte résistance de la plante à l'infection par *B. cinerea* (Chassot *et al.*, 2007). Ce mécanisme a été montré grâce à l'étude de deux lignées, la lignée CUTE exprimant un transgène codant une cutinase fongique ainsi que le mutant *bdg* (*bodyguard*), une  $\alpha/\beta$  hydrolase impliquée dans l'assemblage de la cutine. En effet, ces deux lignées présentent un défaut dans la structure et l'intégrité de leur cuticule ayant pour conséquence une résistance accrue à *B. cinerea* indépendante des voies de signalisation hormonales (Figure 9). Les mêmes auteurs ont testé des lignées surexprimant des gènes induits chez CUTE et *bdg* comme des PRXs de classe III, des *lipid transfert proteins* (LTPs) et des inhibiteurs de protéases. Toutes ces lignées se sont avérées plus résistantes à l'infection par *B. cinerea*. De plus, l'augmentation de la perméabilité de la cuticule et la résistance à *B. cinerea* de deux autres lignées d'*A. thaliana* affectées dans la structure de leurs pectines ont pour effet d'induire l'expression d'*AtPRX71*, une PRX de classe III (Lorrai *et al.*, 2021). Les auteurs suggèrent que l'altération des pectines chez ces lignées provoquerait la production de ROS par les PRXs apoplasmiques. En conséquence de cette production de ROS, la perturbation de la perméabilité de la cuticule induirait la résistance à *B. cinerea*. Enfin, cette induction de résistance n'est pas due à un défaut de perméabilité de la cuticule mais plutôt à un défaut dans la composition en cutine. En effet, des mutants des cires présentent la même augmentation de la perméabilité de la cuticule ainsi que la même augmentation de la production de ROS observée chez les mutants de

cutine, par contre ces mutants ne présentent pas de résistance envers *B. cinerea* (Figure 9, Aragón *et al.*, 2021).

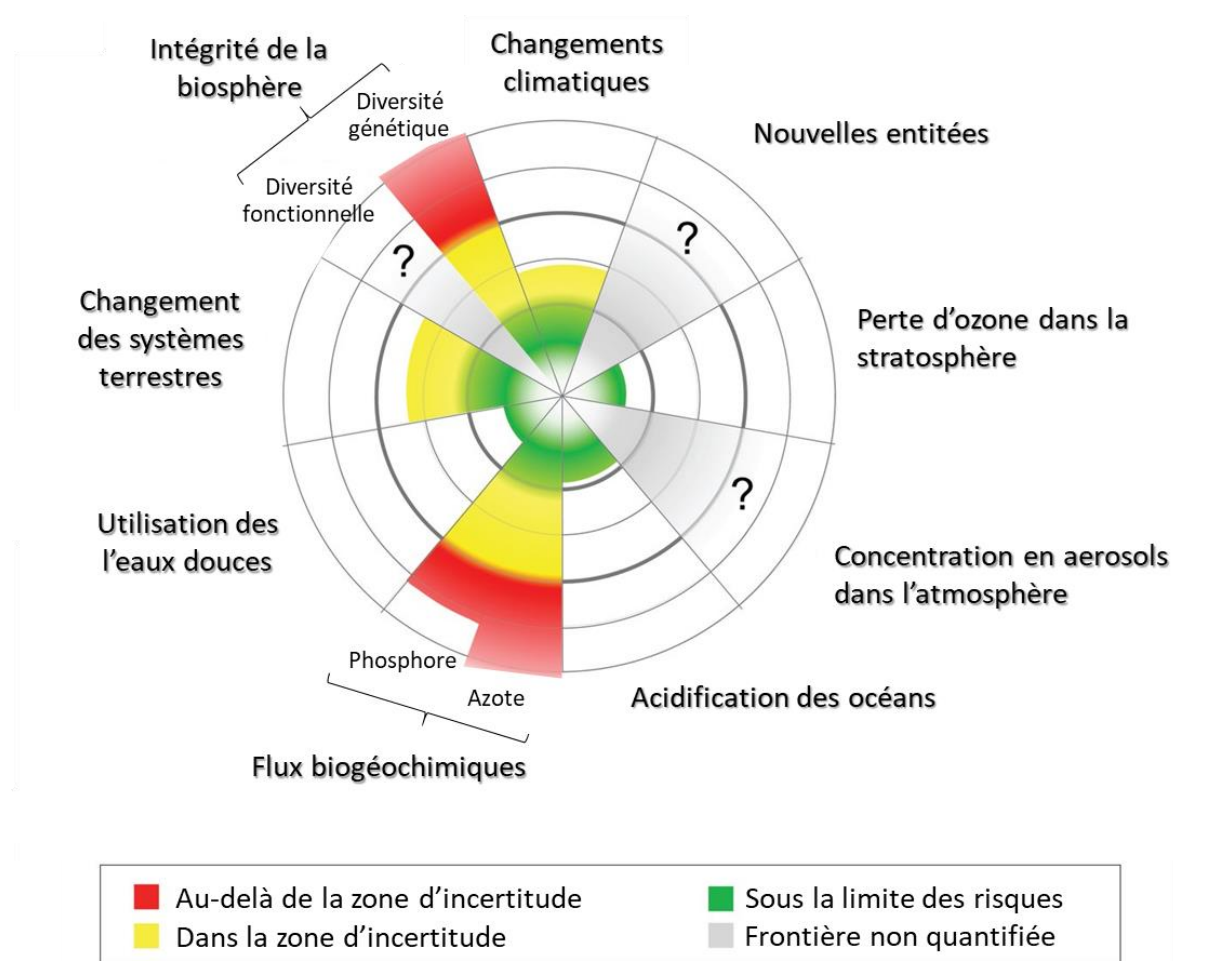


**Figure 9:** Cuticule et sensibilité à l’infection par *B. cinerea*. D’après Aragón *et al.* (2021). Un défaut dans la couche de cutine permet une induction plus efficace des défenses de la plante et une résistance au champignon.

### 3. Remodelage et dégradation de la pectine

La pectine de la paroi végétale est une cible prioritaire de *B. cinerea* lors de l’infection. De ce fait, le statut de méthylestérification de la pectine est un paramètre clé pour la défense de la plante. Une étude a montré que des mutants PMEIs chez *A. thaliana*, *pmei10*, *pmei11* et *pmei12* sont plus sensibles à l’infection, différence liée spécifiquement à l’augmentation de la déméthylation de la pectine chez ces mutants (Lionetti *et al.*, 2017). Néanmoins, Del Corpo *et al.* (2020) ont montré qu’une PME de plante, AtPME17, est capable de favoriser la résistance de la plante vis-à-vis du champignon grâce à son activité de déméthylation spécifique qui permet un renforcement localisé de la pectine. Dans une autre étude deux enzymes d’*A. thaliana* impliquée dans le remodelage de la pectine, *powdery mildew resistant 5* et *6* (AtPMR5 et 6), l’une étant une pectine acétyl-transférase et l’autre une pectate lyase, ont été identifiées comme importantes pour la résistance contre *B. cinerea* (Chiniquy *et al.*, 2019). La dégradation de la pectine permet également la production d’OGs responsables de l’induction des défenses contre *B. cinerea*. Benedetti *et al.* (2015) ont montré que la production constitutive d’OGs dans une lignée transgénique d’*A. thaliana* induit une résistance contre l’infection par *B. cinerea*. Ces OGs sont capables d’induire via la production de NO l’activation des trois voies hormonales (ET, SA, JA) et la synthèse de camalexine, validant une fois encore l’importance de ces processus dans la défense contre ce

champignon (Ferrari *et al.*, 2007; Rasul *et al.*, 2012). Enfin, l'oxydation des OGs par les OGOXs joue un rôle dans la défense contre *B. cinerea* car lignée surexprimant OGOX1 résiste mieux à l'infection (Benedetti *et al.*, 2018). Les auteurs suggèrent que les OGOXs participeraient à la défense contre *B. cinerea* en réduisant l'activité élicitrice des OGs afin de prévenir l'emballement du système de défense et la mort cellulaire mais aussi car les OGs oxydés, moins hydrolysables par les enzymes fongiques, sont moins assimilables pour la croissance du champignon.



**Figure 10:** État en 2015 des variables de contrôle de 7 des 9 frontières planétaires. D'après Steffen et al (2015).

## **4) L'impact de l'environnement sur les interactions plantes-agents pathogènes**

### **A. Changements climatiques et perturbations de l'environnement**

Nous vivons aujourd'hui dans l'ère de l'anthropocène, une époque géologique où l'être humain représente la principale force de changement sur notre planète. Nous avons ainsi entraîné une profonde perturbation de ce que l'on appelle les frontières planétaires qui définissent les conditions nécessaires à la vie sur Terre (Figure 10). Nos capacités de mesure des variables de ces frontières nous disent aujourd'hui que nous avons dépassé la zone de non risque pour quatre d'entre elles, le changement climatique, l'intégrité de la biosphère, les changements des systèmes terrestres et les flux biogéochimiques (Steffen *et al.*, 2015). Ces perturbations sur notre planète vont conduire dans les prochaines décennies à de profonds changements dans nos sociétés impliquant que nous repensions notre façon d'utiliser et de produire des ressources. Nous allons notamment être amenés à modifier notre système agricole afin qu'il réponde aux pressions exercées par l'environnement. Pour cela il est important de comprendre comment ces perturbations vont affecter la réponse des plantes notamment aux infections par les agents pathogènes. Nous décrirons ici les connaissances dans le domaine des stress combinés chez les plantes notamment lors d'un stress thermique et hydrique, d'une élévation du CO<sub>2</sub> atmosphérique et d'une limitation en nutriments avec un accent particulier sur la nutrition azotée des plantes.

### **B. La réalité des cultures : combinaison de stress biotiques et abiotiques**

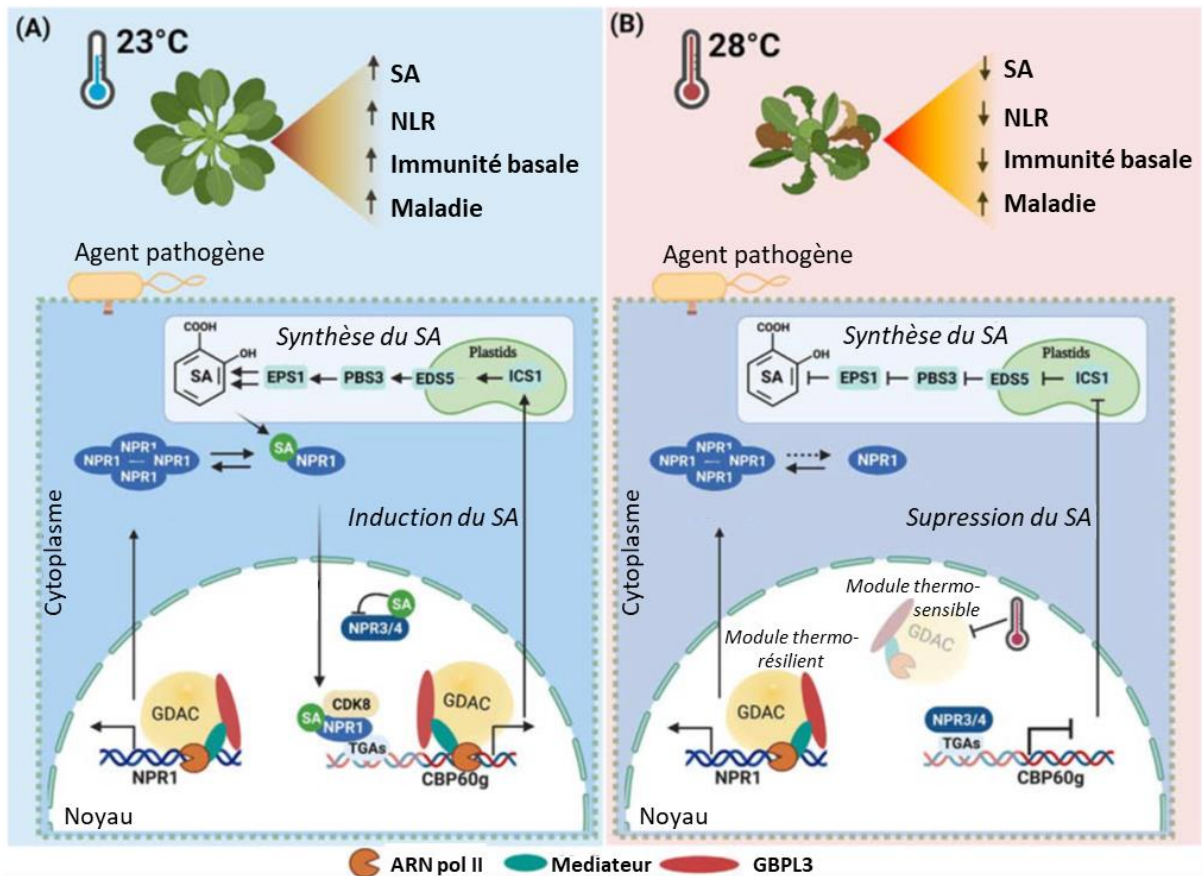
Pendant de nombreuses années la recherche en biologie végétale s'est intéressée de façon compartimentée aux différents stress que subissent les plantes dans leur environnement afin d'en décrire les réponses spécifiques. Néanmoins dans la nature les plantes sont soumises constamment à des combinaisons de stress biotiques et abiotiques. Les premiers travaux sur les multi-stress chez les plantes nous montrent que l'effet combiné de ces stress n'est pas une addition des réponses spécifiques chez la plante mais bien une recombinaison entraînant une nouvelle réponse plus ou moins bénéfique pour la survie de la plante (Fagard *et al.*, 2014; Rasmussen *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2014; Zarattini *et al.*, 2021). De ce fait et dans l'état actuel des perturbation climatiques, il est important d'avoir une compréhension des mécanismes mis en jeu pour permettre une meilleure protection des cultures.

## 1. Impact des stress thermiques et hydriques sur la défense

Le changement climatique affecte non seulement les températures moyennes auxquelles sont exposées les plantes mais conduit également à une augmentation de l'incidence des événements de fortes chaleurs mais également de froids intenses. La combinaison d'un stress thermique chez les plantes avec un stress biotique causé par un agent pathogène influence la résistance de la plante comme cela a été montré dans l'interaction entre *A. thaliana* et *P. syringae* (Huot *et al.*, 2017). L'exposition, même courte, de la plante à une température élevée (28°C) induit une réduction de l'accumulation de SA et compromet la résistance de la plante à la bactérie (Figure 11). Les auteurs de ce travail ont montré que ce mécanisme est conservé chez un grand nombre d'autres plantes comme la tomate, le riz et le tabac. Le mécanisme en cause implique la répression des facteurs de transcription *CBP60g* (*Calmodulin-binding Protein 60 g*) et *SARD1* (*systemic acquired resistance deficient 1*) en condition de forte température. Ces facteurs normalement induits par un module appelé GDAC (*guanylate-binding protein defence-activated condensate*), impliquant la protéine *GBPL3* (*GBP-like GTPase 3*), se retrouvent inhibés à la suite d'une exposition à une température élevée (Figure 11). L'implication de *CBP60g* a été confirmée car sa surexpression restaure la production de SA et annule le phénotype de sensibilité de la plante à la bactérie en condition de forte température (Kim *et al.*, 2022). D'un autre côté une exposition au froid induit la résistance de la plante à *P. syringae* grâce à une induction de la voie du SA et à son contrôle précis par l'ET entraînant une réaction immunitaire efficace (Li *et al.*, 2020). Du point de vue de l'agent pathogène, la température influence également l'expression des facteurs de virulence comme cela a été montré dans une étude transcriptomique de *M. oryzae* lors de l'infection du riz exposé à une température de 35°C (Onaga *et al.*, 2017). De ce fait, non seulement la défense de la plante mais également la virulence du bioagresseur peuvent varier pendant l'interaction du fait d'un stress abiotique appliqué sur la plante.

Concernant le stress hydrique, celui-ci induit également une modulation de la réponse des plantes aux agents pathogènes. La sécheresse peut être causée par une élévation ou un abaissement des températures ainsi que par une augmentation de la salinité. Achuo *et al* (2006) ont montré que la sécheresse induit une augmentation de la production d'ABA ainsi que la résistance à l'infection par *B. cinerea* et *Oidium neolycopersici* chez la tomate, plaçant ainsi l'ABA au centre de la réponse à cette combinaison de stress. De plus, une sécheresse modérée augmente la sensibilité d'*A. thaliana* à l'infection par *P. syringae*, ce mécanisme impliquant non seulement l'ABA mais également le SA. Cette étude a mis en évidence une répression de *SARD1* et *CBP60g* comme lors de conditions de fortes températures mais dans ce cas celle-ci est médiée par l'ABA (Choudhary & Senthil-Kumar, 2022). Les auteurs postulent donc que *SARD1* et *CBP60g* seraient des régulateurs clés de

la réponse générale aux stress combinés. L'exposition de la plante à la sécheresse influence également l'expression des gènes de virulence de l'agent pathogène. Bidzinski *et al* (2016) ont observé que la plus grande sensibilité du riz à *M. oryzae* induite par la sécheresse concordait avec une induction de l'expression de CAZymes et de protéases du champignon.



**Figure 11:** Représentation schématique de l'interconnexion entre l'activation de la voie du SA et la sensibilité aux agents pathogènes en condition de stress thermique. D'après Suraj et al (2023).

## 2. Élévation du carbone atmosphérique

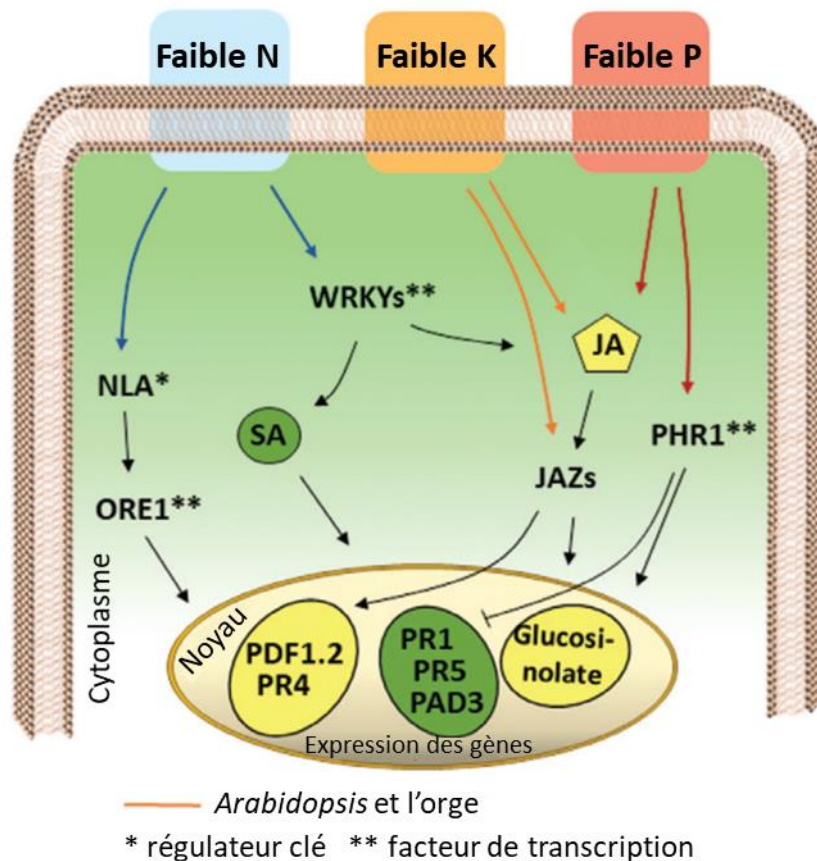
L'augmentation de nos émissions de gaz à effet de serre depuis la révolution industrielle, dont le carbone atmosphérique, a conduit aux perturbations climatiques mais a également un impact direct sur la défense des plantes et notamment l'activation des voies hormonales. Plusieurs études montrent qu'une élévation du CO<sub>2</sub> atmosphérique induit une plus grande accumulation de SA et seulement peu d'effets sur la quantité de JA (Bazinet *et al.*, 2022). Trębicki *et al* (2017) ont suivi sur plusieurs années l'incidence naturelle du virus de la jaunisse nanisante sur le maïs et ont observé son augmentation en condition de fort CO<sub>2</sub>. Il en est de même pour la tomate, plus sensible à



l'infection par *B. cinerea* en fort CO<sub>2</sub> se traduisant par une répression de la signalisation médiée par le JA et une induction de la voie du SA moins favorable à la défense contre ce champignon (Hu *et al.*, 2020). En revanche, en fort CO<sub>2</sub> la plus grande résistance de la tomate face à l'infection par le virus de la mosaïque du tabac et à l'infection par *P. syringae* contrairement à l'infection par *B. cinerea* peut s'expliquer par l'induction de la voie du SA et son efficacité contrastée contre ces différents bioagresseurs (Zhang *et al.*, 2015).

### 3. Nutrition

Notre capacité à produire des engrais pour la fertilisation des plantes risque d'être compromise étant donné la raréfaction des ressources fossiles intensément exploitées depuis plusieurs décennies. Cette pression dans la production des engrais nécessite que nous optimisions notre façon de les utiliser ce qui implique notamment d'avoir de bonnes connaissances de leur impact sur les maladies. En effet, on sait que les quantités d'azote, de phosphore et de potassium apportées à la plante peuvent faire varier sa résistance aux infections (Figure 12). Chez *A. thaliana*, la limitation en potassium induit une stimulation de la production de JA et de glucosinolates ce qui augmente la résistance des plantes aux insectes ravageurs (Troufflard *et al.*, 2010). Le même effet de la limitation en potassium sur la production de JA a été observé sur l'orge entraînant une meilleure résistance de la plante à *B. graminis* mais une plus forte sensibilité à un agent pathogène insensible au JA comme *Rhynchosporium commune*, champignon nécrotrophe important chez l'orge (Davis *et al.*, 2018). Enfin, Gupta *et al* (2022) ont montré récemment que l'application foliaire d'éléments nutritifs comme le potassium, le calcium, le sodium, le magnésium induit la résistance de la tomate à *B. cinerea* et *Xanthomonas euvesicatoria* en induisant l'expression de gènes de défense, la production de ROS et la synthèse d'ET. Concernant la nutrition en phosphate, Castrillo *et al* (2017) ont montré que sa limitation chez *A. thaliana* influence la régulation du système immunitaire par le microbiote. Ces auteurs ont identifié PHR1 comme régulateur clé de la réponse immunitaire lié à une limitation en phosphate par son rôle de répresseur des gènes de la voie du SA et d'inducteur de ceux de la voie du JA conduisant notamment à la synthèse de glucosinolates (Figure 12). L'effet de la nutrition azotée sera discuté spécifiquement ci-dessous car son impact sur l'infection par *B. cinerea* a été étudié dans mes travaux de thèse.



**Figure 12:** Représentation schématique de l'impact de la limitation en nutriments chez les plantes sur l'activation des voies hormonales et l'expression des défenses. D'après Zarratini et al (2021).

### C. La nutrition azotée

L'azote (N) est un élément chimique représentant à lui seul 78,06 % de la composition de notre atmosphère sous sa forme gazeuse, le diazote ( $N_2$ ). Il est en revanche seulement le 34<sup>ème</sup> élément de la croûte terrestre où il existe sous forme de sel de nitrate ( $NO_3^-$ ), comme le  $KNO_3$  et le  $NaNO_3$ . En tant que composant des protéines, il est essentiel au développement de tous les organismes vivants. Ceux-ci l'utilisent et le transforment sous différentes formes dont les nitrates, mais également les nitrites ( $NO_2^-$ ) et l'ammonium ( $NH_4^+$ ). En général, les organismes sont dépendants de l'azote présent dans leur environnement. Néanmoins, certaines bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique afin de l'utiliser pour elles-mêmes mais également pour leur hôte dans le cadre de relation symbiotique bactérie-plante avec la famille des Fabacées ou légumineuses.

## 1. Perturbations actuelles du cycle de l'azote

Le cycle de l'azote repose sur plusieurs organismes vivants capables de :

(1) fixer l'azote atmosphérique, comme les bactéries du sol ou les bactéries symbiotiques des Fabacées; (2) le transformer, comme les bactéries fixatrices réalisant l'ammonification et les bactéries nitrifiantes produisant les nitrates; (3) l'assimiler, comme le font les plantes, les champignons et autres organismes, ce qui permet son entrée dans la chaîne alimentaire; (4) le recycler, les décomposeurs permettent de le réinsuffler dans le cycle de transformation et d'assimilation, les bactéries dénitrifiantes peuvent également retransformer les nitrates en diazote.

Le cycle de l'azote fait partie des flux biogéochimiques que l'anthropocène a profondément perturbé et dont la frontière planétaire est franchie, nous laissant ainsi dans une zone de haut risque pour la vie sur Terre (Figure 10). En effet, cet élément étant limitant pour la croissance des plantes et donc la production alimentaire, les recherches pour l'extraire de l'atmosphère ont conduit à la découverte du procédé Haber-Bosch. Celui-ci permet de capter l'azote atmosphérique et de produire de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) avant de le transformer en ammonium et nitrate, ce procédé nécessitant une grande quantité d'énergie fossile. Cette découverte a révolutionné notre système agricole et a permis de supporter la croissance de nos sociétés mais est également en partie responsable des perturbations actuelles de notre environnement. De plus, aujourd'hui seulement 30 à 50 % de l'azote introduit dans notre système agronomique est utilisé, le reste étant relargué dans l'environnement (Erisman *et al.*, 2008). Ces pertes reflètent la faible NUE (*nitrogen use efficiency*) de notre système. Celles-ci entraînent des pollutions environnementales importantes dont les très connus phénomènes d'eutrophisation des milieux naturels participant à la crise actuelle de la biodiversité.

## 2. Assimilation, transport et remobilisation de l'azote chez les plantes

L'azote est importé par la plante au niveau des racines sous forme de nitrate ou d'ammonium. Il existe un système de perception de la disponibilité en azote dans le milieu extérieur dépendant de transporteurs et d'une voie de signalisation complexe régulant le métabolisme et l'expression de gènes (Xuan *et al.*, 2017). Concernant l'influx de nitrate au niveau des racines, les études de physiologie ont révélé qu'il existe au moins trois systèmes, deux HATS (*high affinity transport system*), dont l'un est constitutivement activé et l'autre inductible, responsables de l'import de nitrate présent en faible concentration dans le milieu extérieur et un LATS (*low affinity transport system*) avec lequel l'import se fait de façon linéaire en fonction de la concentration dans le milieu extérieur (Krapp *et al.*, 2014). Il existe plusieurs familles multigéniques de transporteurs

de nitrate dont celle des NRT1/NPFs (*nitrate transporter 1 / peptide transporter family*), des NRT2s pour (*nitrate transporter 2*), des CLCs (*chloride channel*) et enfin des SLAC/SLAHs (*slow anion channel- associated homologues*) (Krapp *et al.*, 2014). Parmi eux, le transporteur AtNPF6.3 chez *A. thaliana* a été incriminé dans la perception du nitrate et dans la régulation de l'apparition de racines latérales en condition de limitation (Ho *et al.*, 2009). Concernant l'ammonium il existe une grande famille de transporteurs, les AMT/MEPs (*ammonium transporter / methylammonium permeases*). On peut citer le rôle potentiel du transcepteur AtAMT1.1 chez *A. thaliana* (Liu & Von Wirén, 2017). Après son import par la racine, le nitrate est transformé en nitrite par la nitrate réductase cytoplasmique (cNR) puis en ammonium par la nitrate réductase chloroplastique. L'ammonium, lui, est directement importé dans le chloroplaste réduisant ainsi le coût énergétique pour la plante. L'ammonium est ensuite utilisé pour la production d'acides aminés via le cycle GS/GOGAT (*glutamate synthase/glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase*) (Mur *et al.*, 2017).

Ces mêmes transporteurs sont également impliqués dans la redistribution de l'azote des organes sources (racines) aux organes puits (feuilles, organes reproducteurs et graines). Dans ce cas, les sources d'azote sont chargées dans le xylème afin d'être redistribuées. Concernant les graines qui constituent l'organe source final, le transporteur NPF2.12 a notamment été incriminé. Celui-ci est localisé au niveau de la membrane plasmique et est exprimé dans les tissus vasculaires des siliques et dans le funicule afin d'assurer l'apport en nitrate aux graines en développement (Almagro *et al.*, 2008).

Enfin il existe un système de remobilisation de l'azote lors de la sénescence (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Les principales formes de l'azote transportées des feuilles sénescentes aux autres organes lors de la remobilisation sont le nitrate, l'ammonium et l'urée. Des transporteurs comme NRT1.7 et NRT2.5 sont impliqués dans cette remobilisation (Havé *et al.*, 2017). L'azote ainsi transporté proviendrait en grande partie des protéines du chloroplaste dont la RuBisCO préalablement dégradées par des protéases. Plusieurs études sur la sénescence ont montré une activation de la transcription de protéases de diverses familles (Havé *et al.*, 2017). La dégradation des acides nucléiques a également été reportée comme faisant partie intégrante de la remobilisation de l'azote lors de la sénescence. En effet, des produits de dégradation des purines comme l'allantoïne et des nucléases sont accumulés lors de la sénescence témoignant de la dégradation des acides aminés (Havé *et al.*, 2017).

### 3. Azote et défenses des plantes

Un lien entre la nutrition azotée et les interactions plantes-agents pathogènes a été observé depuis longtemps dans différentes études agronomiques avec l'observation de variations dans

l'incidence des maladies en fonction de la source d'azote et la dose de la fertilisation azotée (Dordas, 2009; Huber & Watson, 1974). Par exemple, lors de l'interaction entre *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 et la tomate, la nutrition en ammonium de la plante permet une meilleure résistance des plantes comparé au nitrate ce qui est également retrouvé dans l'interaction entre *A. thaliana* et *B. cinerea* (Fernández-Crespo *et al.*, 2015; Soulie *et al.*, 2020). De plus, une forte fertilisation en azote des rizières s'accompagne d'une augmentation de l'incidence de la pyriculariose causée par *M. oryzae* sur un grand nombre de cultivars de riz plus ou moins résistants à la maladie (Long *et al.*, 2000). On sait également qu'en fonction de l'hôte et de l'agent pathogène étudié l'interaction entre nutrition azotée et sévérité de la maladie peut être négative comme c'est le cas avec la pyriculariose du riz ou positive notamment pour la fusariose de la tomate causée par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Hoffland *et al.*, 2000). Il est fréquemment énoncé qu'une forte nutrition azotée augmente la sensibilité des plantes aux agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes alors qu'elle la diminue dans le cas des nécrotrophes. Néanmoins, il existe plusieurs contre-exemples. En effet, dans l'interaction entre le blé et l'hémibiotrophe *F. graminearum* la sensibilité des plantes diminue avec l'augmentation de la nutrition azotée (Yang *et al.*, 2010). Un autre contre-exemple est l'interaction entre le nécrotrophe *B. cinerea* et le fraisier ou *A. thaliana*, dans ce cas la sensibilité de la plante augmente avec l'augmentation de la nutrition azotée (Nicot *et al.*, 2013; Soulie *et al.*, 2020). De plus, pour un même agent pathogène le sens de l'interaction entre infection et nutrition azotée peut varier en fonction de l'hôte puisque lors de l'infection par *B. cinerea* la sensibilité de la tomate diminue avec l'augmentation de la nutrition azotée contrairement à *A. thaliana* (Lecompte *et al.*, 2010). Les auteurs ont également montré qu'au sein d'une population d'isolats du même champignon, la régulation de la maladie causée par la nutrition azotée de l'hôte peut être plus ou moins prononcée. La nutrition azotée de la plante semble donc jouer un rôle complexe lors des infections favorisant, en fonction du pathosystème et de ses spécificités, le développement ou le contrôle de la maladie.

Le lien entre nutrition azotée et défense peut notamment s'expliquer par l'interconnexion du métabolisme de l'azote avec la production de NO, l'activation des voies hormonales et la production de protéines et métabolites de défenses.

#### a) NO et défense

Deux voies de production du NO existent chez les plantes, d'une part la voie réductive par la NR, les nitrite reductases de la mitochondrie et de la membrane plasmique et la xanthine oxido-reductase et d'autre part la voie oxydative par les NOS-like (*NO synthase like*) et la voie du métabolisme des polyamines (Leitner *et al.*, 2009; Mur *et al.*, 2017). Le NO ainsi produit joue un

rôle important non seulement dans la signalisation des défenses mais également dans la fermeture des stomates, dans l'induction de la HR ainsi que dans l'activation et l'inhibition de protéines de défenses par S-nitrosylation (Bellin *et al.*, 2013). Le métabolisme de l'azote est fortement lié à la production de NO car toutes les voies de synthèse du NO dépendent des processus d'assimilation de l'azote. Il a notamment été montré que la disponibilité en nitrate et nitrite joue un rôle dans la production de NO dépendante de la cNR (Planchet *et al.*, 2005). En revanche il est intéressant de noter que la nutrition en ammonium réduit l'activité de la NR et la production de NO et que ce mécanisme contribue à l'inhibition de la HR et à l'augmentation de la sensibilité du tabac à *P. syringae* pv. *phaseolicola* en nutrition ammonium (Gupta *et al.*, 2013; Planchet *et al.*, 2005). Concernant les NOS-like, Asai & Yoshioka (2009) ont montré que leur activité est impliquée dans la défense contre *B. cinerea* par la production de NO. Le métabolisme des polyamines cité plus haut implique la production de NO lors de la formation des polyamines comme la putrescine produite à partir d'arginine grâce aux CuAOs (*copper amine oxidases*). L'arginine, issue du métabolisme de l'azote, permet donc la production de NO et de polyamine. De plus, les polyamines ont également un rôle dans la défense notamment par la production de ROS, la régulation de la mort cellulaire et le renforcement de la paroi cellulaire (Walters, 2003).

#### b) Azote, phytohormones et expression des gènes de défense

Même en dehors de toute interaction avec un agent pathogène, l'apport d'azote sous forme de nitrate ou d'ammonium produit un remodelage transcriptionnel chez la plante impliquant les voies hormonales et l'expression de gènes de défense. L'équipe de Patterson *et al* (2010) a notamment montré qu'il existe dans la réponse spécifique à l'ammonium une activation de gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques ainsi que des gènes de réponses au JA. D'autre part, ces auteurs ont observé une induction de l'expression de facteurs de transcription WRKYs en réponse à une limitation en nitrate (Figure 12). Comme vu dans la section « Voies hormonales de l'immunité » les facteurs de transcription WRKYs sont impliqués dans l'expression des gènes dépendants du SA et permettent également le contrôle de la balance SA/JA (Li *et al.*, 2004). Récemment, une interaction protéique entre AtNLA (*nitrogen limitation adaptation*) et AtORE1, un facteur de transcription de la famille des NACs, a été mise en évidence lors d'une limitation en azote et lors de la sénescence (Park *et al.*, 2018). AtORE1 étant impliqué dans la régulation de gènes dépendants du JA, son interaction avec NLA pourrait avoir un rôle dans la régulation des défenses via la disponibilité en azote. De surcroit, les NACs sont connus pour leur rôle dans la régulation des stress biotiques et abiotiques (Figure 12, Nuruzzaman *et al.*, 2013). Dans un autre contexte, Zarattini *et al* (2017) ont montré que l'élicitation des défenses par des molécules exogènes pouvait

être affectée par la nutrition de la plante. En effet, l'induction des gènes marqueurs des voies du SA et du JA (*AtPRI* et *AtPDF1.2*) par un acide biliaire est plus prononcée en condition de limitation en nitrate. De même, lors de l'interaction entre *A. thaliana* avec *Dickeya dadantii* ou *P. syringae* pv. *tomato*, la résistance induite par d'autres stimulateurs des défenses agissant sur les voies hormonales des défenses comme le Me-Ja et le Bion® est dépendante de la nutrition en nitrate (Verly *et al.*, 2020). Enfin, l'action de deux produits de biocontrôle sur la résistance de feuilles de framboisier à *B. cinerea* est dépendante de la nutrition azotée puisqu'à forte nutrition en azote les produits présentent un indice de protection bien plus faible qu'à faible nutrition azotée (Nicot *et al.*, 2013).

Des études faites chez *A. thaliana* ont rapporté l'implication de transporteurs de nitrate NRT2 dans la défense contre les bactéries pathogènes. En effet, la délétion de *AtNRT2.1* et *AtNRT2.2* impliqués dans l'influx de nitrate dans les racines induit l'expression des gènes de la voie du SA et permet une meilleure résistance à *P. syringae* (Camañes *et al.*, 2012b; Camañes *et al.*, 2012a). *AtNRT2.6* quant à lui est impliqué dans la résistance à l'infection par *E. amylovora* et a été mis en cause dans la production de ROS lors des stress abiotiques et biotiques (Dechorgnat *et al.*, 2012). Les quelques analyses transcriptomiques de plantes infectées réalisées en conditions de nutrition azotée contrastées ont également révélé un profond remaniement de l'expression des gènes et notamment de gènes marqueurs des voies hormonales. Par exemple dans le transcriptome de la tomate en réponse à l'infection par *B. cinerea*, des facteurs de transcription impliqués dans la voie du SA comme *SIWRKY15*, *SIWRKY70* et dans la voie de l'ET comme *SIERF1* ainsi que des gènes de défenses comme des chitinases et des enzymes d'oxydoréduction sont induits à fort nitrate soulignant ainsi leur rôle dans la résistance de la plante à l'infection dans ces conditions (Vega *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter que ces auteurs ont aussi identifié une modulation de l'expression de deux facteurs de transcription NAC et NAC-like de la même famille que *AtORE1* (Figure 12). Notre équipe a montré que lors de l'infection d'*A. thaliana* par *E. amylovora*, une forte nutrition en nitrate favorise la résistance à l'infection et modifie l'expression d'un large panel de gènes chez la plante également impliqués dans les voies hormonales comme les WRKYs mais également la production de ROS par la plante (Farjad *et al.*, 2018, 2021). Enfin, la même implication des voies hormonales a été montrée dans le transcriptome d'*A. thaliana* en réponse à *B. cinerea* en conditions de nutrition azotée contrastées (Soulie *et al.*, 2020). En effet, la plus grande sensibilité des plantes à l'infection par le champignon en condition de forte nutrition en nitrate a pu être corrélée à une diminution de l'expression de gènes marqueurs du JA et dans une moindre mesure du SA comparativement à une nutrition limitante en nitrate.

### c) Impact de l'azote sur le métabolisme

La disponibilité en azote a un profond retentissement sur le métabolisme primaire des plantes lui-même impactant la réponse des plantes aux agents pathogènes (voir section « Métabolisme et défense ») (Fagard *et al.*, 2014). Lemaître *et al.* (2008) ont montré que des métabolites primaires impliqués dans les défenses sont différenciellement accumulés en fonction de la nutrition en nitrate chez *A. thaliana*. Parmi ceux-ci des sucres comme le glucose, le fructose et leurs formes phosphatées sont accumulés à fort nitrate, en revanche certains acides aminés dont la proline et la glutamine ainsi que des polyamines comme la putrescine et la spermidine sont déplétés. Concernant les sucres, un apport en nitrate a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'augmentation de la sensibilité de la laitue à l'infection par *S. sclerotiorum*, et à moindre mesure par *B. cinerea*, et l'augmentation de la quantité de fructose ainsi qu'une diminution du sucrose dans la plante (Lecompte *et al.*, 2013). Les mêmes auteurs ont observé, toujours en fonction de la nutrition en nitrate, une corrélation positive entre la quantité relative de fructose, associée à l'expression d'un marqueur du JA, et la sensibilité de tiges de tomate à l'infection par *B. cinerea* (Lecompte *et al.*, 2017). Enfin, toujours dans les mêmes conditions de nutrition, cette équipe a révélé l'implication des sucrose synthases et des cwINV dans les différences d'accumulation de sucres observées et de sensibilité à la maladie (Lacrampe *et al.*, 2021). Ces auteurs suggèrent que le métabolisme des sucres ainsi perturbé par la nutrition azotée de la plante jouerait sur la défense par sa connexion avec le métabolisme des phénylpropanoïdes et par le renforcement de la paroi végétale.

Les acides aminés dont notamment la glutamine, issue du métabolisme de l'azote, et son enzyme de biosynthèse ont été plusieurs fois mis en cause dans les interactions plantes-agents pathogènes. Tavernier *et al.* (2007) ont notamment montré que la glutamine s'accumulait dans les feuilles de *Phaseolus vulgaris* infectées par une souche virulente de *Colletotrichum lindemuthianum* et pas avec un mutant non pathogène. Cette accumulation de glutamine s'accompagne d'une induction de l'expression de la *glutamine synthétase 1α* (GS1α) suivant le même profil d'expression que des gènes de défense connus. De plus, lors de l'infection du riz par *M. oryzae*, Huang *et al.* (2017) ont observé une induction de l'expression d'une glutamine synthétase du riz *OsGS1-2*, en condition de forte nutrition azotée et une plus grande sensibilité de la plante. Ces auteurs ont observé que chez une lignée du riz délétée au niveau de ce gène l'effet de la nutrition azotée sur la sensibilité de la plante est aboli rendant ainsi compte d'un lien fort entre glutamine, glutamine synthétase et régulation de la sensibilité des plantes par la nutrition azotée. De plus, un métabolome de feuilles d'*A. thaliana* infectée par *E. amylovora* en conditions contrastées en nitrate a permis de corréler la sensibilité des plantes à faible azote et l'accumulation d'acides aminés comme le GABA, la cystéine



et la lysine ainsi que des sucres comme le xylulose (Farjad *et al.*, 2021). Enfin, Gupta *et al* (2013) ont montré que la résistance du tabac à *P. syringae* pv. *tabaci* liée à la nutrition en nitrate s'accompagne d'une redirection des flux métaboliques vers l'accumulation de polyamines, impliqués dans les défenses contre la bactérie, alors qu'en ammonium on observe une accumulation de GABA.

Concernant le métabolisme spécialisé, l'allocation des ressources de la plante vers une production de métabolites spécialisés est fortement influencée par les contraintes environnementales exercées sur la plante dont notamment la quantité d'azote disponible. En effet, la limitation en azote chez la tomate augmente la production de composés phénoliques ainsi que l'activité des polyphénol oxydases (Stout *et al.*, 1998). En revanche Johnson *et al* (1987) ont observé une réduction de la quantité d'alcaloïdes produits par *Lupinus succulentus* en condition de limitation en azote. Concernant la source d'azote utilisée pour la fertilisation, Marino *et al* (2016) ont observé que la nutrition en ammonium induit une plus forte accumulation de glucosinolates chez *A. thaliana* ainsi qu'une plus forte activité des myrosinases impliquées dans leur transformation en ITCs. Récemment notre équipe a réalisé un métabolome apoplasmique de feuilles d'*A. thaliana* infectées par *E. amylovora* en conditions de nutrition azotée contrastées (Jeridi *et al.*, non publié). Une analyse par composante principale (ACP) a révélé une forte perturbation des quantités de métabolites spécialisés montrant ainsi que la combinaison entre infection et limitation en azote induit également une reprogrammation du métabolisme spécialisé.

#### 4. Nutrition azotée et expression de la virulence des agents pathogènes

L'apport en azote pour les agents pathogènes a un fort effet sur l'expression des facteurs de virulence *in vitro*. En effet, la virulence d'un grand nombre de champignons phytopathogène est dépendante des facteurs de transcription très conservés *areA/Nit2* impliqués dans la répression catabolique par l'azote (Bolton & Thomma, 2008). Chez *Aspergillus flavus*, l'utilisation de différentes sources d'azote mais également la production d'aflatoxine ainsi que la résistance au stress oxydatif sont régulées par *areA* (Fasoyin *et al.*, 2019). Ces observations impliquent qu'un plus grand nombre de facteurs de pathogénicité soient exprimés en condition de limitation en azote chez ces agents pathogènes. Cela a notamment été observé lors de la limitation en azote chez *M. oryzae* celui-ci produisant alors une plus grande diversité de molécules sécrétées dont certaines ayant potentiellement un rôle d'effecteur (Oh *et al.*, 2017). La source d'azote semble également influencer les déterminants de la pathogénicité des champignons *in vitro*. En effet, l'apport d'ammonium comme source d'azote chez différentes espèces dont *M. oryzae*, *F. graminearum* et *F.*

*oxysporum* réprime leur capacité à pénétrer des membranes de cellophanes mimant la pénétration de l'épiderme des plantes (López-Berges *et al.*, 2010). Enfin, chez la bactérie *D. dadantii*, la limitation en ammonium *in vitro* induit la répression des gènes de pectate lyases, facteurs de pathogénicité primordiaux pour cette bactérie nécrotrophe (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992).

Comme il a été discuté ci-dessus concernant d'autres facteurs abiotiques, la nutrition azotée de la plante a non seulement un effet sur les mécanismes de défense des plantes mais également sur la production des facteurs de virulence de l'agent pathogène lors de l'interaction. Lors de l'infection par *M. oryzae*, la *nitrogen induced susceptibility* (NIS) observée chez le riz s'explique en partie par une induction de l'expression de facteurs de virulence du champignon (Huang *et al.*, 2017). En effet, ces auteurs ont observé par transcriptomique l'induction, en condition de forte nutrition azotée de la plante, d'un grand nombre de petites protéines sécrétées dont trois facteurs de virulence connus, *pmk1*, *bas2* et *AvrPi9*. Dans une autre interaction, notre équipe a montré qu'en condition de limitation en azote de la plante, *E. amylovora* surexprime un grand nombre de gènes impliqués notamment dans le système de sécrétion de type 3 (T3SS) et la production d'exopolysaccharides constituant les facteurs de virulence majeurs de la bactéries (Farjad *et al.*, 2021). De plus, des résultats récents ont montré que l'expression de certains de ces gènes est induite par les métabolites accumulés dans l'apoplasme des feuilles de plantes limitées en azote expliquant ainsi le phénomène à l'origine des précédents résultats (Jeridi *et al.*, non publié). D'autres résultats de l'équipe ont montré que contrairement à *E. amylovora*, l'expression de gènes de virulence de *B. cinerea* à un temps précoce du processus infectieux est induite en condition de forte nutrition en nitrate de la plante (Soulie *et al.*, 2020). Cette étude révèle des différences d'expression de gènes non décrits dans la virulence de *B. cinerea* en fonction de la nutrition azotée de la plante comme des *glutathion S-transferases* (GSTs) impliquées dans la détoxification des ROS et autres composés toxiques ainsi que des gènes dont des mutants correspondants sont affectés dans leur pathogénicité avec *BcACPI*, *BcPG1* et *BcPME3*.

## Objectif de la these:

---

Le processus infectieux de *B. cinerea* repose sur la sécrétion d'un grand nombre de facteurs de virulence destructifs et non destructifs permettant la dégradation des tissus végétaux et la modulation des réponses de la plante. La phase initiale apoplasmique du processus infectieux est particulièrement intéressante car c'est là que se joue le sort de *B. cinerea* et de la plante. D'une part le champignon va devoir rapidement pénétrer les barrières et induire la mort cellulaire afin de pouvoir s'installer et se développer. D'autre part, la plante va aussi rapidement détecter sa présence afin de renforcer ses barrières et induire la sécrétion de protéines et métabolites pour se défendre. Peu décrite dans la littérature, cette phase apoplasmique lors de l'interaction semble fortement perturbée par la nutrition azotée de la plante comme l'indiquent les reprogrammations transcriptionnelles d'un grand nombre de gènes des deux organismes observés dans les derniers travaux de l'équipe. Dans ce contexte l'objectif de ma thèse a été de **décrire les changements dans le compartiment apoplasmique lors de la phase initiale de l'interaction et de comprendre le rôle de la nutrition azotée dans le contrôle de processus clés de cette étape de l'infection.**

Le premier chapitre sera essentiellement basé sur la description des **modifications au niveau protéique et métabolique dans le compartiment apoplasmique lors de l'infection d'*A. thaliana* par *B. cinerea* et leur contribution à la virulence et à la défense.**

Le second chapitre portera sur la dégradation de la paroi par *B. cinerea*. D'après ce qui a été présenté ci-dessus, cette capacité du champignon est importante pour la pathogénicité mais entraîne également la production d'OGs permettant à la plante de percevoir l'agression et d'induire les défenses. Puisque des pectinases du champignon présentaient une régulation transcriptionnelle dépendante de la nutrition azotée de la plante, je me suis intéressé à cet aspect de l'interaction et ai voulu répondre à la question : **la nutrition azotée de la plante a-t-elle un impact sur la dégradation de la paroi par le champignon et l'induction des défenses par les OGs relargués ?**

Le troisième chapitre de ma thèse abordera un autre aspect de la phase initiale du processus infectieux qui est la dégradation des protéines de la plante par le champignon. La nutrition azotée semble jouer sur cette protéolyse lors de l'infection puisque qu'elle régule l'expression du gène *BcACP1* codant pour une protéase fongique impliquée dans la pathogénicité. J'ai donc cherché à comprendre **quel est le rôle de BcACP1 dans le lien entre nutrition azotée et sévérité de la maladie.**



# Chapitre I: Modifications précoces des métabolites et protéines dans le compartiment apoplasmique d'*A. thaliana* en réponse à l'infection par le champignon à large spectre *B. cinerea*

---

Dans ce chapitre de ma thèse j'ai focalisé mon attention sur le compartiment apoplasmique des feuilles d'*A. thaliana* et ses modifications au niveau protéique et métabolique lors de la phase initiale de l'infection par *B. cinerea*. Il a précédemment été montré qu'un grand nombre de protéines et de métabolites s'accumulent ou disparaissent dans le fluide apoplasmique lors de l'infection par des agents pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes (Floerl *et al.*, 2012; Shenton *et al.*, 2012). Néanmoins à notre connaissance, la description de ce compartiment lors de l'infection par un champignon nécrotrophe n'a jamais été faite. Ainsi nous avons pu observer un grand remaniement des protéines et des métabolites dans ce compartiment seulement 6 heures après l'infection par *B. cinerea* lors de la phase précoce non-destructive. D'autre part, la description du fluide apoplasmique à la suite de l'infection par la souche sauvage du champignon nous a permis de rechercher chez la plante les cibles protéiques de la protéase BcACPI du champignon dans ce compartiment en utilisant une souche délétée au niveau du gène codant cette protéase (chapitre III).

Après adaptation au pathosystème *A. thaliana*-*B. cinerea* du protocole d'extraction du fluide apoplasmique (AWF pour *apoplast washing fluid*) mis au point par une ancienne doctorante de l'équipe, Roua Jeridi, j'ai obtenu des extraits conformes d'AWF conformes pour mes analyses métabolomiques et protéomiques.

J'ai décidé de présenter les résultats de ce chapitre sous format d'article bien que des expérimentations soient encore en cours afin de pouvoir appuyer les conclusions que vous pourrez lire, comme notamment celles concernant la caractérisation fonctionnelle de certains acteurs apoplasmiques identifiés.

# Early changes in *A. thaliana* metabolite and protein apoplastic contents following infection by the broad range fungus *B. cinerea*

Antoine Davière<sup>ab</sup>, Sylvie Jolivet<sup>a</sup>, Gilles Clement<sup>a</sup>, Stephanie Boutet<sup>a</sup>, Thierry Balliau<sup>c</sup>, Mélisande Blein-Nicolas<sup>c</sup>, Justine Rouffet<sup>d</sup>, Marie-Christine Soulié<sup>a,e,\*</sup> and Mathilde Fagard<sup>a,\*1</sup>

<sup>a</sup>Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France;

<sup>b</sup>Université Paris Saclay, ED 567 Sciences du végétal, 91405 Orsay, France

<sup>c</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE-Le Moulon, PAPPSO, 91190, Gif-Sur-Yvette, France

<sup>d</sup>Université Paris-Saclay, Institut National de la Recherche Agronomique (INRAE), AgroParisTech, UMR BIOGER, 91405, Orsay, France

<sup>e</sup>Sorbonne Universités, Pierre et Marie Curie Université Paris 06, UFR 927, 75005 Paris, France

**\* These authors contributed equally to this study**

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed, Email : [mathilde.fagard@inrae.fr](mailto:mathilde.fagard@inrae.fr).

Keyword : *Arabidopsis thaliana*, *Botrytis cinerea*, apoplast, proteomic, metabolomic, defense

## ABSTRACT

Plant responses to pathogen invasion leads to the production of defence proteins and defence related metabolites and hormones. Since the apoplastic space represents the first layer of defence, important changes are taking place in this compartment. These changes have not been described yet in the case of necrotrophic fungal pathogens that kill host cells rapidly and proliferate on dead tissues. However, the initial phase of the interaction is critical since these pathogens have to cope directly with plant defenses, in particular in the apoplastic space. In this study we describe for the first time the modifications that occur in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* in this initial phase of the *Botrytis cinerea* infectious process. Our results showed that important changes are triggered in the first hours of infection at the proteomic and metabolomic level. More than twenty proteins and metabolites identified were already described as important in defence or susceptibility of the plant against this fungus but the majority were still undescribed in this pathosystem or others. By confronting our results with previously obtained transcriptomic data we found that four major plant processes were prominently affected by the early interaction with *B. cinerea*: plant cell wall metabolism, carbohydrate metabolism, proteolysis and redox metabolism. Significant proteins related to these processes were for the large majority depleted in the infected apoplast while only few specific proteins were strongly accumulated. Some fungal proteins were also identified and more than half of them have undescribed role in pathogenicity. Taken together, this cartography of the early apoplastic molecular dialogue between the two organisms revealed the presence of new putative defence, susceptibility and virulence factors in this compartment.

## INTRODUCTION

As all organisms, plants are subjected during their life time to different stresses, of abiotic and biotic origins, imposed by the environment. To protect themselves from pathogen infection, plants possess different layers of defense, the first being preformed barriers. These non-specific barriers include physical ones such as the cuticle and the cell wall and also chemicals such as phytoanticipins that efficiently restrain some pathogens. However, plants can induce specific defences upon the recognition of the invading pathogen. This recognition is triggered by microbial elicitors such as pathogen- or damage- associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs). Their recognition by specific receptors activates PAMP-triggered immunity (PTI) which rapidly induces a strong reactive oxygen species (ROS) production, known as the oxidative burst, both for signalling and direct defence purposes. In reaction, plant hormones like jasmonate (JA), salicylate (SA) and ethylene (ET) are produced in order to stimulate defence signalling. Their specificity in orchestration of the defence reaction is highlighted by their pathogen-type dependent level of accumulation (Pieterse *et al.*, 2012). Altogether this leads to the induction of defence gene expression, the accumulation of defence proteins such as the pathogenesis-related proteins (PR protein) and the thickening of the cell wall by production of callose and remodelling of pectins and celluloses. Likewise, pathogen perception activates the production of defence-related primary and specialized metabolites to reinforce the defence reaction, kill the invader and/or protect the plant (Erb & Kliebenstein, 2020). Recently, He *et al* (2021) showed that in response to *Botrytis cinerea*, the plant produces apoplastic extracellular vesicles (EVs) that contains siRNAs, loaded by RNA-binding proteins. Cross-kingdom RNAi enable the silencing of pathogen virulence-related genes and illustrate the specific reaction of the host to perceived pathogens. Moreover, depending on the pathogen and the kinetics of infection, the plant response can be oriented towards specific reactions such as the hypersensitive response (HR), which is a type of programmed cell death (Locato & De Gara, 2018). For example, tomato resistance to the biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* is governed by the induction of HR through recognition of apoplastic fungal effectors by plant immune receptors (Mesarich *et al.*, 2018). Furthermore, these local responses to a pathogen are triggered together with a reaction called systemic acquire resistance (SAR) to prevent infection at distal sites (Pieterse *et al.*, 2012).

Although plants deploy a large array of defences, some pathogens are able to manipulate plant immunity to their advantage through the production and secretion of effectors in the apoplast and/or in the cell. The broad host-range fungal pathogen *B. cinerea*, an Ascomycete of the *Sclerotiniaceae* family, is known for its modulation of plant immunity towards the induction of plant-cell death which is favourable for its necrotrophic lifestyle (Govrin & Levine, 2000). Several such *B. cinerea* effectors, collectively termed cell death-inducing proteins (CDIPs), were previously characterized such as BcIEB1, BcSPL1, BcXIG1 and BcCRH1 (Bi *et al.*, 2021; Frías *et al.*, 2011, 2016; Zhu *et al.*, 2017). Nevertheless, Leisen *et al* (2022) revealed through the production of multiple knockout mutants, the high level of redundancy of these effectors. Indeed, depending on the host plant tested, the deletion of up to 12 CDIP-coding genes is necessary to significantly reduce pathogenicity. In addition, *B. cinerea* produces many other different types of pathogenicity factors such as proteases, ROS-detoxifying enzymes, toxins and cell wall degrading enzymes (CWDEs). For example, the abundant polygalacturonase BcPG1 highly contributes to pathogenicity (Ten Have *et al.*, 1998). Shlezinger *et al* (2011) postulated that during the first 24 h after inoculation, before any visible symptoms, a cell death inducing battle takes place between *B. cinerea* and its host. Furthermore, they showed that the fungal anti-apoptotic machinery is crucial to overcome this infection step. Recently, Qin *et al* (2022) revealed that in this initial rapid biotrophic phase of the infection, *B. cinerea* produce siRNA originating from transposons to silence tomato defence gene but this process alone is not essential to pathogenesis. These studies exemplified the growing interest that is raised on the initial phase of the infection process which is thought to be critical for the outcome of *B. cinerea* interaction with its hosts (Veloso & van Kan, 2018).



The apoplastic space, defined as the extracellular matrix including the cell wall and the intercellular space containing the apoplastic fluid, is the first plant compartment where the pathogen-host interaction occurs (Vincent *et al.*, 2020). The apoplastic fluid circulation enables the delivery of signalling molecules between plant cells and their joint response following pathogen perception. The apoplastic fluid contains proteins and metabolites that contribute to the early molecular dialogue between both organisms, conditioning the outcome of the interaction. Previous studies focusing on the apoplastic fluid in the context of plant-pathogen interactions revealed profound modifications in the protein and metabolite content of apoplastic fluids following infection (Floerl *et al.*, 2012; Llorens *et al.*, 2021; Rampitsch *et al.*, 2019; Shenton *et al.*, 2012). These studies mainly concerned biotrophic or hemi-biotrophic fungi and apoplastic-dividing bacteria since their lifestyle involves a long host-pathogen molecular dialogue in the apoplast. However, to our knowledge, no study has analyzed the impact of a necrotrophic fungus in the first hours of infection, before symptoms arise.

In this study we provided the first multi-omic description of the total apoplastic fluid content just 6 h after the onset of *Arabidopsis thaliana* interaction with the necrotrophic fungal pathogen *B. cinerea*. We found striking differences not only in protein but also in primary and specialized metabolite contents. We found a depletion of proteins and metabolites related to cell wall and carbohydrate metabolisms together with proteolysis whereas only a few specific factors such as peroxidases, cell wall remodelling enzymes and specialized metabolites were strongly accumulated. Some of them were previously described as important for *B. cinerea* resistance such as the AtPME17, AtHyPRP1 and AtPRX71 proteins, and the specialized metabolites camalexin and flavonoids. However, the majority of proteins and metabolites identified as differentially accumulated in the apoplast following infection have currently no known role in the context of host-pathogen interaction. Our results also highlighted the capacity of the fungus to influence plant hormonal immunity to its advantage through the promotion of SA-mediated cell death and the negative regulation of the JA pathway. Finally, fungal effectors were also identified such as the BcPG1 and BcIEB1 proteins as well as putatively secreted undescribed proteins. Altogether this work enabled us to gain insight in the early phase of *B. cinerea* infection and identify novel putative defence and susceptibility factors.

## RESULTS

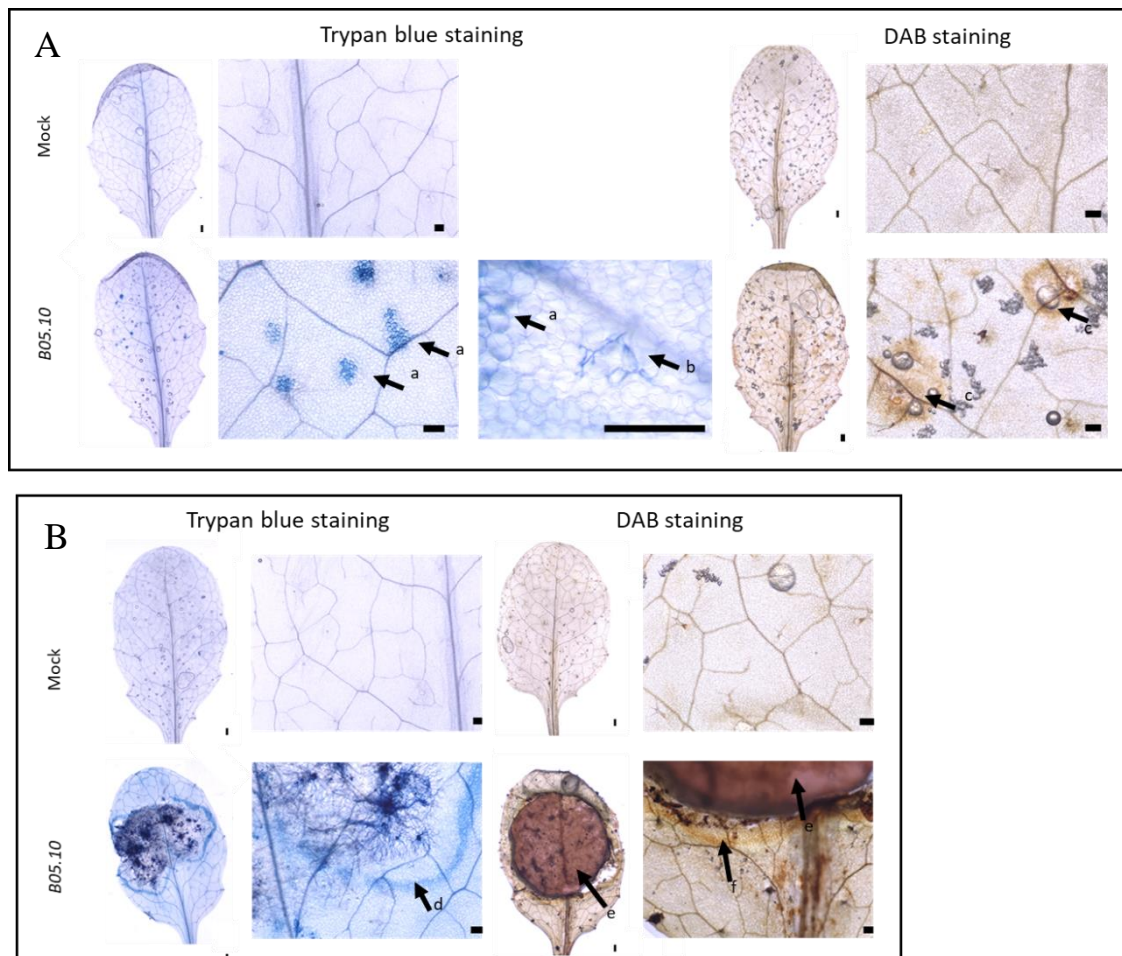
### Apoplast washing fluids (AWF) extraction from early infected leaves

To investigate the leaf apoplastic space during *A. thaliana* – *B. cinerea* interaction we first selected an appropriate infection strategy and time after inoculation for the recovery of the apoplastic extracts. Our aim was to observe a reaction of the leaves to the fungus and avoid as much as possible destruction of the tissues to limit cytoplasmic contamination of the apoplastic extracts. To identify the optimal conditions, we performed a 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) coloration, which reveals the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the appearance of a brown precipitate. In parallel, with a trypan blue (TB) coloration we checked for the absence of dying cells. With large mycelial plugs of the wild type strain (WT) B05.10 as inoculum, we could observe at 6 hpi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production at different sites of the leaves (Figure 1Ac). In comparison with the mock where we didn't see any coloration, the total DAB-stained surface after infection was important thus confirming reaction of the leaf to the fungal infection. TB coloration revealed only small spots of coloration mostly due to the presence of mycelium (Figure 1Aa, b). On the contrary, at the later time-point (24 hpi) appearance of large maceration area under and around the mycelial explant led to a strong TB coloration and DAB coloration revealing respectively extensive cell death and oxidative burst (Figure 1Bd, e). We thus selected the earlier time-point (6 hpi) for AWF extraction.

The apoplast washing fluid extracts composition is highly dependent on the infiltration solution used (Ravi Gupta *et al.*, 2015). In this study we used ddH<sub>2</sub>O (double distilled water) as infiltration solution for metabolomics analysis since the use of buffers like KCl or Tris-buffer can influence the detection of endogenous metabolites. Concerning proteome analysis, Boudart *et al.*, 2005 demonstrated that the use of 0.3 Mannitol together with 0.2 CaCl<sub>2</sub> as infiltration solution enables the recovery of a large diversity of proteins by solubilization of weakly bound cell wall proteins. Accordingly, we used this method for extraction of AWF designated for proteomic analysis.

Then, we verified two cytoplasmic contamination marker levels in our extracts, the cytoplasmic enzyme malate dehydrogenase (MDH) and the protein concentration, in order to finally compare mock and infected conditions. MDH activity had been extensively used as a marker of cytoplasmic contamination in studies focusing on the apoplast. We observed no significant differences in MDH activity between mock AWF extracts (mAWF) and infected AWF extracts (iAWF) with both infiltration solutions (Table 1). Furthermore, the MDH activity levels observed in our study were similar to those obtained in other studies (O'Leary *et al.*, 2016). Unsurprisingly, we observed a slight increase of the protein concentration in iAWF as it was observed in Floerl *et al* (2012) and a higher concentration of proteins with the Mannitol-CaCl<sub>2</sub> infiltration technique. Finally, in order to compare the metabolite concentrations, we analysed the dilution factor of the extracts as described in O'Leary *et al* (2014). The dilution factors were very similar between mock and infected sample with an average dilution factor of 1.67 and 1.65, respectively.

Altogether these results showed that our experimental approach enabled the collection of comparable mAWF and iAWF extracts with low cytoplasmic contaminations.



**Figure 1: Strong plant reaction to the fungus accompanied with reduced plant cell death at 6 h post-inoculation (hpi).** (A, B) *A. thaliana* leaves were tested for cell death reaction with trypan blue and for ROS production with DAB (3, 3'-diaminobenzidine) at 6 hpi (A) and 24 hpi (B) with mock treatment or mycelial explants of the B05.10 WT strain of *B. cinerea*. Arrows indicate localized necrosis (a), infecting mycelium (b), oxidative burst initiation (c), extensive cell death (d), the mycelial explant (e) and strong oxidative burst (f). Pictures were taken with the ZEISS Axio Zoom V16. About 4 leaves of independent plants per conditions were observed at each time point and the experiment was repeated 3 times. Scale bar = 200µm.

		mAWF	iAWF
<b>Mannitol-CaCl<sub>2</sub> infiltration</b>	Activité MDH (U.ml <sup>-1</sup> )	0.018 +/- 0.0035	0.024 +/- 0.003
	Protein concentration (µg.µL <sup>-1</sup> )	0.26 +/- 0.05	0.35 +/- 0.1
<b>ddH<sub>2</sub>O infiltration</b>	Activité MDH (U.ml <sup>-1</sup> )	0.0072 +/- 0.006	0.01 +/- 0.0025
	Protein concentration (µg.µL <sup>-1</sup> )	0.190 +/- 0.041	0.193 +/- 0.023
	AWF dilution factor	1.67 +/- 0.38	1.65 +/- 0.35

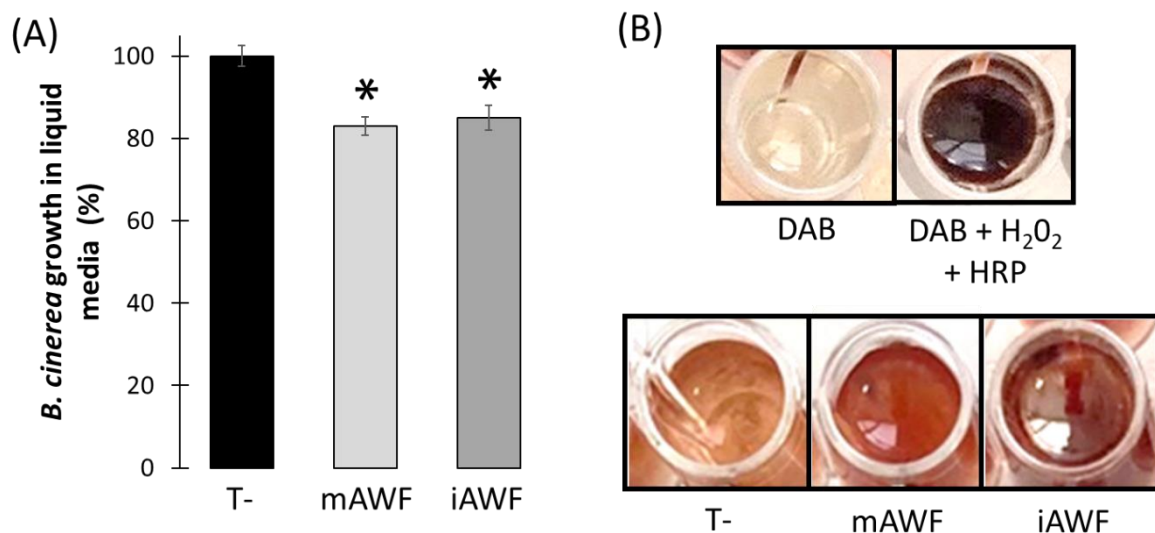
**Table 1: Comparison of cytoplasmic contamination markers of Apoplastic washing fluids (AWF) extracts between uninfected AWF extracts (mAWF) and infected with the WT strain**

## Antifungal properties of AWF extracts

We wanted to characterize the effect of AWF extracts on the fungus. To determine whether our AWF extracts at 6hpi contained anti-fungal molecules, we tested the effect of these extracts on *B. cinerea* growth over time (Figure 2A). By monitoring fungal growth *in vitro* during 48 h with laser nephelometry as described in Joubert *et al* (2010), we observed a significant reduction of fungal growth in the presence of a 1/10 dilution of the both mAWF and iAWF extracts in PDB. Interestingly, no significant differences were found in the growth inhibiting capacity of mAWF and iAWF. This suggests the presence of molecules in both mock and infected leaves that are able to restrain fungal growth. We can thus conclude that 6 h after infection the plant has not significantly increased the antifungal activity of the apoplastic compartment.

Since fungal ROS production occurs rapidly during the interaction between *B. cinerea* and its hosts to promote plant cell death we hypothesized that AWF extracts could induce such production. Using DAB coloration on the fungal biomass obtained after the growth test, we revealed that the fungus produced larger amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after incubation with mAWF extracts compared to the mock (T-) (Figure 2B). Interestingly, the iAWF induced an even stronger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> released by the fungus.

In conclusion, even if iAWF has the same growth reduction effect on *B. cinerea* as mAWF, it triggers the induction of a stronger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by the fungus thus revealing a potential higher quantity of virulence inducers in iAWF than mAWF.



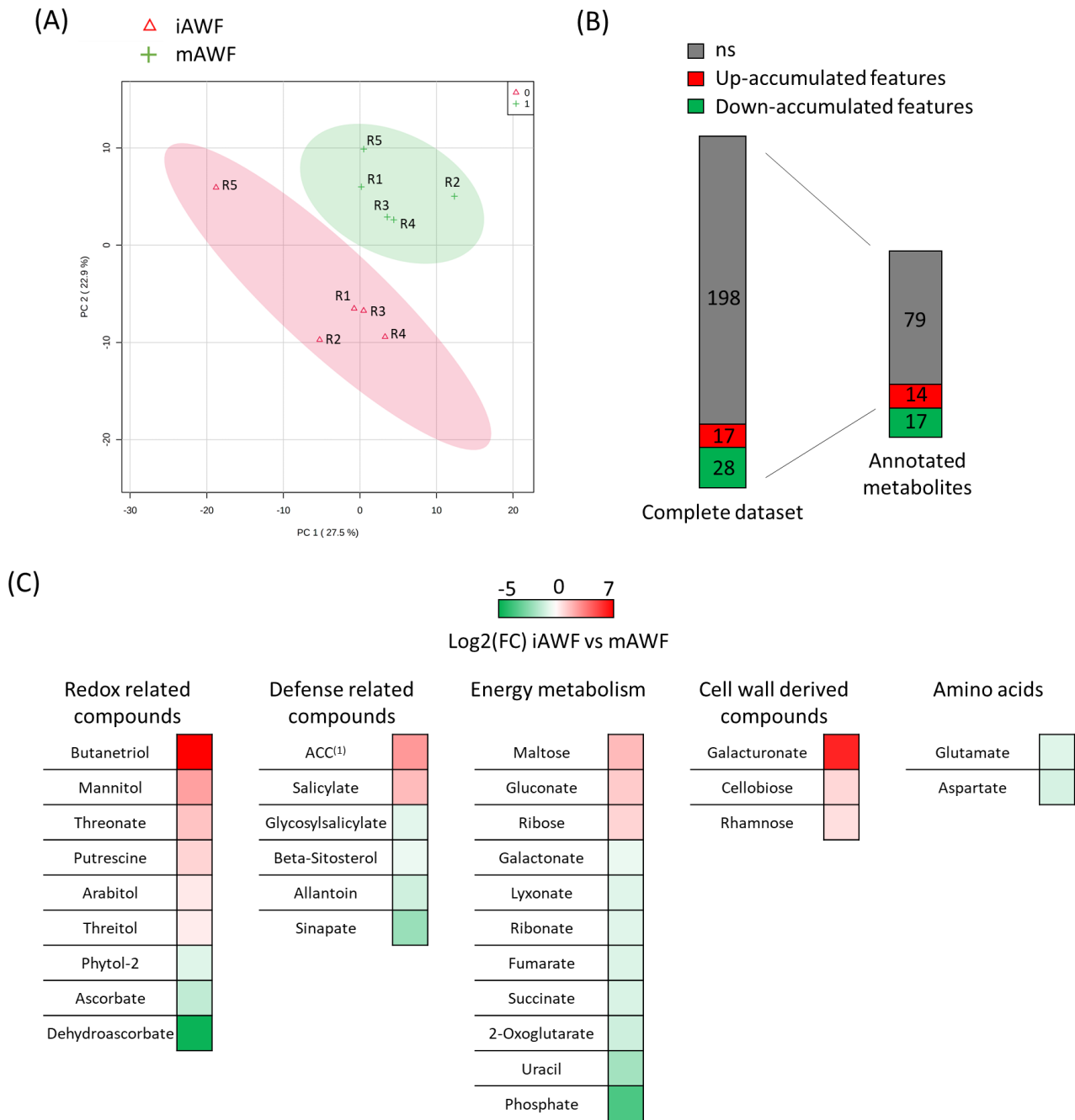
**Figure 2: Antifungal effect of ddH<sub>2</sub>O AWF extracts.** Fungus spores were grown with PDB (T-) with 1/10 dilution of different AWF extracts (mAWF, iAWF) in 96-wells microplates. (A) Growth inhibition of the WT B05.10 strain of *B. cinerea* with AWF extracts. Growth represented by the DO<sub>635nm</sub> was monitored every 15 min for 48 h in a nephelometric reader. The average growth slopes were calculated during the exponential phase. Results are represented as the mean percentage of growth compared to the control condition (PDB, 100%). Experiments were repeated 3 times with 4 different biological replicates of AWFs. Two-sample t-test was performed (\*p<0.05). (B) Induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production after growth of *B. cinerea* with AWFs extracts. After the growth inhibition assay, each well of the microplate was subjected to DAB coloration to reveal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Two coloration controls without the fungus were done with either PDB + DAB as negative control or PDB + DAB + 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HRP (horseradish peroxidase) as positive controls. Experiments were repeated 2 times and the same results were observed with 4 different biological replicates of AWF extracts.

## Effect of infection on primary metabolite content in AWF

Plant primary metabolism plays an essential role during defence to provide energy, chemical precursors for specialized metabolites and to activate defence signalling pathways. We thus studied the changes in the apoplastic primary metabolite content 6 h after *B. cinerea* infection and in mock samples. Using GC-MS on five biological replicates of AWF extracts, we were able to detect 243 features. *B. cinerea* infection triggered important changes in these detected features. Indeed, principal component analysis (PCA) revealed a clear separation between mAWF and iAWF (Figure 3A). These extracts were separated by the first component (PC1) explaining 27.5 % of the variance and the second (PC2) explaining 22.9 %. Interestingly we found more features significantly down accumulated in iAWF than up-accumulated, respectively 28 and 17 (Figure 3B). Among this list of 243 features, 110 were annotated metabolites. The most abundant metabolites found in mAWF were organic acids: fumarate, citrate, malate followed by two sugars: fructose and glucose and four amino acids: glutamate, aspartate, serine and GABA (Figure S1). For further analysis we focused on the list of 110 annotated metabolites.

We were able to identify 31 annotated metabolites significantly different between mAWF and iAWF (Figure 3B, 3C). They were grouped in five categories, redox related compounds, defense related compounds, energy metabolism, cell wall derived compounds and amino acids. Regarding redox related compounds we found an accumulation of polyols such as mannitol which have protective properties (Williamson *et al.*, 2002). We also observed in iAWF an accumulation of the polyamine putrescine that can be oxidized to produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involved in plant defense. Interestingly, dehydroascorbate (DHA) and ascorbate (AA) were depleted whereas threonate, which can originate from the catabolism of the last two compounds, is accumulated. The AA/DHA redox couple is very important for ROS homeostasis and its perturbation reveal the stress caused by the infection. Finally, we observed a depletion of phytol-2 in iAWF, a precursor of the antioxidant  $\alpha$ -tocopherol. Concerning defense related compounds, we observed an accumulation in iAWF of two hormones involved in defence responses, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) which is the precursor of Ethylene (ET) and Salicylate (SA) whereas Glycosylsalicylate, which is the inactive form of this last hormone was depleted (Figure 3C). This result is consistent with the involvement of hormonal defense pathways in defense against *B. cinerea* infection (AbuQamar *et al.*, 2017). A depletion of beta sitosterol, involved in abiotic and biotic stress responses, and allantoin which is a purine catabolite that can modulate JA-mediated defences, was observed in iAWF compared to mAWF (Cabianca *et al.*, 2021; Fujimoto *et al.*, 2021; Takagi *et al.*, 2016). Finally, sinapinate was depleted in iAWF. Concerning the energy metabolism category, metabolites were mostly depleted in iAWF compared to mAWF. Organic acids involved in energy production via the TCA cycle such as fumarate, 2-oxoglutarate and succinate were depleted whereas sugars such as maltose and ribose were accumulated. Moreover, an accumulation of cellobiose, galacturonate and rhamnose which are respectively building blocks of cellulose and pectin was found in iAWF compared to mAWF. This accumulation of breakdown products of the cell wall is consistent with the strong cell wall degrading capacities of *B. cinerea*. Finally, two amino acids, glutamate and aspartate were depleted in iAWF compared to mAWF.

To conclude, the infection induces the accumulation of apoplastic metabolites that have a role in redox processes and defense whereas several metabolites related to energy metabolism were depleted. Moreover, the accumulation of cell wall-derived compounds and phytohormones in the apoplast after infection brings out their important role in apoplastic signalling and defence.



**Figure 3: Metabolome analysis of AWF extracts primary metabolites obtained by GC-MS.** (A) Principal component analysis (PCA) of the metabolomic results. Colored ellipses represent 95% confidence regions of the PCA. R1, R2, R3 and R4 indicates the number of the replicate. (B) Schematic representation of the modifications in iAWF compared to mAWF in the complete dataset or only the annotated metabolites. Differently accumulated features were obtained with a paired t-test ( $p < 0.05$ ). ns = not significant. (C) Log<sub>2</sub> fold changes of iAWF compared to mAWF are represented for annotated metabolite significantly different between the two condition. Significant metabolites were identified with a paired t-test ( $p < 0.05$ ). Five biological replicates were analysed to obtained these data. <sup>(1)</sup>1-aminocyclopropane-1-carboxylate. Analysis were done with the MetaboAnalyst 5.0 online tool.

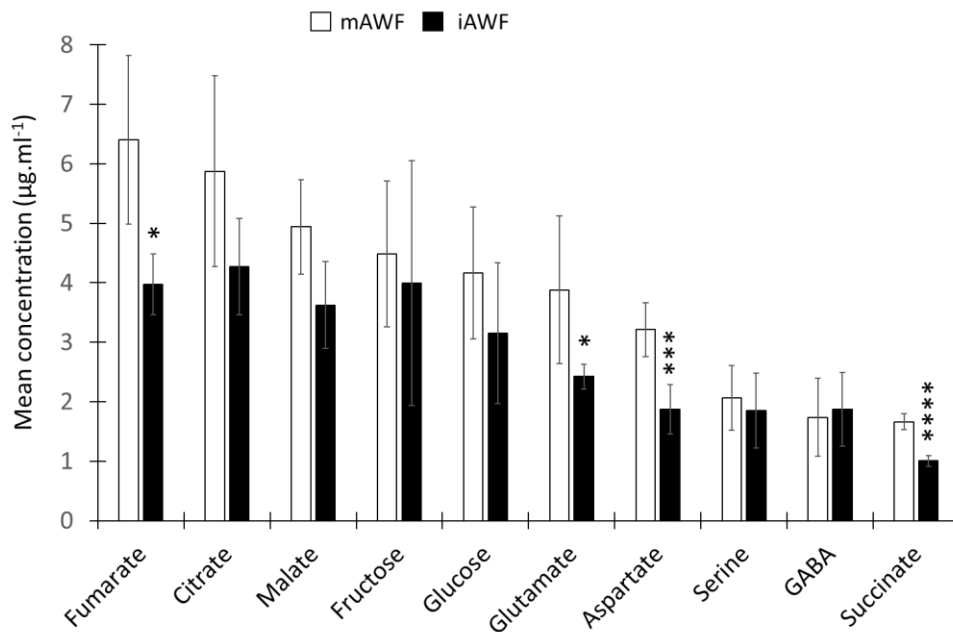
## Specialized metabolites content modifications in AWF from infected leaves

Growing efforts are made in the scientific community to identify and understand the role of specialized metabolites in plants. These compounds possess a plethora of functions such as communication with other organisms, protection against abiotic stress like UV-B radiation and protection against pathogens through their toxic nature (Zaynab *et al.*, 2018b). Accordingly, we wanted to identify the specialized metabolites accumulated in the AWF during the *B. cinerea* – *A. thaliana* early interaction. Using LC-MS/MS we were able to identify 598 features, all of them were being in both mAWF and iAWF extracts.

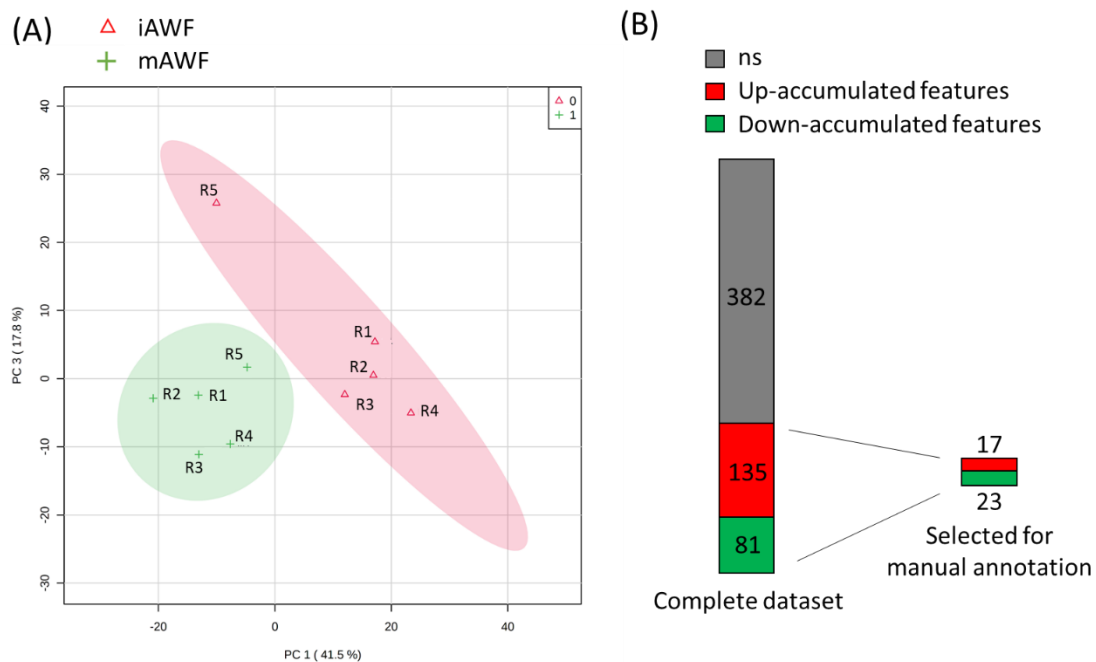
After infection, the specialized metabolites content in the apoplast was remarkably modified as attested by the PCA (Figure 4A). Strong separation of the two conditions was observed, mostly by the first component representing 41.5 % of the variance. Contrary to primary metabolites, a majority of features observed for specialized metabolites were accumulated after infection. We then focused our attention on features with significantly different abundances between mAWF and iAWF. A majority of these features were accumulated in iAWF, with 135 features significantly accumulated against 81 significantly depleted (Figure 4B). Then, from this list, we selected 39 interesting candidates shown in Table 2 based on the fold changes and the correspondence to annotation databases for manual annotation with Sirius software (Dührkop *et al.*, 2019). This list contained 3 metabolites confirmed by standard molecules (Table 2, Asteriks \*) and 36 putative identifications. These results showed that the apoplastic metabolites highly impacted by *B. cinerea* infection at 6 hpi are mainly derived from six major pathways. The two metabolites with the highest positive fold changes after infection in the apoplast were classified in the alkaloid pathway. It concerned features putatively annotated as camalexin (7,08) and its precursor hydrocamalexate (7,23) (Table 2). These alkaloids are phytoalexins with antimicrobial activity (Ahuja *et al.*, 2012). In the same pathway we found a feature putatively annotated as indole-acetic acid N glucose (IAA-Glc) which is a conjugated form of the abundant IAA auxin. Then the highest positive fold changes were assigned to the terpenoids ( $\leq 6,37$ ) followed by the fatty acids ( $\leq 5,45$ ). In these two pathways, metabolites were mostly accumulated with high fold changes excepted an unknown feature of the terpenoids that presented the highest negative fold change (-8,93) and a feature putatively annotated as OPDA (-1,52) in the fatty acids which is a precursor of JA. As shown in Table 2, the forth group with highest positive fold change features ( $\leq 5,15$ ) was the shikimate and phenylpropanoid pathway known for its importance in plant-pathogen interactions. It also contained more than 50 % of the 39 selected metabolites. In this category we found a strong accumulation of five flavonoids (Table 2). However, most of the metabolites assigned as part of the shikimate and phenylpropanoid pathway were depleted in the apoplast after infection. For example, sinapinate, glucosyl ferulate, benzoic acids and coumaroyl quinic acid, which are precursors of other molecules of the shikimate and phenylpropanoid pathway.

Altogether, our results revealed the large diversity of apoplastic specialized metabolites produced by the plant at 6hpi during *B. cinerea* infection. The strong accumulation of alkaloids putatively annotated as camalexin or involved in camalexin synthesis is consistent with the importance of this phytoalexin in *B. cinerea* resistance. Likewise, the depletion of precursor molecules of the shikimate phenylpropanoid pathway and the accumulation of flavonoids is consistent with an important role of final products of this pathway such as flavonoids in defence against *B. cinerea* (Chen *et al.*, 2022).





**Figure S1: The 10 most abundant primary metabolites recovered in AWFs extracts.** Data represented are the mean of five biological replicates +/- SD. Paired t-test were done between mock AWF extracts and infected AWF extracts : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 4: Metabolome analysis of AWF extracts specialized metabolites.** (A) Principal component analysis (PCA) of the metabolomic results. Colored ellipses represent 95% confidence regions of the PCA. R1, R2, R3 and R4 indicates the number of the replicate (B) Schematic representation of the modifications in iAWF compared to mAWF in the complete dataset or the selected features manually annotated. Differently accumulated features were obtained with a paired t-test ( $p < 0.05$ ). ns = not significant. Five biological replicates were analysed to obtain these data. Analysis were done with the MetaboAnalyst 5.0 online tool.



**Table 2: Proposed identifications of selected features differentially accumulated obtained by untargeted metabolomic.** The log2 paired fold change between mAWF and iAWF are indicated.

Putative annotation			m/z_rt	formula	mDa <sup>1</sup> mSigma <sup>2</sup>		Log2(FC)	Raw p_value		
Pathway	Superclass	Molecule								
Alkaloids	Tryptophan alkaloids	Dihydrocamalexate	247,054_4,11	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	2	9,3	7,23	1,04E-03		
		Camalexine	201,048_9,12	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S	0,1	6,5	7,08	5,95E-04		
		Indole-3-acetic acid N glucose	338,123_4,47	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>7</sub>	0,2	7,9	2,68	2,06E-03		
	Tyrosine alkaloids		698,191_4,95	C <sub>30</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>18</sub>	0,3	12,1	-5,1	2,75E-03		
			580,166_7,83	C <sub>27</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> +NH <sub>4</sub>	1,4	43,8	-3,98	6,21E-03		
	Pseudoalkaloids		401,124_7,83	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	3,8	59,7	-3,48	2,14E-02		
Terpenoids	Sesquiterpenoids		325,166_10,17	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	0,4	29,7	6,37	8,73E-04		
			217,158_6,12	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	0,5	24,3	4,51	4,71E-04		
			333,203_14,25	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	3,6	37,8	5,29	6,27E-03		
			519,236_13,66	C <sub>31</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	1,1	14,2	-8,93	2,75E-03		
Fatty acids	Fatty acids and conjugated		277,216_15,70	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,8	4,5	5,45	7,25E-04		
		a	275,200_14,23	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1,3	36,1	4,93	3,06E-03		
		9s,13r-12-Oxophytodienoic Acid (OPDA)	275,200_17,38	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	0,5	4,3	-1,52	2,43E-03		
	Fatty acids glycosides		471,260_16,14	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	0,8	33,5	5,56	3,70E-03		
	Octadecanoids		311,223_15,68	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	1,2	18,7	5,55	3,97E-03		
Shikimates and phenylpropanoids	Flavonoids		545,092_6,44	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> +C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	0,9	21,1	5,15	1,22E-03		
		Kaempferol-3-O-alpha-L-rhamnoside	433,112_6,43	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	1,6	28	4,29	5,13E-04		
		Kaempferol-3-Glucoside-3-Rhamnoside	595,165_4,72	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	0,6	59,8	4,06	1,55E-03		
			413,088_4,72	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	0	3,2	3,88	8,30E-03		
		Homoorientin*	447,092_5,39	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	0,6	24,6	1,94	1,17E-02		
	Phenylpropanoids C6 C3	p-hydroxybenzoic acid hex		323,076_5,00	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	0,8	27,5	-5,24	1,14E-03	
		Sinapate derivative		701,134_4,97	C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> O <sub>18</sub>	1,9	21,9	-3,49	1,56E-02	
		Sinapoyl Malate*		341,085_5,02	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	0,6	12,1	-3,46	4,55E-04	
		Sinapate*		223,061_4,97	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	0,1	3,9	-3,07	9,38E-03	
				179,071_5,00	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	0,4	12,4	-3,03	1,57E-03	
				149,024_4,98	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>6</sub>	0,1	7,2	-3,02	6,32E-03	
				311,114_4,65	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	0,1	1,9	-4,31	4,89E-03	
	Phenylethanoids C6 C2	b		269,103_4,65	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	0,4	39,7	-3,05	1,01E-02	
	Phenolic acids C6 C1	Glucosyl-ferulate		374,144_4,65	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> +NH <sub>4</sub>	0,2	31,8	-3,46	3,17E-03	
	Lignans			429,118_4,99	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	0,4	21,9	-3,38	6,43E-02	
				561,125_7,81	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	0,4	34,7	-3,34	2,34E-02	
				355,103_4,65	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	0,3	3,8	-4,85	2,49E-03	
		Styrylpyrones	3-p-Coumaroyl-1,5-quinolactone		321,096_4,65	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	0,5	9	-3,91	6,38E-03
			Coumaroylquinic acid		339,107_4,66	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	0,3	5,8	-3,88	2,59E-03
				923,187_5,00	C <sub>43</sub> H <sub>40</sub> O <sub>23</sub>	0,1	39,6	-3,08	3,74E-02	
Polyketides	Coumarins		293,065_4,36	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	0,9	7,1	3,65	3,91E-03		
	Naphtalenes		175,039_4,99	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0	21,7	-4,15	9,10E-03		
Amino acids and peptides	Amonoglycosides		709,110_5,00	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	0,2	25,9	3,12	1,79E-02		
	Organosulfured compounds	8-Methylsulfinyloctyl isothiocyanate		234,098_13,33	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NOS <sub>2</sub>	0,1	4,2	-4,71	4,65E-03	
		7-Methylsulfinylheptyl isothiocyanate		220,082_11,21	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NOS <sub>2</sub>	0,3	17,4	-3,91	1,02E-02	

<sup>1</sup> Mass differences between the proposed annotation and the experimental data

<sup>2</sup> Identification score obtained with annotation software based on the fragmentation spectra, the lower the score, the more robust the annotation

(a) 4-Hydroxy-6-[2-(2-methyl-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-1-yl)ethyl]oxan-2-one

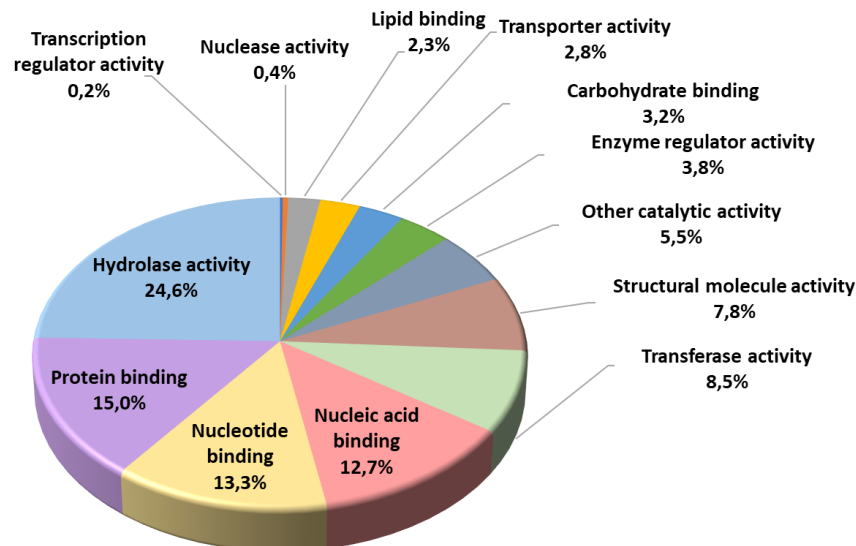
(b) 11,22-dimethyl (6E,17E)-3,14-dioxo-8,19-bis({[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy})-4,9,15,20-tetraoxatricyclo[16.4.0.0,(1)(2)]docosa-6,10,17,21-tetraene-11,22-dicarboxylate

\* confirmed by standard molecules

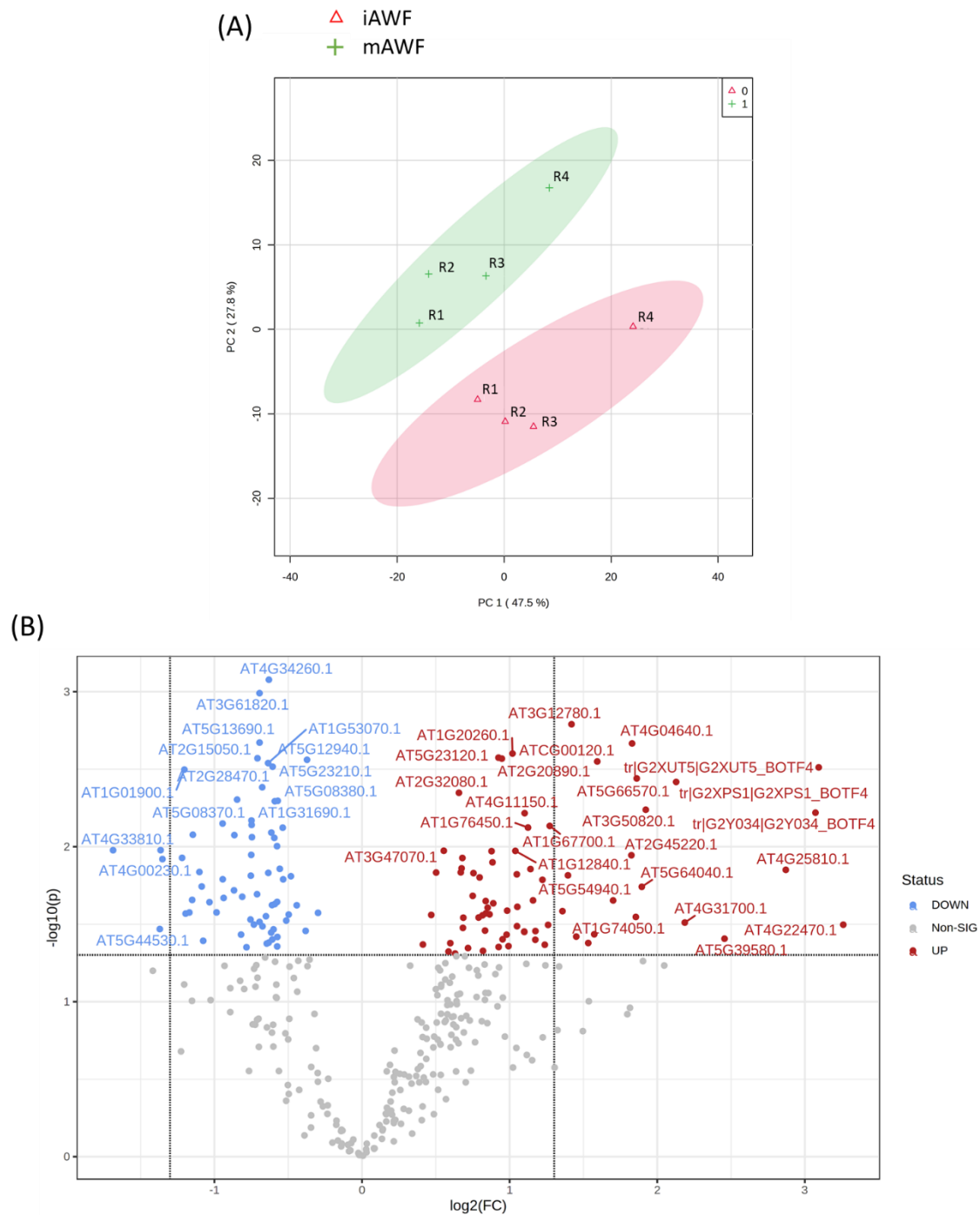
## Early changes in the apoplast proteome of *A. thaliana* infected leaves

Proteomic analysis was performed on mAWF and iAWF in order to examine the changes that occur in the apoplast after 6 hpi with *B. cinerea*. A set of quantitative proteomic data was obtained by extracted ion chromatogram signals analysis (XIC) in which 347 *A. thaliana* proteins were identified and quantified (Figure 5). Among them, 75 proteins were found previously in other studies on the *A. thaliana* apoplast proteome (Borniego *et al.*, 2020; Boudart *et al.*, 2005; Floerl *et al.*, 2012). A total of 138 proteins were found significantly different between mAWF and iAWF, 70 and 68 proteins were respectively up and down accumulated after infection (Figure 6B). To gain insight into the role of the total 347 proteins identified in the AWF samples, we classified them using gene ontology (GO) enrichment analysis. Proteins were grouped according to plant GO-slim categories obtained for molecular functions (AgBase). In order to simplify the classification some categories were merged (Figure 5). This functional classification revealed a high proportion of proteins with “hydrolase activity” (25 %), “protein binding” (15 %), “nucleotide binding” (13.3 %) and “nucleic acid binding” (12.7 %). This high level of hydrolase activity is consistent with the apoplastic presence of defense proteins such as PR proteins even in unchallenged plants.

Then, to confirm the correct extraction of apoplastic proteins we searched for predicted localisation of the proteins using TargetP software (2.0). Among our 347 proteins, 38 % were predicted to possess a classical signal peptide, which is close to what was previously observed with apoplastic studies of *A. thaliana* seedlings (47 %) and tomato leaves (45 %) (Casasoli *et al.*, 2008; Llorens *et al.*, 2021). On the other hand, 29 % of the proteins showed no signal peptide and 33 % had a signal peptide for chloroplast and mitochondrial localisation. When we focused on the 138 significantly different proteins between mAWF and iAWF, 51 % contained a classical signal peptide, 24 % a signal peptide for chloroplastic and mitochondrial localizations whereas 25 % didn't contain any signal peptide. Thereby, no increase in chloroplastic and mitochondrial signal peptide nor decrease in classical signal peptide proportions was found in significantly different proteins after infection. These results further attested that the level of cytoplasmic contamination was not higher in iAWF thus allowing the comparison of our extracts.

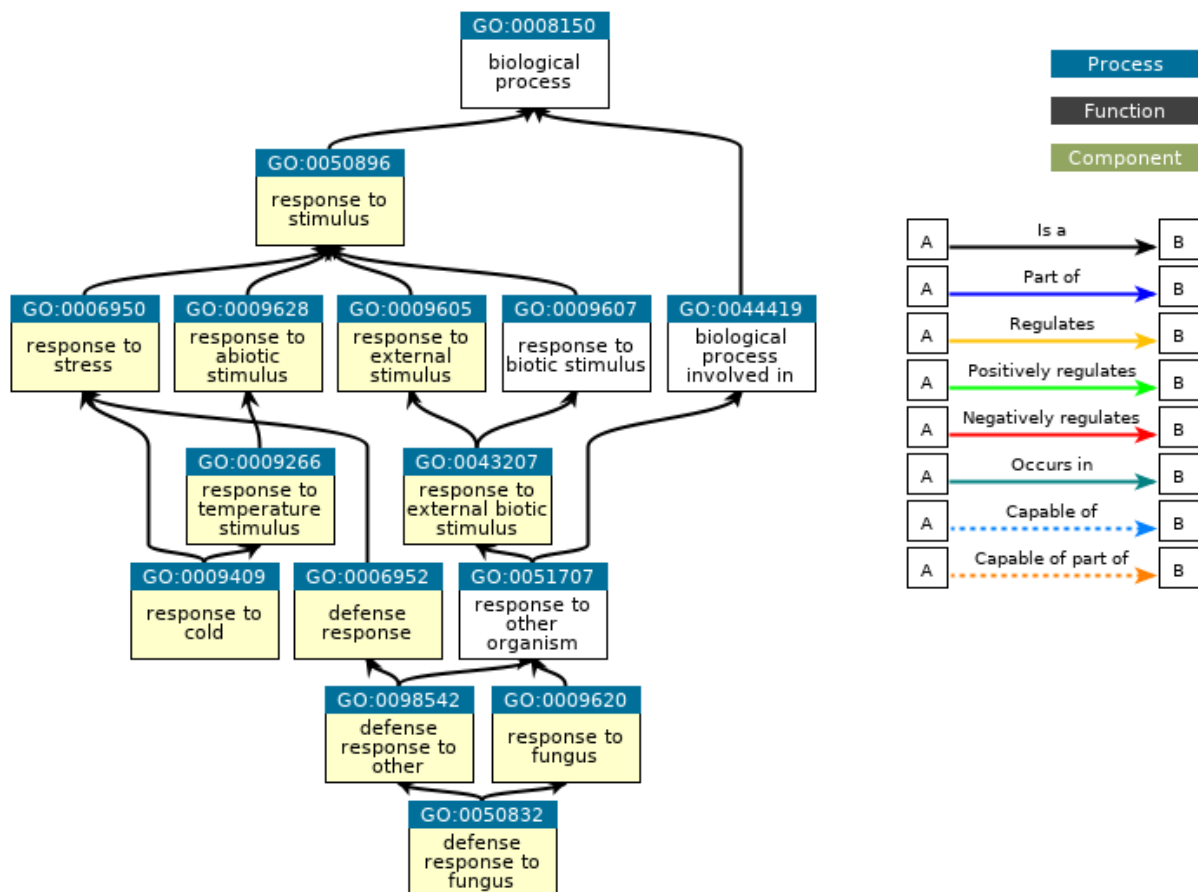


**Figure 5: Functionnal categories (GO) of protein identified in AWF extracts.** A total of 347 *A. thaliana* proteins were identified in mAWF and iAWF. This chart represents the percentage of proteins in each functionnal category. Some overlapping categories were merge.



**Figure 6: Proteome analysis of AWF extracts.** (A) Principal component analysis (PCA) of the proteomic results. Colored ellipses represent 95% confidence regions of the PCA. R1, R2, R3 and R4 indicates the number of the replicate. (B) Volcano plot of the paired analysis between mock and infected AWF samples. Four biological replicates were analysed to obtained these data. Analysis and figures were done with the MetaboAnalyst 5.0 online tool.

As shown in Figure 6A, the two conditions (mAWF and iAWF) were separated in the PCA with high scores for the two first component (47.3 % and 22.7 % respectively). Since we didn't find any increase in cytoplasmic contamination between samples we hypothesized that among differently accumulated proteins between iAWF and mAWF we would mainly find proteins involved in response to pathogen. Indeed, thanks to GO enrichment analysis, we found that 61 % of the significant proteins were grouped in the GO term "response to stimulus" with enrichment in several child terms such as "defence response" (20 % of significant proteins) or "response to abiotic stimulus" (30 % of significant proteins) (Figure S2). Among these proteins, we can highlight AtDHyPRP1 (DOUBLE HYBRID PROLINE-RICH PROTEIN 1, At4g22470) which had the highest positive fold change between mock and infected conditions (Table S1). It was shown that this protein, found to be localised in the plasmodesmata, has a role in SAR and defence against *B. cinerea* (Li *et al.*, 2014). Moreover, we observed a strong depletion of the chitinase AtCHIC (At4g19810). Interestingly we observed a depletion in the plant natriuretic peptide A protein (AtPNP-A, At2g18660) and accumulation in AtRNS1 protein (At2g02990). This functional analog of the vertebrate atrial natriuretic peptide A and this ATP-responsive ribonuclease 1 were shown respectively to act as negative regulator and positive regulator of the SA pathway and the SA-mediated plant cell death (Goodman *et al.*, 2022; Pyo Lee *et al.*, 2020).



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

**Figure S2:** GO enrichment analysis results for significantly different proteins between mAWF and iAWF. A focus was made on biological processes concerning « response to stimulus ». Yellow colored boxes are significantly enriched terms. GO enrichment was made with the PANTHER classification system (<http://pantherdb.org>) and the chart obtained with the QuickGO tool (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>).

**Table S1: Differentially accumulated proteins between mAWF and iAWF and grouped by child categories of the response to stimulus GO category.**

GO term	AGI	Commun name	Annotation	TargetP <sup>(a)</sup>	Described in	log <sub>2</sub> (FC) <sup>(b)</sup>	Raw p_val <sup>(b)</sup>	
Defense response	AT4G22470	AtDHyPRP1	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	SP	Li et al., 2014	3,26	3,19E-02	
	AT5G39580	AtPRX62	Peroxidase superfamily protein	SP	Pacheco et al., 2022	2,46	3,92E-02	
	AT2G45220	AtPME17	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	SP	Del Corpo et al., 2020 - Aragon et al., 2021	1,83	1,13E-02	
	AT5G54940*		Translation initiation factor SU11 family protein			1,70	2,22E-02	
	ATCG00480*		ATP synthase subunit beta			1,22	1,63E-02	
	AT2G02990*	AtRNS1	Ribonuclease 1	SP	Goodman et al., 2022	1,14	1,39E-02	
	AT5G64120	AtPRX71	Peroxidase superfamily protein	SP	Lorrai et al., 2021 - Aragon et al., 2021	1,10	3,53E-02	
	AT2G20890		Photosystem II reaction center PSB29 protein	cTP		0,95	2,70E-03	
	AT1G02920	AtGST11	Glutathione S-transferase 7			0,88	1,26E-02	
	AT1G55490*	AtLEN1	Chaperonin 60 beta	cTP		0,85	2,48E-02	
	AT3G48990	AtAAE3	AMP-dependent synthetase and ligase family protein		Foster et al. 2012	0,84	2,69E-02	
	AT1G20020	AtFNR2	Ferredoxin-NADP[+]-oxidoreductase 2	cTP		0,76	1,48E-02	
	AT2G37220*	AtCP29B	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	cTP		0,72	4,51E-02	
	AT4G37930*	AtSHM1	Serine transhydroxymethyltransferase 1	mTP	Liu et al. 2019	0,69	2,87E-02	
	AT3G47520*		Malate dehydrogenase	cTP		0,60	4,19E-02	
	AT3G28940*	AtAIG2B	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein		Wang et al., 2022	0,47	2,76E-02	
	AT1G21670*		DPP6 amino-terminal domain protein	SP		-0,38	3,49E-02	
	AT1G28600	AtGGL2	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	SP	Xiao et al., 2021	-0,51	3,00E-02	
	AT5G08380	AtAGAL1	Alpha-galactosidase 1	SP	Imaizumi et al., 2017	-0,57	5,06E-03	
	AT5G44390	AtBBE25	FAD-binding Berberine family protein	SP		-0,60	3,42E-02	
	AT5G23210	AtSCPL34	Serine carboxypeptidase-like 34	SP		-0,61	3,05E-03	
	AT5G05960		Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S Albumin superfamily protein	SP		-0,61	3,97E-02	
	AT4G34260	AtAXY8	12C2-alpha-L-fucosidase	SP	Günl et al., 2011	-0,63	8,37E-04	
	AT2G34930		Disease resistance family protein / LRR family protein	SP	Ramonell et al., 2005	-0,63	4,16E-02	
	AT2G37130		Peroxidase superfamily protein	SP		-0,75	1,54E-02	
	AT2G18660	AtPNP-A	Plant natriuretic peptide A	SP	Pyo Lee et al., 2020	-0,76	2,95E-02	
	AT5G10770		Eukaryotic aspartyl protease family protein	SP	Breitenbach et al., 2014	-0,78	4,45E-02	
	AT2G02100*	AtPDF2.2	Low-molecular-weight cysteine-rich 69	SP	Siddique et al., 2012	-0,81	2,10E-02	
	Response to abiotic stimulus	AT3G50820	AtPSBO2	Photosystem II subunit O-2	ITP		1,92	5,78E-03
		AT5G66570	AtPSBO1	PS II oxygen-evolving complex 1	ITP		1,86	3,63E-03
ATCG00120		AtATPA	ATP synthase subunit alpha			1,59	2,82E-03	
AT3G12780		AtPGK1	Phosphoglycerate kinase 1	cTP	Télez et al., 2018	1,42	1,62E-03	
AT1G67700		AtHHL1	Multidrug resistance protein	cTP	Jin et al., 2014	1,27	7,34E-03	
AT1G72370			40s ribosomal protein SA			1,26	3,20E-02	
AT1G76450			Photosystem II reaction center PsbP family protein	ITP		1,12	7,53E-03	
AT4G11150			Vacuolar ATP synthase subunit E1			1,10	6,08E-03	
AT1G26380		AtFOX1	FAD-binding Berberine family protein	SP	Wang et al., 2022	1,05	1,51E-02	
AT3G53460			Chloroplast RNA-binding protein 29	cTP		0,99	4,38E-02	
AT4G01883		AtMLBP1	Polyketide cyclase / dehydrase and lipid transport protein	cTP		0,98	3,69E-02	
AT1G20810			FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	ITP		0,93	4,44E-02	
AT1G79550		AtPGK3	Phosphoglycerate kinase		Télez et al., 2018	0,89	2,32E-02	
AT1G77090			Thylakoid lumenal protein (Mog1/PsbP/DUF1795-like Photosystem II reaction center PsbP family protein)	ITP		0,82	2,77E-02	
AT5G48300		AtADG1	ADP glucose pyrophosphorylase 1	cTP		0,68	3,34E-02	
AT1G13930			Oleosin-B3-like protein		Jin et al., 2008	0,68	1,18E-02	
AT2G35410			RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	cTP		0,63	4,89E-02	
AT1G35720		AtANN1	Annexin 1		Malabarba et al., 2021	0,59	4,75E-02	
AT3G47070			Thylakoid soluble phosphoprotein	cTP		0,55	1,06E-02	
AT4G01130		ATGELP76	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	SP		-0,30	2,67E-02	
AT2G06850		AtXTH4	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 4	SP	Kushwah et al., 2020	-0,57	3,82E-02	
AT3G13750		AtBGAL1	Beta galactosidase 1	SP		-0,58	9,92E-03	
AT1G31690		AtCuAOalpha2	Copper amine oxidase family protein	SP	Fraudentali et al., 2020	-0,59	5,09E-03	
AT4G25260		AtPMEI7	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	SP		-0,59	8,77E-03	
AT2G05520		AtGRP-3	Glycine-rich protein 3	SP	Gottig et al., 2018 - Aragon et al., 2021	-0,61	2,38E-02	
AT2G28470		AtBGAL8	Beta-galactosidase 8	SP		-0,68	4,14E-03	
AT3G12145		AtFLR1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	SP		-0,75	7,23E-03	
AT5G34940		AtGUS3	Glucuronidase 3	SP		-0,75	1,13E-02	
AT3G43670		AtCuAOgamma2	Copper amine oxidase family protein;(source:Araport11)	SP	Fraudentali et al., 2020	-0,94	2,14E-02	
AT3G26720			Glycosyl hydrolase family 38 protein	SP		-0,99	2,66E-02	
AT4G19810	AtCHIC	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain-containing protein	SP	Ohnuma et al., 2011	-1,15	2,21E-02		
AT5G44530		Subtilase family protein	SP		-1,37	3,40E-02		

(a) Prediction of a specific localization peptide obtained with TargetP (2.0). SP : signal peptide, cTP : chloroplast transit peptide, mTP : mitochondrial transit peptide, ITP : thylakoid luminal transit peptide.

(b) The log<sub>2</sub> paired fold change mean of the four replicates are indicated as well as the raw pvalue from a paired t-test.

\*protein also include in the response to abiotic stimulus category

To gain more specific information about the apoplastic proteins modulated upon *B. cinerea* infection we analysed their known and putative functions. By grouping proteins by biological processes and molecular functions GO terms we were able to find 4 main categories: peptidase activity (12 proteins), “cell wall organisation or biogenesis” (16 proteins), “carbohydrate metabolic process” (13 proteins) and “oxidoreductase activity” (21 proteins) (Table 3). Surprisingly, the majority of proteins related to “cell wall organisation and biogenesis” and “carbohydrate metabolism” categories and all the proteins of the “peptidase activity” category were depleted in iAWF compared to mAWF. In the peptidase activity category, all proteins were found depleted in iAWF. Interestingly, the majority of these peptidases are undescribed proteins. However, we can notice AtSBT5.2, a previously described protease (At1g20160) having a role in plant defences (Serrano *et al.*, 2016). Concerning the “cell wall organisation or biogenesis” category, two proteins were accumulated with high fold changes, the xyloglucan endotransglycosylase AtXTH23 (At4g25810) and the pectin methylesterase AtPME17 (At2g45220). AtPME17 has a known role in plant defence (Del Corpo *et al.*, 2020) whereas AtXTH23 has never been studied in this context. Moreover, we also found a depletion in two PME-inhibiting proteins (PMEI), AtPMEI7 (At4g25260) and AtPMEI-PME61 (At5g53370). Finally, two undescribed SP-containing glycosyl hydrolase, At3g19620 and At4g33810, were found depleted in iAWF with a high fold change. Some proteins in the “cell wall organisation or biogenesis” category were also included in the carbohydrate metabolic process category but were only put in the first one in order to simplify the table. Concerning the carbohydrate metabolic process related proteins, none of them have been described in the interaction with *B. cinerea*. In the oxidoreductase activity category, peroxidases were predominant. It is consistent with the fact that peroxidases have an important role in plant-pathogen interactions. AtPRX62 (At5g39580), AtPRX71 (At5g64120), AtAPX4 (At4g09010), and another undescribed peroxidase (At4g37520) were accumulated after infection whereas AtPRX52 (At5g05340) and two others (At1g71695, At2g37130) were depleted. Interestingly, three peroxidases are undescribed proteins. Finally, At4g12900, a Gamma interferon responsive lysosomal thiol (GILT) reductase family protein present the higher negative fold change between iAWF and mAWF.

To conclude, the apoplastic protein content was rapidly and drastically modified by *B. cinerea* infection with a major impact on cell wall remodelling enzymes, proteases and redox enzymes. Furthermore, a large number of proteins were related to stress response with some of them already described as important in *B. cinerea* resistance. Nevertheless, some proteins found with high fold changes between mAWF and iAWF were either undescribed or unstudied in the context of host-pathogen interaction.



**Table 3: Differentially accumulated proteins between mAWF and iAWF grouped by molecular functions and biological processes GO terms.**

GO term	AGI	Commun name	Annotation	TargetP <sup>(a)</sup>	Described in	log <sub>2</sub> (FC) <sup>(b)</sup>	Raw p_val <sup>(b)</sup>	
Peptidase activity	AT5G23210	AtSCPL34	Serine carboxypeptidase-like 34	SP		-0,61	3,05E-03	
	AT2G33530	AtSCPL46	Serine carboxypeptidase-like 46	SP		-0,65	2,81E-02	
	AT3G61820*		Eukaryotic aspartyl protease family protein	SP		-0,69	1,02E-03	
	AT2G27920	AtSCPL51	Serine carboxypeptidase-like 51	SP	Liu et al., 2008	-0,73	3,18E-02	
	AT4G12910	AtSCPL20	Serine carboxypeptidase-like 20	SP	Cassin-Ross et al., 2014	-0,75	6,78E-03	
	AT1G01300		Eukaryotic aspartyl protease family protein	SP		-0,86	8,42E-03	
	AT2G04160	AtAIR3	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	SP		-1,03	2,28E-02	
	AT4G21650	AtSBT3.13	Subtilase family protein	SP		-1,09	1,81E-02	
	AT1G01900	AtSBTI1.1	Subtilase family protein	SP	Srivastava et al., 2008	-1,20	3,18E-03	
	AT4G00230	AtXSP1	Xylem serine peptidase 1	SP		-1,35	1,20E-02	
	AT1G20160	AtSBT5.2	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	SP	Serrano et al., 2016	-1,36	1,05E-02	
	AT5G44530		Subtilase family protein	SP		-1,37	3,40E-02	
	Cell wall organisation or biogenesis	AT4G25810*	AtXTH23	Xyloglucan endotransglycosylase 23	SP	Xu et al., 2020	2,87	1,41E-02
AT2G45220		AtPME17	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	SP	Del Corpo et al., 2020 - Aragon et al., 2021	1,83	1,13E-02	
AT4G11150			Vacuolar ATP synthase subunit E1			1,10	6,08E-03	
AT1G06400			Ras-related small GTP-binding family protein			0,50	1,47E-02	
AT3G28940		AtAIG2B	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein		Wang et al., 2022	0,47	2,76E-02	
AT2G46930		AtPAE3	Pectinacetylase family protein	SP	De Souza et al., 2014	-0,54	7,54E-03	
AT2G06850*		AtXTH4	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 4	SP	Kushwah et al., 2020	-0,57	3,82E-02	
At4g25260*		AtPMEI7	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	SP		-0,59	0,00877	
AT5G20950*		AtBGLC1	Glycosyl hydrolase family protein			-0,61	8,11E-03	
AT4G01700*			Chitinase family protein	SP		-0,69	3,06E-02	
AT1G68560*		AtXYL1	Alpha-xylosidase 1	SP	Günl et al., 2011	-0,71	2,03E-02	
AT5G34940		AtGUS3	Glucuronidase 3	SP		-0,75	1,13E-02	
AT5G53370*		AtPMEI-PME61	Pectin methylesterase PCR fragment F	ITP		-0,87	1,91E-02	
AT3G19620*			Glycosyl hydrolase family protein	SP		-1,15	8,38E-03	
AT3G10740*		AtARAF1	Alpha-L-arabinofuranosidase 1		Chavez Montes et al., 2008	-1,20	2,70E-02	
AT4G33810*			Glycosyl hydrolase superfamily protein	SP		-1,69	1,05E-02	
Carbohydrate metabolic process		AT3G12780	AtPGK1	Phosphoglycerate kinase 1	cTP	Télez et al., 2018	1,42	1,62E-03
	AT4G24620	AtPGI1	Phosphoglucose isomerase 1	cTP	Sanchez-Lopez et al., 2016	0,95	3,96E-02	
	AT1G79550	AtPGK3	Phosphoglycerate kinase		Télez et al., 2018	0,89	2,32E-02	
	AT5G48300	AtADG1	ADP glucose pyrophosphorylase 1	cTP		0,68	3,34E-02	
	AT5G13980		Glycosyl hydrolase family 38 protein			-0,56	1,39E-02	
	AT5G08380	AtAGAL1	Alpha-galactosidase 1	SP	Imaizumi et al., 2017	-0,57	5,06E-03	
	AT3G55260	AtHEXO1	Beta-hexosaminidase 1	SP	Liebming et al., 2011	-0,57	2,27E-02	
	AT3G13750	AtBGAL1	Beta galactosidase 1	SP		-0,58	9,92E-03	
	AT5G11720	AtAGLU1	Glycosyl hydrolases family 31 protein	SP		-0,59	2,35E-02	
	AT4G34260	AtAXY8	12C2-alpha-L-fucosidase	SP	Günl et al., 2011	-0,63	8,37E-04	
	AT2G28470	AtBGAL8	Beta-galactosidase 8	SP		-0,68	4,14E-03	
	AT5G08370	AtAGAL2	Alpha-galactosidase 2	SP	Imaizumi et al., 2017	-0,85	4,97E-03	
	AT3G26720		Glycosyl hydrolase family 38 protein	SP		-0,99	2,66E-02	
	Oxidoreductase activity	AT5G39580	AtPRX62	Peroxidase superfamily protein	SP	Pacheco et al., 2022	2,46	3,92E-02
		AT3G50820	AtPSBO2	Photosystem II subunit O-2	ITP		1,92	5,78E-03
AT5G66570		AtPSBO1	PS II oxygen-evolving complex 1	ITP		1,86	3,63E-03	
AT5G64120		AtPRX71	Peroxidase superfamily protein	SP	Lorrai et al., 2021 - Aragon et al., 2021	1,10	3,53E-02	
AT1G14810			Semialdehyde dehydrogenase family protein	cTP		1,05	3,26E-02	
AT5G66190		AtFNR1	Ferredoxin-NADP[+]-oxidoreductase 1	cTP		0,86	2,73E-02	
AT4G09010		AtAPX4	Ascorbate peroxidase 4		Wang et al., 2014	0,84	2,24E-02	
AT4G21280			Photosystem II subunit QA	ITP		0,83	3,48E-02	
AT4G05180			Photosystem II subunit Q-2	cTP		0,80	1,58E-02	
AT1G20020		AtFNR2	Ferredoxin-NADP[+]-oxidoreductase 2	cTP		0,76	1,48E-02	
AT4G37520			Peroxidase superfamily protein	SP		0,75	2,08E-02	
AT3G47520			Malate dehydrogenase	cTP		0,60	4,19E-02	
AT1G35720		AtANN1	Annexin 1		Malabarba et al., 2021	0,59	4,75E-02	
AT1G71695			Peroxidase superfamily protein	SP		-0,53	1,62E-02	
AT1G31690		AtCuAOalpha2	Copper amine oxidase family protein	SP	Fraudentali et al., 2020	-0,59	5,09E-03	
AT4G12880		AtENODL19	Early nodulin-like protein 19	SP	Mashiguchi et al., 2009	-0,62	3,58E-02	
AT5G66920		AtSKS17	SKU5 similar 17	SP		-0,67	3,26E-02	
AT5G05340		AtPRX52	Peroxidase superfamily protein	SP	Fernandez perez et al., 2015	-0,75	8,68E-03	
AT2G37130			Peroxidase superfamily protein	SP		-0,75	1,54E-02	
AT3G43670		AtCuAOgamma2	Copper amine oxidase family protein;(source:Araport11)	SP	Fraudentali et al., 2020	-0,94	2,14E-02	
AT4G12900			Gamma interferon responsive lysosomal thiol (GILT) reductase family protein	SP		-1,10	1,46E-02	

(a) Prediction of a specific localization peptide obtained with TargetP (2.0). SP : signal peptide, cTP : chloroplast transit peptide, mTP : mitochondrial transit peptide, ITP : thylakoid luminal transit peptide.

(b) The log<sub>2</sub> paired fold change mean of the four replicates are indicated as well as the raw pvalue from a paired t-test.

\*protein also present in the carbohydrate metabolic process category

### ***B. cinerea* proteins recovered in AWFs extracts**

Plant pathogens and especially fungi are known to secrete a large and diversified array of proteins during infection. Few fungal proteins were kept in the XIC analysis used above to describe the *A. thaliana* protein data because of their low abundance and their absence in mAWF extracts. Thereby, we used the data of the spectral count analysis which were less discriminant than XIC analysis but only semi-quantitative. 908 *A. thaliana* proteins and 18 Botrytis proteins were identified respectively in this dataset. As shown in Table 4, among these 18 identified fungal proteins, three presented a classical signal peptide, seven were predicted to be secreted through non-classical pathway with the ApoplastP and SecretomeP softwares and the last seven were characterised as unlikely secreted. The majority of proteins recovered were previously described either as abundant in the secretome of *B. cinerea*, such as BcPG1, BcIEB1 and BcSOD1 or in the mycelium such as BcENOL1, BcHEX, Bcin10g00030 and Bcin02g01060 (Espino *et al.*, 2010; Fernández-Acero *et al.*, 2010; González-Fernández *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012). Surprisingly, we also found BcPIC6 previously described as highly expressed at the gene level at the end of the infectious process (Gioti *et al.*, 2006). Finally, over the 18 identified *B. cinerea* proteins, five of them (27%) were known to have a role in pathogenicity. The other uncharacterized fungal proteins would be interesting candidates because of their early apoplastic secretion. Testing their role in virulence, in particular the Bcin13g00960 protein which possess a classical signal peptide, might reveal new aspects of the initial phase of *B. cinerea* infectious process.



**Table 4: *B. cinerea* proteins identified in AWF extracts from infected leaves.**

	BcinB0510 gene name	Usual name	Annotation	Predicted localisation (a)			Spectral count (b)	Known role	Described in
				SignalP	ApoplastP	SecretomeP			
Classic secretion mechanism	Bcin14g00850	BcPG1	BcPG1, endopolygalacturonase 1	SP	YES		1,5	virulence	Ten have et al., 1998
	Bcin15g00100	BcIEB1	Uncharacterized protein	SP	YES		3,25	cell death inducing activity	Frias et al., 2016
	Bcin13g00960		Endoplasmic reticulum chaperone BiP	SP			0,75		
Possible non-classical secretion mechanism	Bcin03g03390	BcSOD1	Superoxide dismutase		YES	0,563	4	virulence	Lopez-Cruz et al., 2017
	Bcin10g04220	BcPIC6	Translationally-controlled tumor protein homolog			0,734	0,75	plant-induced complete colonization gene	Gioti et al., 2006
	Bcin07g05130		Actin-depolymerizing factor 1			0,703	0,75		
	Bcin01g00370		Profilin			0,701	0,5		
	Bcin10g00030		EthD domain-containing protein			0,634	2,25		
	Bcin14g02370	BcCYC1	Similar to cytochrome c			0,596	2,25		
	Bcin08g05220		Triosephosphate isomerase			0,576	1,25		
	Bcin01g06450	BcENOL1	2-phosphoglycerate dehydratase			0,505	1,5	response to cold stress	Pandey et al., 2009
Unlikely secreted	Bcin08g01110	BcHEX	Uncharacterized protein			<0,5	1	virulence - growth - germination	Aguayo et al., 2011
	Bcin08g01550		Uncharacterized protein			<0,5	2,5		
	Bcin11g02720		Similar to glycerol dehydrogenase (GldB)			<0,5	1		
	Bcin07g01540		Elongation factor 2			<0,5	0,25		
	Bcin02g01060		Nucleoside diphosphate kinase			<0,5	4		
	Bcin08g02080		ABM domain-containing protein			<0,5	5,75		
	Bcin13g02510		CS domain-containing protein			<0,5	1,75		

(a) Prediction of localization was performed with SignalP (6.0), ApoplastP (1.0), SecretomeP (2.0). SP signified presence of a signal peptide, YES indicate a predicted apoplastic localization and score >0,5 for secretomeP suggest a possible non-classical secretion mechanism.

(b) Means of spectral count obtained for each protein from the four replicates of infected AWF extracts.

(c) Log<sub>2</sub>(FC) between mock inoculated and infected AWF extracts and p\_value obtained for each protein from XIC data.

## DISCUSSION

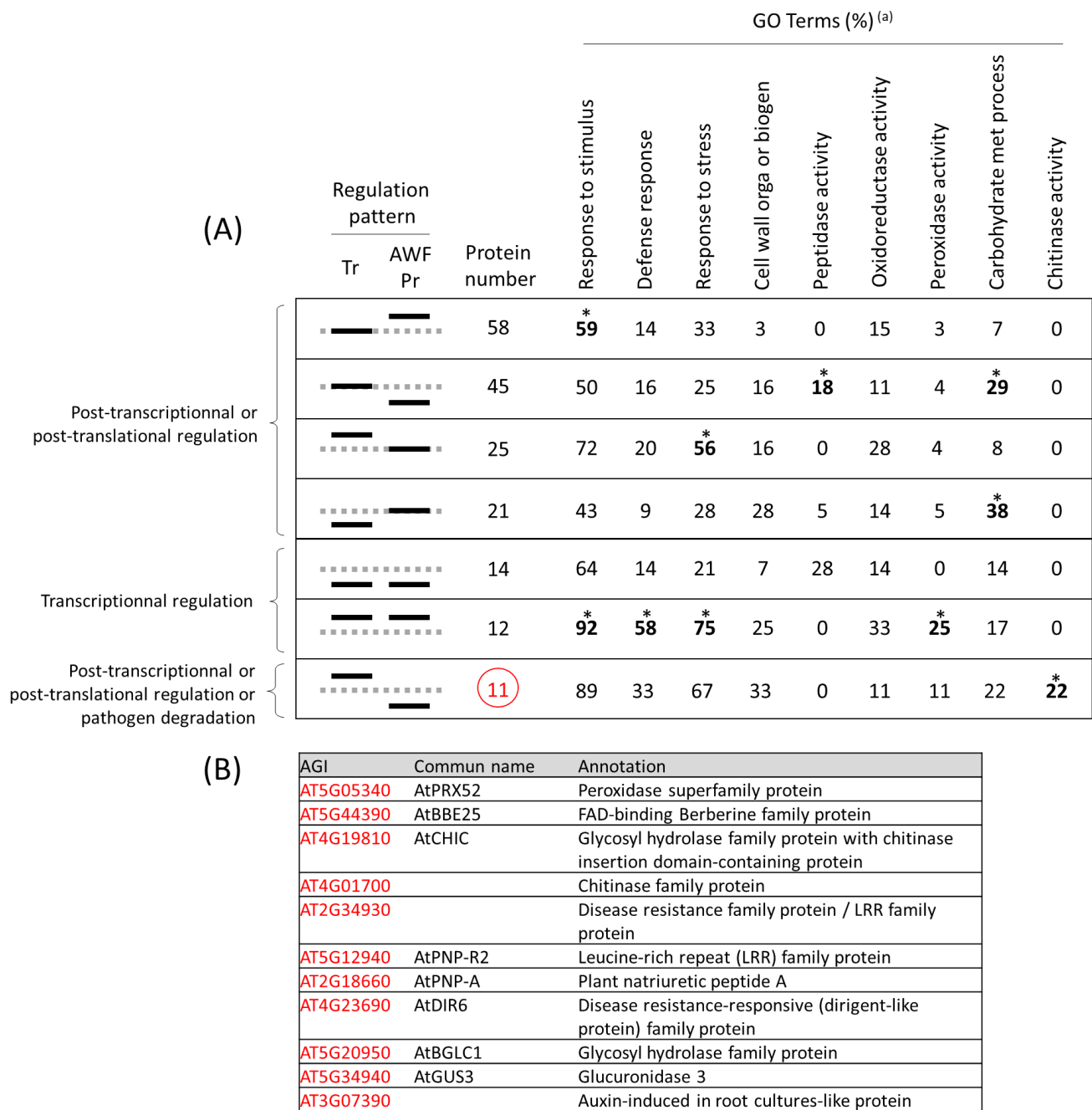
Several studies have investigated the apoplastic space of plant leaves in response to biotrophic and hemi-biotrophic fungal pathogens in order to describe exchanges in this compartment (Ben M'Barek *et al.*, 2015; Floerl *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). However, only a few studies have focused on the apoplast in response to necrotrophic fungi for the understandable reason that destruction of plant tissue can lead to cytoplasmic contamination of the apoplastic extract (Kim *et al.*, 2014). In this study, we analysed for the first time the effect of the early non-destructive phase of *B. cinerea* infection on the metabolomic and proteomic content of the apoplastic fluid. This early phase of the *B. cinerea* infectious process is characterized by degradation of preformed barriers such as the cuticle layer and the cell wall followed by penetration of the host. Once the fungus has completed host surface penetration it switches to an intercellular hyphal growth phase while triggering plant cell death and facing oxidative stress and plant toxic metabolites (Veloso & van Kan, 2018). The recovery of BcIEB1 and BcPG1 proteins from iAWF (Table 4) illustrate this phase since PG1 is involved in the degradation of the cell wall and it has been shown that the two proteins have a necrosis-inducing activity (Frías *et al.*, 2016; Kars, Krooshof, *et al.*, 2005). But on the plant side this phase of the infection also triggers many reactions such as the PTI, the oxidative burst, cell wall remodelling and thickening and production of antifungal compounds. Analysis of our AWF extracts revealed known proteins and metabolites involved in these processes together with uncharacterized interesting candidates for future genetic validation.

First, we wanted to validate the conformity of our data in regard to the other studies focusing on the apoplastic compartment. Similar levels of cytoplasmic contamination estimated by markers such as the malate dehydrogenase activity and the protein concentration were found in our extracts compared to other study (Floerl *et al.*, 2012; Llorens *et al.*, 2021; O'Leary *et al.*, 2016). Furthermore, as previously observed in other studies we found a great abundance of proteins with hydrolase activity in our extracts (Delaunoy *et al.*, 2013; Floerl *et al.*, 2012; Llorens *et al.*, 2021). However, we found proteins with nucleic acid binding activity which was never observed in the other studies (Figure 5). Limits of detection imposed by 2D-gel based approaches used in previous studies and differences between pathosystems might explain these contradictions. We observed that 70% of proteins with the “nucleic acid binding activity” GO term in our proteomic data concerned more specifically RNA binding (RNB) activity. This high proportion in RNB activity is consistent with He *et al.* (2021) who showed that during *B. cinerea* – *A. thaliana* interaction RNB proteins have an important role in the delivery of small interfering RNAs through extracellular vesicles. It is commonly accepted that the apoplast preparation method yields some intracellular contaminations but it also brings the question of non-classical routes of secretion (Vincent *et al.*, 2020). We found that 38% of proteins identified in mAWF and iAWF had a signal peptide involved in the conventional protein secretion (CPS) pathway through the endoplasmic reticulum (ER) and then the Golgi apparatus (Golgi), like other studies (Casasoli *et al.*, 2008; Floerl *et al.*, 2012; Llorens *et al.*, 2021). We then focus on the significantly different proteins between mAWF and iAWF. In our data, many proteins of the “defence response” and “response to abiotic stimulus” categories that accumulated in iAWF lacked a classical signal peptide indicating a potential contamination with other compartments or the stimulation of the unconventional protein secretion pathway (UPS) after infection. The UPS pathway is poorly understood in plants but some connections appeared between this pathway and plant defence responses (Wang *et al.*, 2017). Among accumulated proteins in iAWF we found the annexin AtANN1 that He *et al.* (2021) identified as enriched in apoplastic EVs after *B. cinerea* infection. This result is in favour of the stimulation of the plant UPS pathway such as EVs secretion during infection. Furthermore, we found that 16 % of accumulated proteins in AWF were associated to the vacuole in GO cellular component. Hatsugai *et al.* (2009) showed that during the response of *A. thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* DC3000, the cell membrane is fused to the vacuole membrane which releases in the apoplast vacuolar proteins and metabolites that have antibacterial and cell death inducing activity. Concomitantly, we found a

depletion of the majority of signal peptide-containing proteins of the “defence response” and “response to abiotic stimulus” categories. These results suggest a shift from the predominance of the CPS pathway to UPS pathway in protein secretion to the apoplastic space in response to *B. cinerea*.

The comparison of our proteomic data with previously obtained transcriptomic data in comparable conditions (Soulie *et al.*, 2020) revealed a low overlapping score (Figure S3). Indeed, transcriptional regulation was found for only 14 depleted proteins and 12 accumulated proteins in iAWF (Figure S3). Interestingly, in the category of transcriptionally induced genes coding for accumulated proteins, a strong enrichment of defence-related proteins (58 %) and stress-related proteins (75 %) was found (Figure S3). The weak correlation between transcriptome and proteome can be explained by post-transcriptional or post-translational regulation processes such as mRNA or protein sequestration that are known to be involved in plant immunity (Aerts *et al.*, 2022). However, transcriptional induction of genes coding for proteins that were depleted may be the result of specific degradation by pathogen peptidases. Indeed, pathogen peptidases are known to interfere with plant immunity either by limiting pathogen perception through degradation of antimicrobial proteins or by degrading defence regulators. For example, Chen *et al* (2022) showed that UvPr1a, an *Ustilaginoidea virens* subtilase can degrade OsSGT1, a positive regulator of rice immunity that is transcriptionally induced after infection. They also showed that its deletion in the fungus leads to increased plant resistance. In this work, we found 11 depleted proteins in iAWF that were induced in the transcriptome after infection. Interestingly, two undescribed leucine-rich-repeat (LRR) proteins (At2G34930, At3g12145) and two chitinases (AtCHIC, At4g01700) followed this pattern. Fungal degradation of these proteins to avoid host-induced damages and perception would be beneficial for the fungus. Moreover, the same regulation pattern was found for *AtPNP-A* and its putative receptor *AtPNP-R2* that are involved in repression of SA (Pyo Lee *et al.*, 2020). Since SA-mediated cell death is beneficial for *B. cinerea* infection degradation of these proteins would promote fungal infection.

Initial apoplastic perception of *B. cinerea* by the plant leads to the rapid activation of PTI. This perception relies on the detection of PAMPs or DAMPs by PRR receptors. We were able to detect in the iAWF the accumulation of cellobiose and galacturonate which are elicitors of plant immunity acting as DAMPs leading to plant resistance against *B. cinerea* infection (Figure 3; Davidsson *et al.*, 2017; Zarattini *et al.*, 2021). Following perception, phytohormone production and activation of their corresponding pathways lead to local and systemic defences. Our results showed that the apoplastic concentration of hormones such as SA, JA and ET and their derivatives was strongly affected by the infection. Comparable modifications were observed in AWFs extracts from *A. thaliana* leaves after infection with *Verticillium longisporum* (Floerl *et al.*, 2012). Furthermore, *B. cinerea* is known for its modulation of hormonal plant immunity towards activation of the SA pathway and repression of the JA pathway (AbuQamar *et al.*, 2017). Accordingly, SA was found accumulated in iAWF whereas OPDA, a precursor of JA, was found depleted (Figure 3C, Table 2). Moreover, as discussed above, many evidences of this hormonal plant immunity modulation were found in the apoplast after infection. We can also cite the observed accumulation of AtRNS1 in iAWF which is a positive regulator of SA (Goodman *et al.*, 2022) and the depletion of the metabolite allantoin, derived from the catabolism of purine and involved in the activation of the JA signalling pathway (Figure 3C; Table S1; Takagi *et al.*, 2016). Regarding hormones, we also observed an accumulation of a compound annotated as IAA-Glc which is a conjugated auxin. Auxins are involved in plant growth and other developmental processes and are commonly repressed under biotic stress to promote defence. Aoi *et al* (2020) showed that a UDP glycosyltransferase overexpressing line of *A. thaliana* produces higher levels of IAA-Glc and has an auxin-deficient phenotype suggesting that this conjugate is an inactive form. Thus, this rapid accumulation of IAA-Glc in the apoplast after infection with *B. cinerea* could reflect the growth-defence trade-off and it could be interesting to test the resistance of the UDP-glycosyltransferase OE-lines to *B. cinerea*.



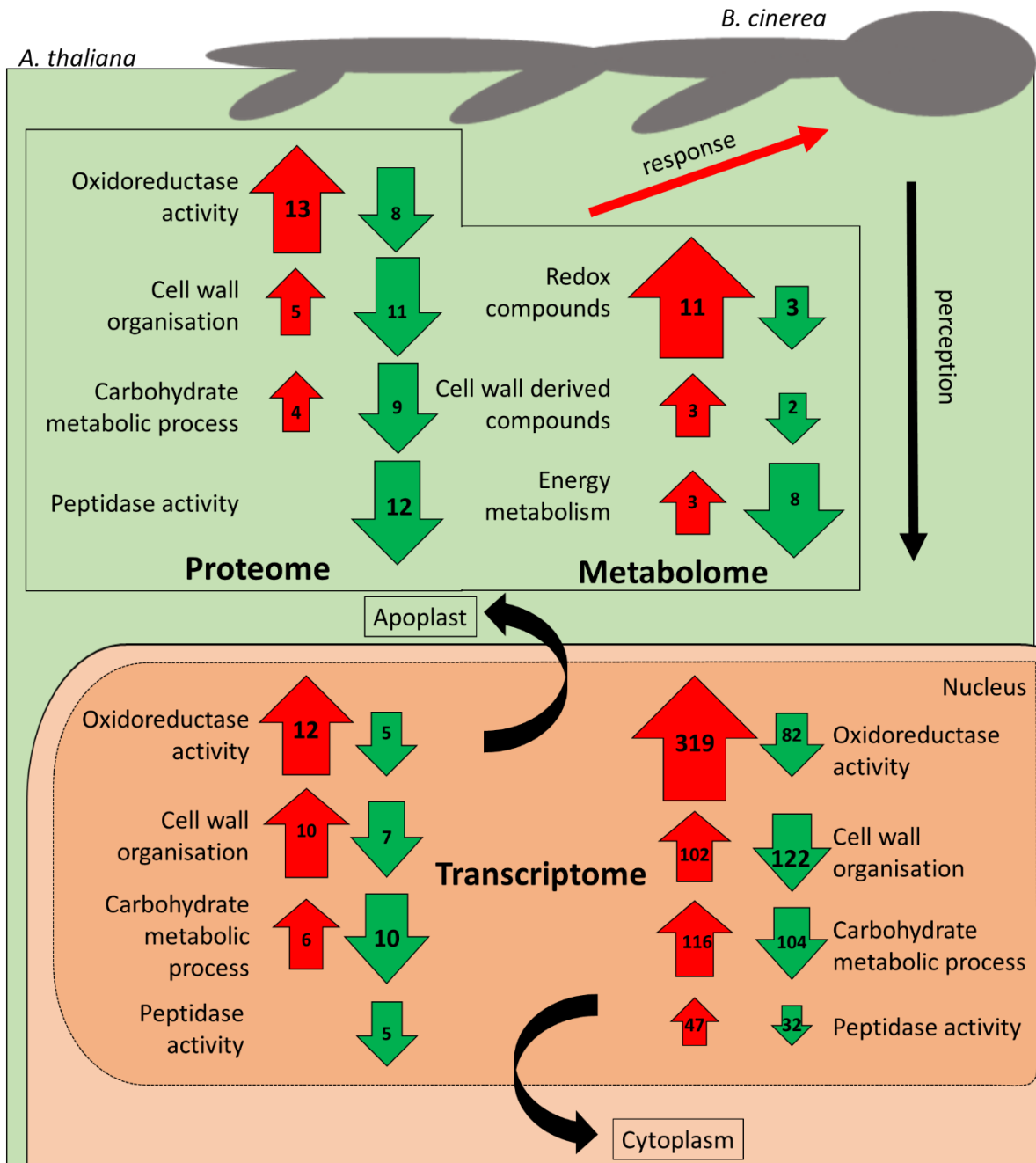
**Figure S3: Overlap between transcriptomic data and AWF proteomic data during the early phase of *A. thaliana*-*B. cinerea* interaction.** (A) Regulation pattern of proteins found in the apoplast at the transcriptomic and proteomic level after 6h of *A. thaliana* leaves infection with *B. cinerea*. Regulation pattern : the dotted line represents transcript level in mock samples and protein accumulation level in mAWF ; the full lines correspond from left to right to transcript level in infected plants and protein accumulation level in iAWF. <sup>(a)</sup>GO term in % represent proteins associated to this GO term over the total number of protein in this line. Asteriks (\*) represent significant enrichment of this GO term in the list of protein of the corresponding category compared to the whole *A. thaliana* genome (FDR p<0.05). (B) List of up regulated genes after infection coding for protein depleted in the apoplast after infection. Transcriptomic data come from Soulié et al (2020). Tr : Transcriptomic analysis, AWF Pr : Proteomic analysis of AWF extracts.

Modifications in SA, JA and ET levels during plant pathogen interactions modulate the defence reaction at several levels, i.e. the expression of defence-related proteins and the production of defence-related compounds (Pieterse *et al.*, 2012). In our apoplast extracts, the specialized metabolites the most accumulated after infection were alkaloids annotated as potentially camalexin and its precursor dehydrocamalexate (Table 2). This compound which derives from the tryptophan derived secondary metabolism is crucial for *A. thaliana* resistance against *B. cinerea* (Ferrari *et al.*, 2003). Regarding proteins, we found that 20 % of our significantly different proteins between mAWF and iAWF were related to defence (Figure S2). Accordingly, the highest fold change of the data set concerned the accumulation of AtDHyPRP1, a defence-related protein induced by SA and JA previously shown to be important for *B. cinerea* resistance (Table S1; Li *et al.*, 2014). Moreover, hormones are not only important for biotic stress response but also for abiotic stress. Interestingly, we observed a great number of significant proteins implicated in abiotic stress response. For example, the previously mentioned ribonuclease AtRNS1 and the AtPDF2.2 proteins are not only related to defence response but also respond respectively to phosphate starvation and water deprivation. It is now well known that abiotic stresses can influence the response of plant to biotic stress (Zarattini *et al.*, 2021). Thus, the apoplastic space might have an important role in these multi-stress interactions.

The activation of plant defense upon perception of *B. cinerea* leads to the reprogramming of several plant biological processes (AbuQamar *et al.*, 2017). In this work, we found that the main processes affected at the proteomic and metabolomic level in the plant apoplast were cell wall organisation or biogenesis, carbohydrate metabolic processes, proteolysis and redox metabolism during the early non-destructive phase of this pathogen (Table 3). To better characterize these changes we searched in transcriptomic data induced and repressed genes coding for proteins related to these processes (Soulie *et al.*, 2020).

We found that following infection, genes and secreted proteins related to cell wall and carbohydrate metabolic processes were mostly repressed with a depletion of metabolites related to energy metabolism (Figure 7). These processes are known to be important for plant growth and development since carbohydrates provide energy and cell wall remodelling is crucial in plant cell morphogenesis but can also contribute to defense. Lloyd *et al.* (2011) showed that ethylene-mediated resistance of *A. thaliana* towards *B. cinerea* implicated cell wall modifications and especially biosynthesis of monolignols, the building blocks of lignin. In our study, the metabolome analysis of iAWF revealed strong modifications of compounds derived from the phenylpropanoid pathway such as the depletion in potential precursors of monolignols. Sinapinate, which was previously shown to be accumulated after an UV-B treatment provoking resistance of the plant to *B. cinerea* (Demkura & Ballaré, 2012) was found depleted in iAWF (Figure 3C; Table 2). This depletion could suggest a potential down regulation of sinapinate synthesis induced by the fungus to prevent plant resistance. Although an important number of cell wall remodelling enzymes were depleted after infection, two of them were strongly accumulated: AtPME17, an important pectin methylesterase that plays a role in resistance against *B. cinerea* (Del Corpo *et al.*, 2020), and AtXTH23 which was never studied in the context of plant pathogen interactions. Altogether, one hypothesis can be that these results reflected the growth-defence trade-off. Additionally, it could mean that only a few related proteins and metabolites are necessary for cell wall mediated defences against *B. cinerea*.

Concerning proteolysis, apoplastic proteases are thought to have an important role in plant pathogen-interactions. On the plant side there are evidences that protease can activate immature proteins, produce endogenous DAMPs and degrade fungal proteins (Wang *et al.*, 2020). Considering that plant peptidases are integral to the immune system, it was surprising to see that whether at the transcriptomic or apoplastic proteomic level the majority of infection-responsive peptidases were repressed upon early infection (Figure 7). We could hypothesis that *B. cinerea* induced the depletion of these proteases to repress resistance and promote infection. However, peptidases can be involved in different processes other than plant defense. For example, AtSBT1.1



**Figure 7:** Schematic representation of the early phase of the interaction between *A. thaliana* and *B. cinerea* regarding key processes and functions at different omic levels.

which was found depleted in iAWF is involved in synthesis of growth-promoting molecules (Srivastava *et al.*, 2008). Thereby its repression also reflects the resource allocation to defense upon pathogen infection.

As regards redox-metabolism, the production of ROS in the apoplast by both the plant and the fungus is one of the earliest events in the interaction between *B. cinerea* and its host. ROS act both as toxic compounds and as signals for plant defence and programmed cell death activation (Lehmann *et al.*, 2015). Interestingly, we showed *in vitro* that iAWFs were able to better induce ROS production in the fungus than mAWF revealing an accumulation of plant ROS inducers in iAWF (Figure 2B). Consistently with a ROS accumulation during infection, we identified modifications on several proteins and metabolites related to redox metabolism in iAWF. Reflecting the shift between redox homeostasis to pathogen induced oxidative stress, we observed in the apoplast an accumulation of antioxidants such as polyols and flavonoids and an induction of proteins with oxidoreductase activity (Figure 7). Moreover, important changes were noted in the apoplastic peroxidase content. Previous studies focusing on the apoplast with different pathogens and/or host plants have observed the same trend (Floerl *et al.*, 2012; Llorens *et al.*, 2021; Rampitsch *et al.*, 2019). Indeed, peroxidases have an important role in plant-pathogen interactions not only through their ROS-scavenging capacities but also because some of them contribute to the plant oxidative burst as it was shown for AtPRX33 and AtPRX34 (Daudi *et al.*, 2012). In our study, in the category of proteins that were transcriptionally induced and accumulated after infection, peroxidases were significantly enriched (25,6 %) thus reflecting their role in apoplastic defences (Figure S3). Floerl *et al.* (2012) found that AtPRX52 was accumulated in the apoplastic space after infection with *V. longisporum* whereas we found with *B. cinerea* a depletion of the same protein. Moreover, AtPRX71 which was found accumulated after infection in our proteome but not in others, was described to be important for plant resistance against *B. cinerea* through ROS production and permeabilization of cuticle (Lorrai *et al.*, 2021). These contradictions might be the result of opposite strategies of biotrophic and necrotrophic pathogens as biotrophs are sensitive to the oxidative burst and necrotrophs benefit from it. Interestingly we found a depletion in the apoplastic pool of the AA and DHA redox couple (Figure 3C). Similar results were observed on the *A. thaliana* entire leaf AA content and on the *S. lycopersicum* mitochondrial pool of AA after infection by *B. cinerea* (Kuźniak & Skłodowska, 2004; Muckenschnabel *et al.*, 2002). However, they didn't observe a depletion of DHA. The leaf ascorbate content as well as its oxidation status was shown to influence the expression of a large array of genes involved in defence and photosynthesis (Kiddle *et al.*, 2003; Noctor, 2006). Mutants impaired in ascorbate synthesis presented a constitutive induction of defences but a reduced growth (Pavet *et al.*, 2005). These mutants were more resistant to *P. syringae* partly as a result of a better plant cell death induction. This effect of *B. cinerea* infection on the AA-DHA apoplastic content could then be a way of activating defence reactions.

Altogether, we showed that at just 6hpi *B. cinerea* triggered a strong depletion of growth and homeostasis-related proteins and metabolites in the apoplast of its host while inducing the accumulation of several specific factors such as peroxidases, cell wall remodelling enzymes and specialized metabolites. The fungus also provoked the deregulation of defence proteins and metabolites, most likely in order to modulate plant immunity to its advantage i.e. promoting SA-mediated plant cell death. The proteins and metabolites Identified in this study were mostly undescribed during the interaction between *B. cinerea* and *A. thaliana*. Thereby, this first multilevel description of the early apoplastic responses to *B. cinerea* revealed potential new plant actors of the interaction that would need further characterization. On the pathogen side, the recovery of a high proportion of fungal proteins implicated in pathogenicity showed that apoplastic studies can be used to identify new important virulence factors. Furthermore, 11 recovered fungal proteins have undescribed role and might be specific actors of the early *B. cinerea* infection phase. Identification and description of new proteins and antifungal metabolites, which are determining factors for plant defence, together with the identification of targetable fungal effectors is of great importance as it

enables the elaboration of new strategies for crop protection against this economically important pathogen



## MATERIALS AND METHODS

### Fungal and plant material

*B. cinerea* strain B05.10 collected from *Vitis* in Germany (Quidde *et al.*, 1998) was used throughout this work as the wild-type (WT) reference strain. *B. cinerea* was routinely cultured on potato dextrose agar (PDA, Difco) for spores collection or on malt agar for infection experiments (MA, 1% malt extract, 1.2% agar) at 23°C under constant light. *A. thaliana* ecotype *Col-0* was obtained from the INRAE-Versailles collection. For all experiments, plants were cultured in growth chambers (65% relative humidity, 8 hr photoperiod, 21°C) for 6 weeks on nonsterile sand and were supplied with a nutrient solution containing 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Soulie *et al.*, 2020).

### Infection experiments

For infection, the fungus was cultured for four days on MA agar. Rosette of 6-week-old *A. thaliana* plants were cut at their base and a mycelial plug (1 cm diameter), taken from the actively growing edge, was inverted onto the upper surface of each mature leaf of the rosette in order to maximize the interacting surface. Rosettes were then kept in large square dishes under high humidity conditions at 23°C and under continuous light.

### Detection of ROS and cell death

For coloration assays, plants were infected as described above and leaves were cut from rosettes 6 hpi or 24 hpi prior to coloration. Mycelial plugs were gently removed from the 6 hpi collected leaves but kept on the 24 hpi ones because of their fragility. Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was achieved by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. Briefly, samples were immersed in an aqueous solution containing 1 mg/mL DAB (pH 3.6, Sigma) and incubated overnight at room temperature on a rotary shaker. To de-stain the leaves, chlorophyll was extracted by incubation in 75% ethanol. To detect cell death, Lactophenol Trypan Blue (TB, Sigma) was performed as described in Chassot *et al* (2008). Pictures were taken on a ZEISS Axio Zoom V16. For oxidative stress revelation after *in vitro* growth of *B. cinerea* on 96-wells plates, the plates were centrifuged for 10 min at 1500 g and the supernatant removed. Then, each well was fill with 300µL of the same above-mentioned DAB solution. Pictures of the plates were taken after 4 h incubation with DAB.

### Apoplastic Washing Fluid (AWF) extraction

Apoplastic Washing Fluid (AWF) extraction was performed with the infiltration-centrifugation method as described in O'Leary *et al* (2014). At 6 hpi, leaves were cut from rosette and mycelial plugs were removed. After a brief wash in ddH<sub>2</sub>O (double distilled water), leaves were immersed in the infiltrating solution containing either ddH<sub>2</sub>O for metabolomic analysis and nephelometry or 0.3 M Mannitol with 0.2 M CaCl<sub>2</sub> pH 6.9 for proteome analysis as described in Boudart *et al* (2005). Infiltration was performed in vacuum pump. Several pressure cycles of -25 Pa were applied until all the leaves were infiltrated. The infiltrated leaves were then gently dried with paper and inserted into a 20mL syringe. The syringe is then placed inside a 50 mL conical tube. Collection of AWF samples was achieved by centrifugation of the syringe placed in a conical tube at 1000g for 20 min at 4°C. The resulting AWF was centrifuged again for 5 min at 15000 g at 4°C to remove cellular debris, the recovered supernatant collected corresponded to the final extract. The protein content of each extract was then measured by the Bradford method using BSA as standard. AWF extracts were assayed for malate dehydrogenase (MDH) activity in order to detect cytoplasmic contaminations. MDH was assayed at room temperature as followed: 20µL of extracts were added to reaction mixture containing a buffer (HEPES 100mM pH7), 10 % glycerol, 150 µM NADH and 2 mM oxaloacetate. The oxidation of NADH was followed at 340<sub>nm</sub>. The AWF dilution factor was also

assayed for ddH<sub>2</sub>O infiltrated extract as described in O’Leary *et al* (2014). In each conditions some leaves were infiltrated with 50 μM indigo carmine (IC) in ddH<sub>2</sub>O and the absorbance at 610 nm (OD<sub>610</sub>) of the resulting AWF extracts was measured and compared to control conditions in order to calculate the dilution factor:  $(OD_{610\text{ IC AWF}} - OD_{610\text{ IC}}) / ((OD_{610\text{ IC AWF}} - OD_{610\text{ IC}}) - (OD_{610\text{ H}_2\text{O AWF}} - OD_{610\text{ H}_2\text{O}}))$ .

### **Test for antifungal effect of ddH<sub>2</sub>O AWF extracts.**

Growth rates were measured by using a nephelometer with the procedure developed by Joubert *et al* (2010). For inoculum preparation, conidia were collected from 8-day-old on solid medium cultures and suspended in Potato Dextrose Broth (PDB) to obtain a concentration of 10<sup>4</sup> conidia/mL. For each condition, three wells of a 96 wells-microplate were filled with 300 μL of suspension, supplemented with 30μL of ddH<sub>2</sub>O AWF extracts. Four different AWF extracts from different extractions were tested. Growth was automatically recorded each 15 minutes during 48h (193 cycles) using a nephelometric reader (NEPHELOstar Plus, BMG Labtech, Omega 5.70), equipped with a 635-nm laser as radiation source. Measurements were done with a laser beam focus of 2.5 mm and an intensity of 80%. The 96-well plates were shaken at 400 rpm, with a double orbital movement between readings. Data were exported from NephelOstar Plus software in ASCII format and further processed in Microsoft Excel. For each condition and each timepoint, a Relative Nephelometric Unit (RNU) value was calculated as the mean of the eight measurements. For each condition, the slope was calculated during the exponential phase using measurements between 20 hpi and 48 hpi to estimate the growth rate. The experiment was done three times.

### **AWF primary metabolites content analysis**

Metabolomic analysis of primary metabolites with GC-MS was performed as described previously (Fiehn, 2006; Fiehn *et al.*, 2008; Oliver Fiehn, 2017). For the extraction, 50 μL of AWF were diluted with 100 μl of frozen (-20°C) water:acetonitrile:isopropanol (2:3:3) containing ribitol at 4 μg/ml and extracted for 10 min at 4°C with shaking at 1400 rpm in an Eppendorf Thermomixer. Insoluble material was removed by centrifugation at 20000g for 5 min. A Blank tube underwent the same steps as the samples. Supernatant was dried overnight at 35 °C in a Speed-Vac vacuum centrifuge. For derivatization, 10 μl of 20 mg/ml methoxyamine in pyridine were added to the samples and the reaction was performed for 90 min at 28°C under continuous shaking in an Eppendorf thermomixer. 90μl of N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) (Aldrich 394866-10x1ml) were then added and the reaction continued for 30 min at 38°C. After cooling, 45 μl were transferred to an Agilent vial for injection. Injections started 4 hours after the end of derivatization. The whole serie was first injected in splitless mode and then in split mode (1/30). Four different standards mix were injected at the beginning and the end of the analysis as well as three independent derivatizations of the quality control (beginning, middle and end) for monitoring the derivatization stability. Samples were randomized. An alkane mix (C10, C12, C15, C19, C22, C28, C32, C36) was injected in the middle of the queue for external RI calibration. Injection volume was 1 μl. The instrument was an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to an Agilent 5975C mass spectrometer. The column was a Rxi-5SilMS from Restek (30 m with 10 m integraguard column). The liner (Restek # 20994) was changed before each derivatization series. Oven temperature ramp was 70 °C for 7 min then 10 °C/min to 330 °C for 5 min (run length 38 min). Helium constant flow was 0.7 mL/min. Temperatures were the following: injector: 250°C, transfer line: 290°C, source: 250 °C and quadripole 150 °C. 5 scans per second were acquired spanning a 50 to 600 Da range. Instrument was tuned with PFTBA with the 69 m/z and 219 m/z of equal intensities. 5 scans per second were acquired. The split mode conditions were: 70°C for 2 min then 30°C per min to 330 °C for 5 min. Helium constant flow 1 mL/min.

For data processing, Raw Agilent datafiles were converted in NetCDF format and analyzed with AMDIS <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>. An home retention indices/ mass spectra library built from the NIST, Golm, <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/> and Fiehn databases and standard compounds was used for metabolites identification. Peak areas were also determined with the Targetlynx software (Waters) after conversion of the NetCDF file in masslynx format as well as TargetSearch. AMDIS, Target Lynx and TargetSearch in splitless and split 30 modes data were compiled in one single Excel File for comparison. After blank mean subtraction peak areas were normalized to Ribitol and Fresh Weight. For absolute quantification, a response coefficient was determined for 4 ng each of a set of 103 metabolites, respectively to the same amount of ribitol. This factor was used to give an estimation of the absolute concentration of the metabolite in what we may call a “one-point calibration”. Metabolites rich in nitrogen (basic aminoacids and polyamines) gave several analytes (up to 5 for glutamine and asparagine). The peak area as TIC equivalent of these analytes were summed to express the contents of these metabolites.

### **AWF specialized metabolites content analysis**

Concerning the Specialized metabolite, we performed a UPLC-MS/MS analysis. Data were acquired using a UHPLC system (Ultimate 3000 Thermo) coupled to quadrupole time of flight mass spectrometer (Q-ToF Impact II Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A Nucleoshell RP 18 plus reversed-phase column (2 x 100 mm, 2.7  $\mu$ m; Macherey-Nagel) was used for chromatographic separation. The mobile phases used for the chromatographic separation were (A) 0.1% formic acid in H<sub>2</sub>O and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile. The flow rate was of 400  $\mu$ L/min and the following gradient was used: 95% of A for 1-min, followed by a linear gradient from 95% A to 80% A from 1 to 3-min, then a linear gradient from 80% A to 75% A from 3 to 8-min, a linear gradient from 75% A to 40% A from 8 to 20-min. 0% of A was hold until 24-min, followed by a linear gradient from 0% A to 95% A from 24 to 27-min. Finally, the column was washed by 30% A at for 3.5min then re-equilibrated for 3.5-min (35-min total run time). Data-dependent acquisition (DDA) methods were used for mass spectrometer data in positive and negative ESI modes using the following parameters: capillary voltage, 4.5kV; nebuliser gas flow, 2.1 bar; dry gas flow, 6 L/min; drying gas in the heated electrospray source temperature, 140°C. Samples were analysed at 8Hz with a mass range of 100 to 1500 m/z. Stepping acquisition parameters were created to improve the fragmentation profile with a collision RF from 200 to 700 Vpp, a transfer time from 20 to 70  $\mu$ s and collision energy from 20 to 40 eV. Each cycle included a MS fullscan and 5 MS/MS CID on the 5 main ions of the previous MS spectrum.

For data processing, the .d data files (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) were converted to .mzXML format using the MSConvert software (ProteoWizard package 3.0, Chambers *et al.*, 2012). mzXML data processing, mass detection, chromatogram building, deconvolution, samples alignment, and data export, were performed using MZmine 2.52 software (<http://mzmine.github.io/>) for both positive and negative data files. The ADAP chromatogram builder (Myers *et al.*, 2017) method was used with a minimum group size of scan 3, a group intensity threshold of 1000, a minimum highest intensity of 1500 and m/z tolerance of 10 ppm. Deconvolution was performed with the ADAP wavelets algorithm using the following setting: S/N threshold 8, peak duration range = 0.01-1 min RT wavelet range 0.02-0.2 min, MS2 scan were paired using a m/z tolerance range of 0.01 Da and RT tolerance of 0.1 min. Then, isotopic peak grouper algorithm was used with a m/z tolerance of 10 ppm and RT tolerance of 0.1. All the peaks were filtered using feature list row filter keeping only peaks with MS2 scan. The alignment of samples was performed using the join aligner with an m/z tolerance of 10 ppm, a weight for m/z and RT at 1, a retention time tolerance of 0.1 min. A first research in library with Mzmine was done with identification module and “custom database search” to begin the annotation with our library, currently containing 78 annotations (RT and m/z) in positive mode and 38 in negative mode, with RT tolerance of 0.3 min and m/z tolerance of 0.0025 Da or 6 ppm.

Metabolites annotation of the total dataset was performed in two consecutive steps. First, the obtained RT and m/z data of each feature were compared with our home-made library containing more than 150 standards or experimental common features (RT, m/z). Second, the ESI- and ESI+ metabolomic data used for molecular network analyses were searched against the available MS2 spectral libraries (Massbank NA, GNPS Public Spectral Library, NIST14 Tandem, NIH Natural Product and MS-Dial), with absolute m/z tolerance of 0.02, 4 minimum matched peaks and minimal cosine score of 0.65. Then, for selected interesting metabolites presented in Table 2, Sirius software (<https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/>) was used. Sirius is based on machine learning techniques that used available chemical structures and MS/MS data from chemical databanks to propose structures of unknown compounds (Dührkop *et al.*, 2015, 2019; Kim *et al.*, 2021).

### **Proteome analysis of AWF extracts**

The LC-MS/MS analyses have been done at the PAPPSO proteomics platform ([pappso.inra.fr/](http://pappso.inra.fr/)). Following short 1D protein electrophoresis, in-gel digestion was performed using standard in gel digestion as describe in Recorbet *et al.*, 2021. After drying, sample were reconstituted in 30  $\mu$ l of 2% ACN 0.1 Formic acid in water. Sample were dilute to 50 ng per  $\mu$ l of peptide. Sample were analyzed using a nanoElute (Bruker, Billerika USA) coupled to timsTOF Pro (Bruker). 2  $\mu$ l of sample were loaded on a nanoseparation Biosphere C18 Column, (120 Å, 3  $\mu$ m, 75  $\mu$ m X 300 mm, Waters) with 0.1% HCOOH (v/v) in water for 1 min at 300 bar. Peptides were further separated. The mobile phase consisted of a gradient of solvents A: 0.1% HCOOH (v/v), in water and B: 100% ACN (v/v), 0.1% HCOOH (v/v) in water. Separation was set at a flow rate of 0.3  $\mu$ l/min using a linear gradient of solvent B from 5 to 35% in 36 min, followed by an increase to 90% in 2 min, 90% in 2 min and finally to 90% for 9 min. Nebulization was performed using a Captive spray interface at 1.6 kV applied on liquid junction. The timsTOF Pro acquisition have been realized with timsControl (version 3.0.21) with the following settings: Mass Range 100 to 1700 m/z, 1/K0 Start 0.7 V  $\cdot$ s/cm<sup>2</sup> End 1.35 V  $\cdot$ s/cm<sup>2</sup>, Ramp time 166.0 ms, Lock Duty Cycle to 100%, Dry Gas 3 l/min, Dry Temp 180°C in PASEF. PASEF settings: 10 MS/MS scans (total cycle time 1.17 sec), charge range 2-5, active exclusion for 0.4 min, Scheduling Target intensity 20000, Intensity threshold 2500 and CID collision energy from 20 to 59 eV. Database search was performed against araport 11 ([https://www.arabidopsis.org/download/indexauto.jsp?dir=%2Fdownload\\_files%2FProteins%2FAraport11\\_protein\\_lists](https://www.arabidopsis.org/download/indexauto.jsp?dir=%2Fdownload_files%2FProteins%2FAraport11_protein_lists)), *Botrytis cinerea* database ([https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=\(taxonomy\\_id:999810\)](https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=(taxonomy_id:999810))) 16338 entries) and a custom contaminant database using X!Tandem (Craig *et al.*, 2004), see Table S2 for details. Data filtering and protein inference was perform using i2masschroq (Langella *et al.*, 2017). A protein was considered valid with a an Evalue inferior to 0.00001 and composed by two distinct peptides with an Evalue inferior of 0.01, those filters resulting to a fdr of 0.15 at psm Levels, 0.31 at peptide levels and 0.0 at protein levels. Protein quantification was perform using masschroq (Valot *et al.*, 2011) as described in Balliau *et al.*, 2018.

### **Statistical analysis**

Apoplatic extracts were obtained with at least four biological replicates whereas other experiments were conducts at least 3 times. Statistical analysis was performed with Excel or directly with the Metaboanalyst online software for omic data using a p-value threshold of  $p < 0.05$ . After a  $\log_{10}$  transformation of the omic data sets, paired t-test were done in order to compare mock and infected apoplatic extracts of each biological replicate.

**Table S2: Identification parameter for protein identification from *A. thaliana* and *B. cinerea* protein databases.**

### Protein identification

#### Xtandem Run information

param	value
version	X! Tandem Piledriver (2015.04.01.1)
sequence source #1	Araport11_genes.201606.pep.fasta
sequence source #2	contaminants_standarts.fasta
sequence source #3	uniprotKB_B_cinerea_220329.fasta

#### Spectra filtering

param	value	
11	parent monoisotopic mass error minus	20
12	parent monoisotopic mass error plus	20
13	parent monoisotopic mass error units	ppm
14	parent monoisotopic mass isotope error	yes
5	maximum parent charge	5
2	fragment mass type	monoisotopic
3	fragment monoisotopic mass error	0.02
4	fragment monoisotopic mass error units	Daltons
20	total peaks	100
9	neutral loss mass	18.01057
10	neutral loss window	0.02
1	dynamic range	100.0
6	minimum fragment mz	150.0
7	minimum parent m+h	500.0
8	minimum peaks	15
16	mzFormat	16
17	timstof MS2 filters	chargeDeconvolution 0.02dalton mzExclusion 0.01dalton

#### Enzymatic cleavage

param	value	
6	cleavage site	[RK]  {P}
5	cleavage semi	no
8	quick acetyl	yes
9	quick pyroliidone	yes
10	stP bias	yes

**Table S2:** following.

- Quick acetyl : search of acetylation (+42.010565) N-terminal with or without excision of N-terminal methionine
- Quick pyrolidone : search N-terminal glutamine and glutamic acid cyclisation resulting to a loss of 17.026549 on Q and 18.010565 on E. Include also the search of cyclisation of N-terminal carbamidomethylation cystein with loss of 17.026549

**Amino acid modification**

	param	value
1	C-terminal residue modification mass	0.0
2	N-terminal residue modification mass	0.0
3	cleavage C-terminal mass change	+17.00305
4	cleavage N-terminal mass change	+1.00794
5	cleavage semi	no
6	cleavage site	[RK]{}{P}
8	quick acetyl	yes
9	quick pyrolidone	yes
10	stP bias	yes
11	taxon	usedefined

**Refinement module**

	param	value
1	use refine	yes
3	maximum valid expectation value	0.01
4	modification mass	57.02146@C
9	potential modification mass	15.99491@M, 15.99491@W, 0.98402@N, 0.98402@Q
2	cleavage semi	yes
15	use potential modifications for full refinement	yes
14	unanticipated cleavage	no
6	point mutations	no
13	spectrum synthesis	yes

**Scoring**

	param	value
7	minimum ion count	4
6	maximum missed cleavage sites	1
4	cyclic permutation	yes
5	include reverse	yes
2	b ions	yes
9	y ions	yes

## ACKNOWLEDGMENTS

Proteomics analyses were performed on the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr>) which is supported by INRAE (<http://www.inrae.fr>), the Ile-de-France regional council (<https://www.iledefrance.fr/education-recherche>), IBiSA (<https://www.ibisa.net>) and CNRS (<http://www.cnrs.fr>). A.D was supported by a doctoral fellowship. This work benefited from the support of IJPB's Plant Observatory technological platforms. IJPB received support from Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). This work was supported by INRAE-BAP (BcEqolisin).





## Chapitre II: La pectine lyase *BcPNL1* de *Botrytis cinerea* est impliquée dans la pathogénicité et son activité pectinolytique contribue à l'impact de la nutrition azotée de l'hôte sur la sévérité de la maladie

---

Dans ce chapitre je me suis intéressé à la digestion de la paroi végétale lors de la phase initiale de l'infection par *B. cinerea* et plus précisément au rôle de la pectine lyase 1 du champignon, BcPNL1. Ce travail s'appuie sur une collaboration de l'équipe avec Aline Voxeur et Samantha Vernhettes, initiée lors d'un précédent travail (Voxeur *et al.*, 2019). Ce travail a fait la première description précise des OGs produits *in planta* lors de l'interaction entre *A. thaliana* et *B. cinerea*. Cela a permis de mettre en évidence qu'une grande majorité des OGs produits sont issus d'une dégradation par les pectines lyases et que ceux-ci sont impliqués dans la régulation des défenses de la plante hôte. Notre caractérisation fonctionnelle de *BcPNL1* a confirmé son rôle dans la production de ces OGs et a révélé son importance dans la pathogénicité du champignon non seulement sur *A. thaliana* mais également sur la tomate. Enfin une étude comparative de l'infection de plantes cultivées à forte ou à faible concentration en nitrate a révélé une corrélation entre l'activité des pectinases du champignon et la sensibilité de la plante. Cette étude s'appuie également sur des résultats précédemment obtenus par mon équipe montrant lors de l'infection que la nutrition azotée de la plante influence l'expression de gènes du champignon codant des pectinases (Soulié *et al.*, 2020).

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous format d'article comme pour le chapitre I. Néanmoins, la soumission de cet article nécessitera l'ajout de résultats d'une dernière analyse des OGs produits au cours du temps lors de l'infection. Celle-ci permettra d'identifier des produits plus précoces de dégradation de la pectine afin de confirmer nos hypothèses.

# **The *Botrytis cinerea* pectin lyase *BcPNL1* is involved in pathogenicity and its pectinolytic activity contributes to the impact of host nitrogen nutrition on disease severity**

Antoine Davière<sup>ab\*</sup>, Aline Voxeur<sup>a\*</sup>, Sylvie Jolivet<sup>a</sup>, Samantha Vernhettes<sup>a</sup>, Marie-Christine Soulié<sup>a,c,\*</sup> and Mathilde Fagard<sup>a,\*1</sup>

<sup>a</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), 78000, Versailles, France

<sup>b</sup>Ecole Doctorale 567 Sciences du Végétal, Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, bat 360, 91405 Orsay Cedex, France

<sup>c</sup>Sorbonne Universités, Pierre et Marie Curie Université Paris 06, UFR 927, 75005 Paris, France

**\* These authors contributed equally to this study**

**<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed, Email : [mathilde.fagard@inrae.fr](mailto:mathilde.fagard@inrae.fr).**

Keyword : *Botrytis cinerea*, *Arabidopsis thaliana*, pectin lyase, nitrogen, virulence, oligogalacturonides

## ABSTRACT

Host nitrogen nutrition is known to impact the expression of plant defense genes but also pathogen virulence factors. In this study we found that pectinolytic enzymes of *Botrytis cinerea* are strongly affected by plant nitrate nutrition during infection of *Arabidopsis thaliana* at the transcriptional level leading to changes in the final oligogalacturonide (OG) production. Among pectinases, several studies focused on the role of the abundant polygalacturonases in virulence. However, pectin lyases (PNLs) of *B. cinerea* have never been extensively studied. These enzymes are responsible for pectin depolymerization through transesterification and, contrary to polygalacturonases, they can degrade pectin without prior reaction with esterases. We report here the importance of *BcPNL1*, member of the multigenic PNL family of *B. cinerea*, in pathogenesis and OG production during the infectious process. Indeed, CRISPR-Cas9  $\Delta Bc pnl1$  deletion mutants were hypovirulent on several hosts plants and the absence of PNL products found by LC-MS/MS analysis of OGs produced during the interaction confirmed that *BcPNL1* is the major PNL of *B. cinerea*. Furthermore, during infection with the  $\Delta Bc pnl1$  mutants, negative regulators of the jasmonate (JA) defence pathway such as *AtJOX3* and *AtJAZs* were down regulated whereas the JA marker gene *AtPDF1.2* was strongly induced. These results confirmed a previously mentioned role of OGs produced by PNL in repression of the JA pathway. We also revealed that varying nitrogen nutrition status of the plant have a different impact on defense gene expression during infection with the  $\Delta Bc pnl1$  mutant. Altogether, we provide evidences that plant cell wall degradation and particularly BcPNL1 activity are important factors contributing to the complex interaction between host nitrogen nutrition and pathogenesis.

## INTRODUCTION

The Ascomycete *Botrytis cinerea* is a widely spread necrotrophic fungus responsible for the grey mold disease on more than 1000 plant species (Fillinger & Elad, 2015). As a necrotrophic pathogen, its infectious process relies on several synergistic molecular mechanisms involving the secretion of a large arsenal of molecules. Cell wall degrading enzymes, toxins, reactive oxygen species, peptidases and acidifying compounds have been reported to play a role in virulence (Cheung *et al.*, 2020). Thanks to the sequenced genome (Amselem *et al.* in 2011), genetic studies and the identification of putative virulence factors were strongly facilitated. However, the high degree of functional redundancy and compensation phenomena in this fungus has made it difficult to identify the role of individual *B. cinerea* genes in virulence. Consequently, only a few genes of *B. cinerea* have been described as having a major role in virulence. Among them, some transcription factors and kinases have been found such as sucrose non-fermenting protein kinase 1 BcSNF1 and the pH regulator BcPACC (Lengyel *et al.*, 2022; Rasclé *et al.*, 2018). Moreover, chitin synthases like Bcchs3a are also important virulence factors conditioning fungal adhesion to the host and plant defence activation (Arbelet *et al.*, 2010). Among described secreted factors, the botrydial and botcinic acid toxins gene clusters (*BcBOT2*, *BcBOA6*) and several cell death inducing proteins such as BcXIG1 and BcCRH1 have an important role in pathogenicity (Bi *et al.*, 2021; Dalmais *et al.*, 2011; Kars, Krooshof, *et al.*, 2005; Ten Have *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2017).

Interestingly, the polygalacturonases 1 (BcPG1) and 2 (BcPG2) involved in pectin degradation are also important virulence factors. In the *B. cinerea* early secretome, they represent together 20% of the total protein content (Espino *et al.*, 2010). They enable pathogens to penetrate and spread in the host tissues by degrading one of the major components of the plant cell wall barrier: the pectins. Pectins are composed of homogalacturonan (HGA) and rhamnogalacturonan I and II (RGI and RGII). Homogalacturonan, which represents the backbone of the pectin molecule, is composed of  $\beta$ -1,4-linked residues of D-galacturonic acid (GalA), which can be methyl (Me)- and/or acetyl-esterified (Ac). Upon plant/pathogen interaction, pectins are degraded by enzymes called pectinases. This family regroups two major types of enzymes able to degrade the pectin molecule: esterases, which include pectin methylesterases (PME) and pectin acetylerases (PAE), and depolymerases, which are clustered into the two following groups: hydrolases with polygalacturonases (Endo-PGs and Exo-PGs) and lyases with pectate lyases (Endo-PLs and Exo-PLs) which degrade low and non-methylesterified pectin and pectin lyases (PNLs) which uses  $\beta$ -elimination to degrade highly methylesterified pectin (Yadav *et al.*, 2009). These pectinases are finely regulated at different levels. For example, PMEs can be inhibited by pectin methylesterase inhibitors (PMEI) and PGs by polygalacturonase inhibiting proteins (PGIP). Altogether, these enzymes contribute to oligogalacturonide (OG) production with various degrees of polymerization (DP) and methyl-acetylerification and to their further degradation into monomers. Analysis of cell wall degradation during infection with *B. cinerea* revealed that PNLs are majors OG producing pectinases of this fungus during early infection during tomato fruit (An *et al.*, 2005) and *A. thaliana* leaf infection by *B. cinerea* (Voxeur *et al.*, 2019). These produced OGs can then be processed by fungal PMEs and PGs into shorter OGs and subsequently in monomers, supporting growth and development.

Plants perceive those OGs as signal of damaged or modified self, enabling them to act as DAMPS in PAMP/DAMP-triggered immunity (PTI) (Pontiggia *et al.*, 2020). This signalling pathway will lead to several modifications of the plant cells with accumulation of defence proteins and the production of hormones increasing the defence reaction. The first reports of OG activity demonstrate that long DPs (10-15) OGs are defence elicitor and can trigger phytoalexin production (Ferrari *et al.*, 2007; Hahn *et al.*, 1981). More recently, Davidsson *et al.* in 2017 showed that short OGs (DP3) can trigger hormonal immunity mediated by jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) as efficiently as longer OGs. Their eliciting properties efficiently protected *Arabidopsis thaliana* from *Pectobacterium carotovorum* infection. Nevertheless, OG signalling is a complex mechanism that can be deleterious to the plant as it can shift the balance of the growth-defence trade-off and

cause hyperimmunity (Pontiggia *et al.*, 2020). It was shown that OG oxidases (OGOx) are able to inactivate OG induced defence thus limiting excessive plant cell death and infection upon *Botrytis cinerea* infection (Benedetti *et al.*, 2018). Furthermore, a recent work of this team revealed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced upon OG oxidation mediate activation of other defence processes, such as lignification or inactivation of auxins, through the action of class III plant peroxidases (Scortica *et al.*, 2022). Last, we recently showed that *B. cinerea* can evade OG signaling by employing BcPNLs thus producing methylesterified OG of long DP able to suppress JA-mediated defence activation (Voxeur *et al.*, 2019). By contrast, the subsequent degradation of these OGs by PME and PGs lead to the production of GalA4MeAc-H<sub>2</sub>O which is able to highly elicit JA-related plant defense.

Defence and virulence capacities are strongly modulated by the environmental conditions during the interaction. Indeed, the environment may vary the expression not only of plant defence genes but also of pathogen virulence factors (Zarattini, Farjad, *et al.*, 2021). Plant nitrogen fertilization is known to affect plant pathogen interaction in many pathosystems (Fagard *et al.*, 2014). Increasing nitrogen supply can either reduce disease severity as is the case with the rice blast fungus affecting maize (Long *et al.*, 2000) or increase disease severity during *B. cinerea* infection of grapevine, strawberries and the model plant *A. thaliana* (Fagard *et al.*, 2014; Soulie *et al.*, 2020). In a previous study we identified that the expression of several *A. thaliana* and *B. cinerea* genes were affected by plant nitrogen nutrition (Soulie *et al.*, 2020). Here, we hypothesized that nitrogen nutrition might as well affect pectinolytic capacities of the fungus and the subsequent release and signalling of OGs.

In this work, we were able to demonstrate that nitrogen nutrition impacts expression of the main fungal pectinase genes such as *BcPNL1* and *BcPG1* and the OG production that involves PNLs and other pectinases such as PGs and PMEs. We characterize the role of *BcPNL1* in virulence by mutant analysis. We confirmed a role of PNLs in suppression of JA-mediated defence activation. Additionally, we observed that the compensation mechanism triggered in  $\Delta Bc pnl1$  mutants depends on nitrate nutrition of the host. Altogether, we first revealed that the pectin lyases *BcPNL1* have an important role in virulence by promoting fungal growth and infection through pectin degradation and manipulation of plant immunity. Secondly, we provided evidence that pectin degradation processes during infection are part of the factors connecting disease susceptibility to nitrogen fertilization in the *B. cinerea* - *A. thaliana* pathosystem.

## RESULTS

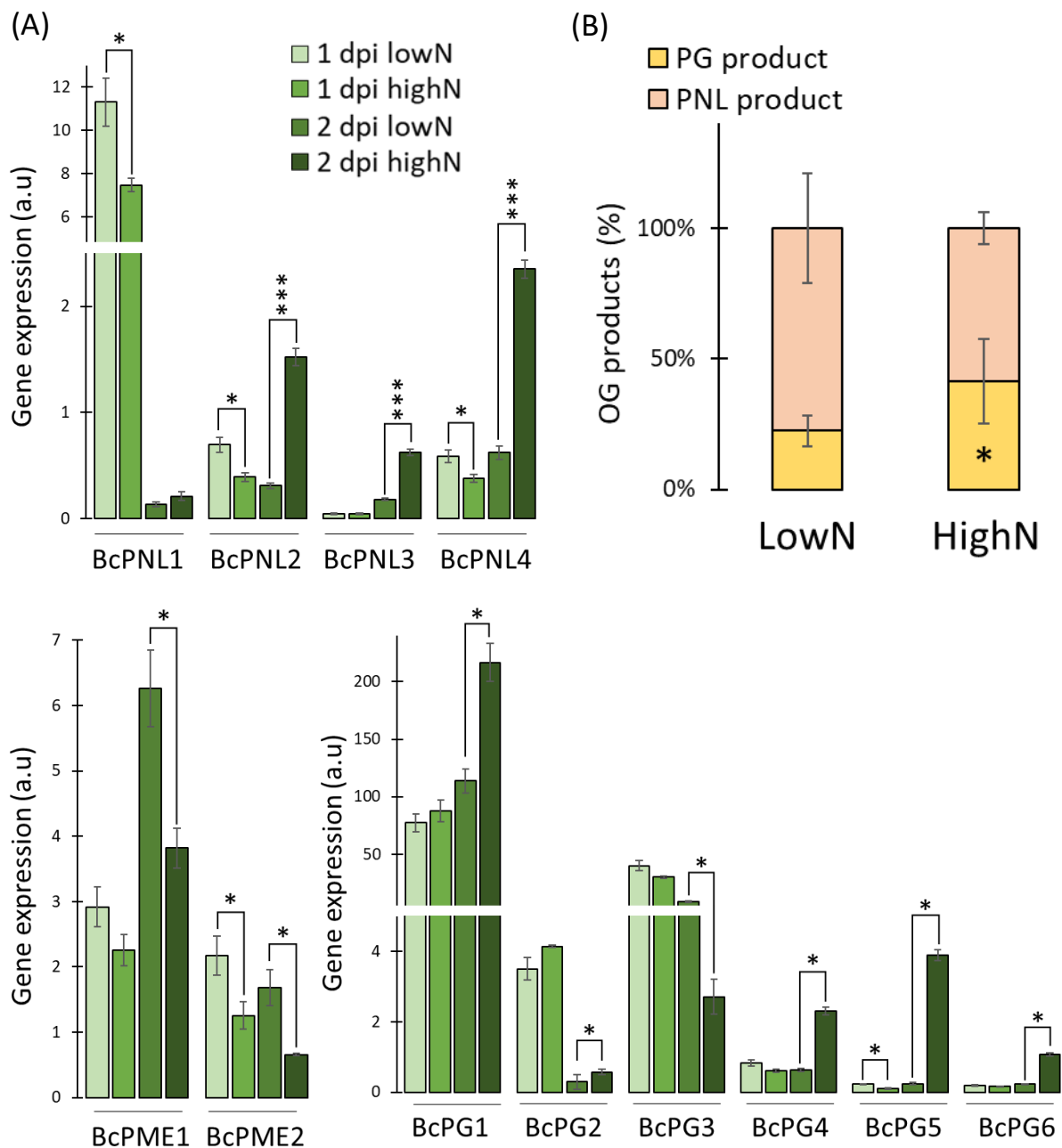
### Impact of plant nitrogen nutrition on pectinolytic capacities of *B. cinerea*

*B. cinerea* pectinases like PGs, PME<sub>s</sub> and PNL<sub>s</sub> are known to be important for cell wall degradation and successful host penetration. Thereby we analysed if host nitrogen nutrition, which modulates plant resistance and pathogen virulence, can have an impact on *B. cinerea* pectinase gene expression. As shown in Figure 1A, at 1 dpi *BcPNL1* is the most expressed gene of the *BcPNL* gene family and its expression is decreased at high concentration of nitrate (high N). At this early time point *BcPNL2,4*, *BcPME2* and *BcPG5* expression levels were also lower at high N. At 2 dpi *BcPNL2,3,4* (Bcin03g00280, Bcin08g03820, Bcin03g07360) and *BcPG1,2,4,5,6* were up regulated when *B. cinerea* infect plants grown on high nitrate supply compared to low nitrate (low N) whereas it is the opposite for *BcPME1,2* and *BcPG3*. It is also interesting to note that at 2 dpi the expression of *BcPG1* is clearly higher than the expression of the other members and it is even higher at high N. *BcPNL5* (Bcin12g05620), the last member of the PNL family of *B. cinerea* (Figure S1) was not expressed in all condition tested (data not shown). Finally, nitrate nutrition of the plant host causes a global change in expression of *B. cinerea* pectinase genes that is more pronounced at 2 dpi when symptoms arisen.

Then, we searched if differences of pectinase activities modulated by nitrogen nutrition could also lead to variations in OG production. For that purpose, we incubated plant leaves in liquid media containing spores of the fungus for 18h, then we analysed the cell wall breakdown products released in the media by LC-MS/MS as described in Voxeur *et al* (2019). Interestingly we found respectively a higher quantity of PG products at high N compared to low N leading to a lower proportion of PNL products (Figure 1B). Furthermore, this difference in OG production cannot be explained by endogenous differences of walls from plants grown on high N or low N since almost no differences were found in the PG enzymatic fingerprint of the mock plant cell walls (Figure S2).

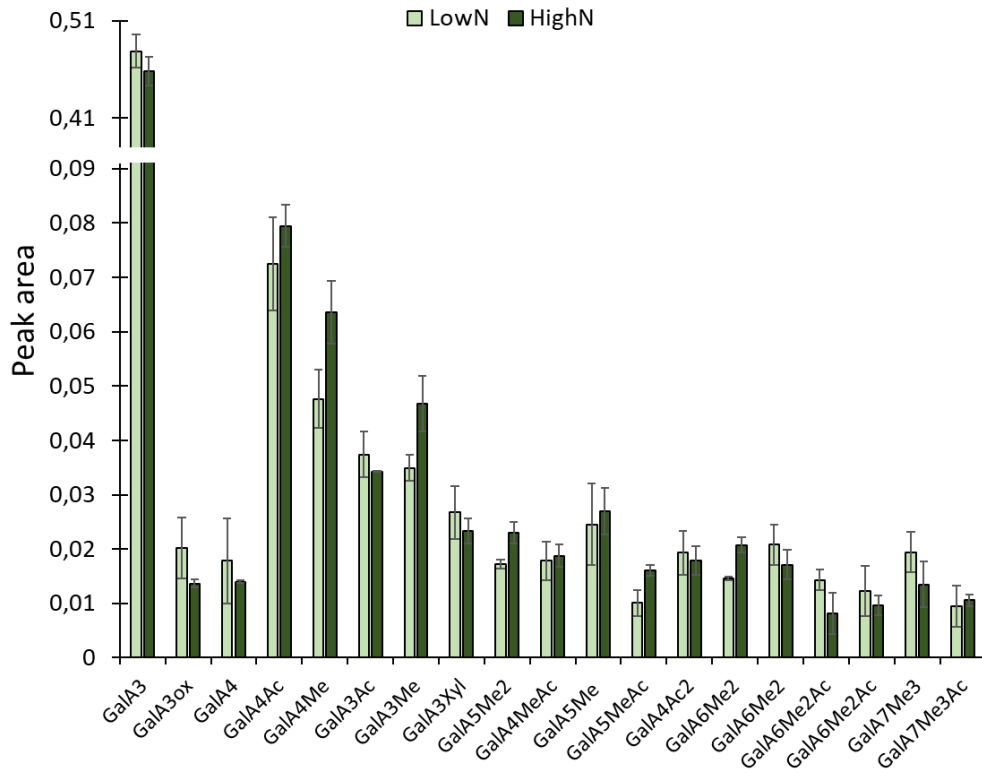
Altogether these results confirmed that host-nitrogen supply impact degradation of the pectin part of the plant cell wall during *B. cinerea* infection by favouring BcPGs activity at high N.





**Figure 1: Impact of host nitrate nutrition on *B. cinerea* pectinolytic capacities.** (A) Expression analysis of the fungal *BcPG*, *BcPME* and *BcPNL* pectinases families during infection of *A. thaliana* plants cultivated either with 0.5 mM nitrate (LowN) or 10 mM nitrate (HighN) with the WT strain B05.10. Each gene target was normalized with *BcActA*. Similar results were obtained when normalization was done with *BcUBI*. Data are expressed as mean normalized expression in arbitrary units (a.u.) and are the means of triplicates ( $\pm SD$ ). Two sample t-test was conducted between conditions: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005. (B) LC-MS/MS quantitative analysis of OG production after 18 h of liquid infection with the WT strain of *A. thaliana* plants cultivated at LowN or HighN. Fisher's LSD test was conducted between Low N and High N conditions: \*p<0.5. Three (A) and two (B) independent experiments were obtained with similar results.

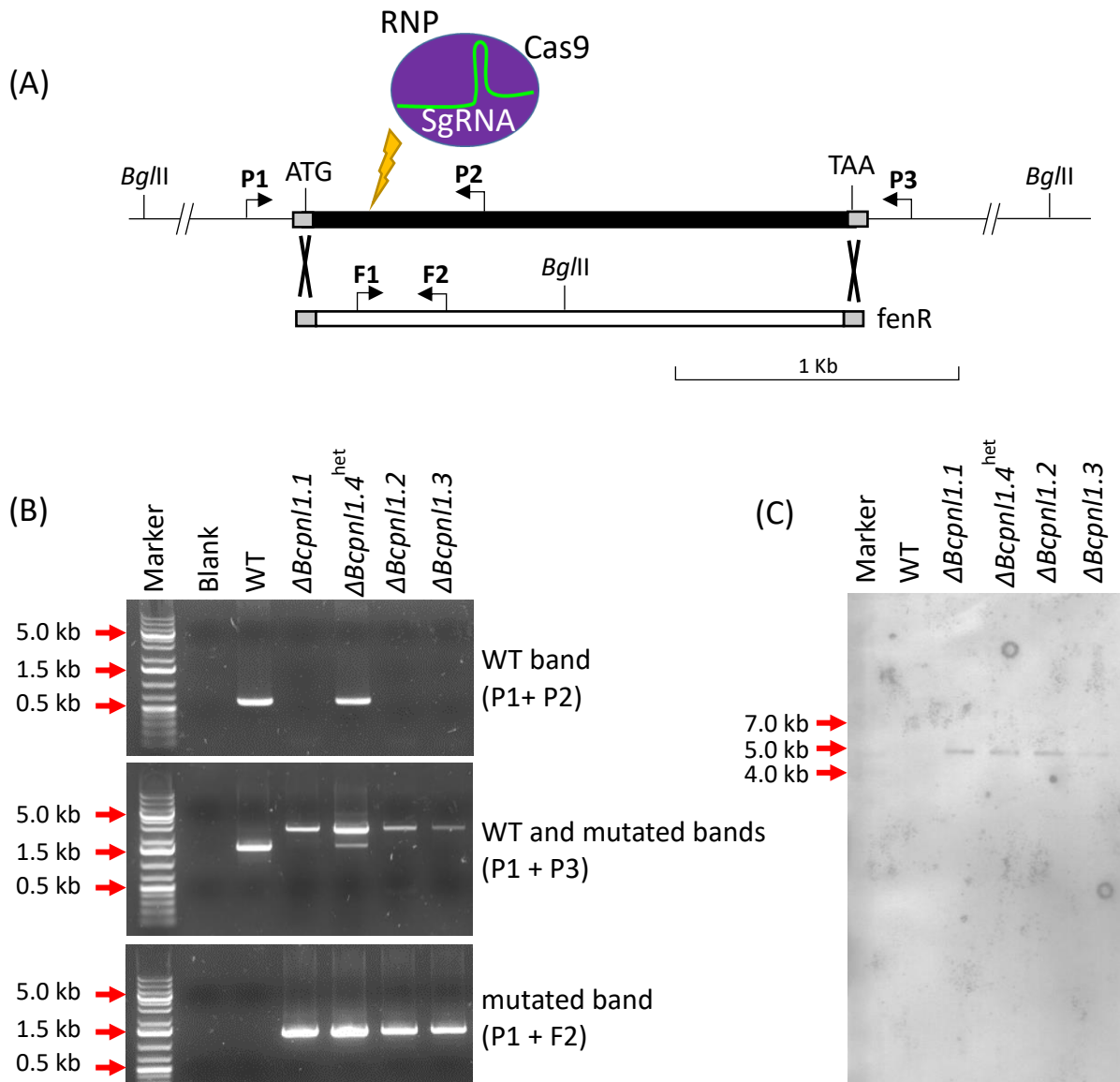




**Figure S2:** Impact of plant nitrate nutrition on the pectic part of the cell wall of *A. thaliana* leaves. These enzymatic fingerprints were obtained after polygalacturonase digestion of the cell wall and detection of pectin oligomers by mass spectrometry. Data represent the mean peak area of two replicas +/- SD.

### Targeted gene deletion of the *BcPNL1* gene in *B. cinerea*

Since  $\Delta Bcpgs$  and  $\Delta Bcpmes$  mutant strains of *B. cinerea* were already described and the fact that we noticed that BcPNLs activities are modified according to the nitrogen nutrition of the plant host and during pathogen infection, we next focus our study on BcPNL members. To evaluate the role of *BcPNL1*, which is the most expressed PNL gene during early infection (Figure 2A), the coding region of the gene was replaced by a deletion cassette containing the fenhexamid resistance gene amplified from the pTEL-fenh (Leisen *et al.*, 2020). PEG/CaCl<sub>2</sub>-mediated transformation of *B. cinerea* protoplasts was used together with the recently described CRISPR-Cas9 system relying on the ribonucleoprotein complex direct delivery strategy (Leisen *et al.*, 2020, Figure 2A). Fenhexamid-resistant transformants were selected *in vitro*. Absence of the wild-type *BcPNL1* gene and correct integration of the cassette in each isolate was determined by PCR and confirmed by Southern-blot using DIG-labelled probe, which also allowed to check for absence of ectopic integration of the cassette in the genome (Figure 2). As shown in Figure 3B, among 20 resistant transformants we were able to identify three homokaryotic mutant strains,  $\Delta Bcpn1.1$ ,  $\Delta Bcpn1.2$  and  $\Delta Bcpn1.3$ . The others, like the  $\Delta Bcpn1.4$  transformant, were found heterokaryotic. Nevertheless, all tested strains were clear of ectopic integration confirming the precision of the CRISPR-Cas9 system (Figure 2C). The mutant strains  $\Delta Bcpn1.1, 2$  and  $3$  were then selected for further phenotypic characterization.

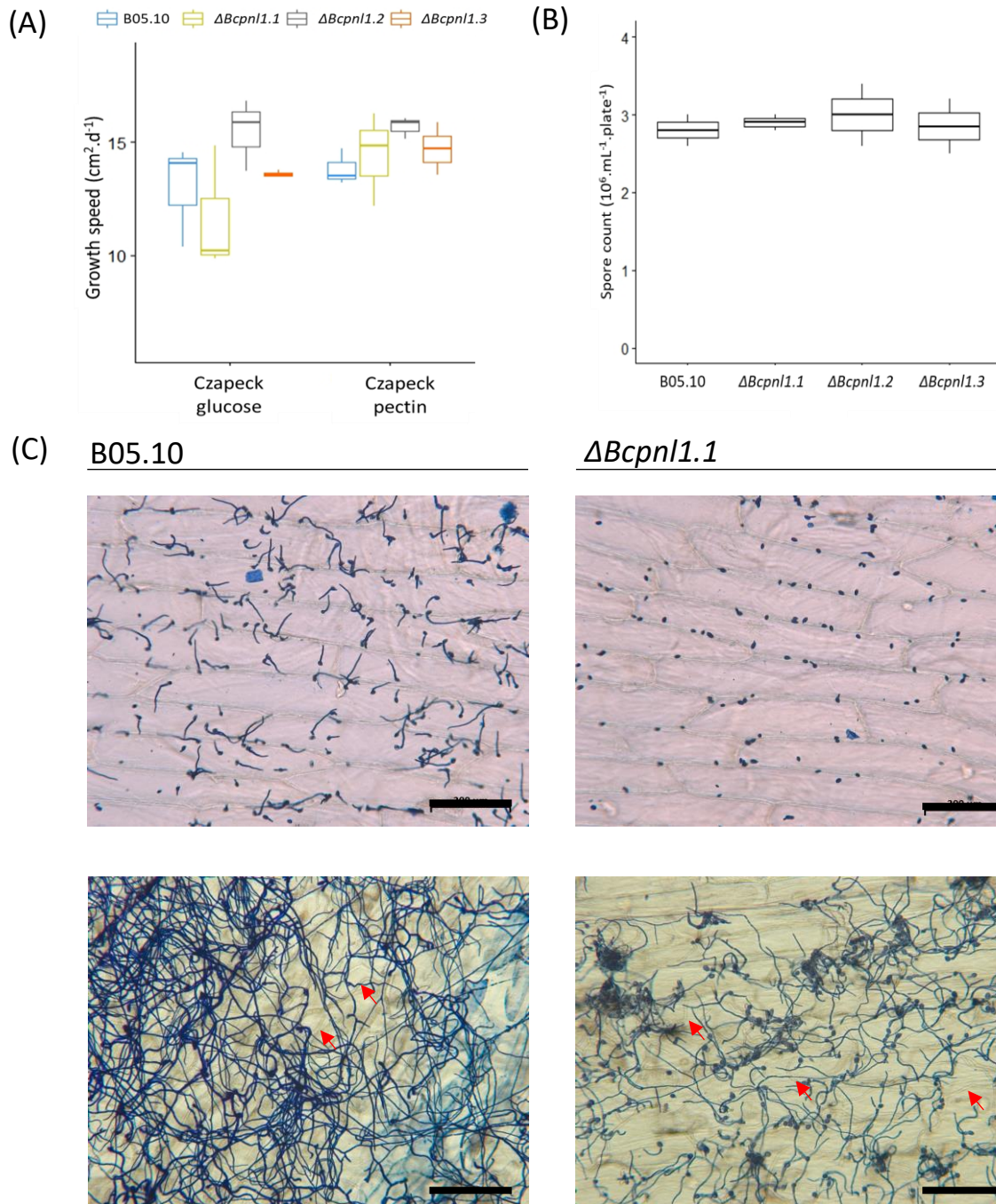


**Figure 2: Targeted gene replacement of *Bcpnl1* in *B. cinerea*.** (A) Representation of the deletion strategy used to obtain *Bcpnl1* mutants (arrows indicate primers used for diagnostic PCR shown in panel (B) and Southern in panel (C)). (B) Diagnostic PCR showing successful integration of the *fenR* cassette and nuclear purity of the  $\Delta Bcpnl1.1$ ,  $\Delta Bcpnl1.2$  and  $\Delta Bcpnl1.3$  mutants whereas  $\Delta Bcpnl1.4$  is heterokaryotic. (C) Southern hybridization of genomic DNA. In order to detect multiple integration events, genomic DNA was digested by *Bgl*II and hybridized with a *fenR* cassette probe obtained by PCR with F1 and F2 primers. Only one band of the expected size was found in all transformants.

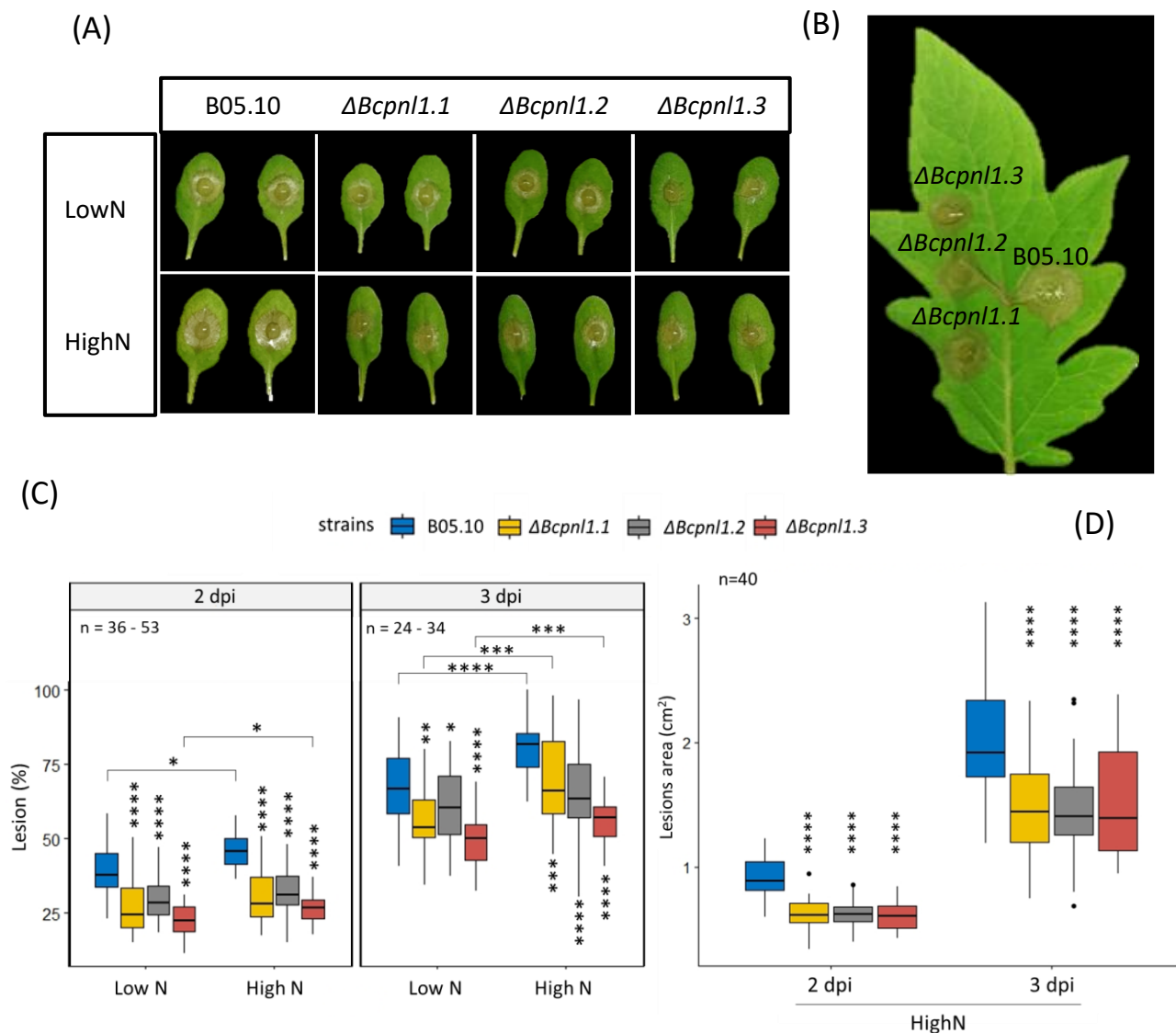
### ***BcPNLI* is involved in pathogenicity**

The *BcPNLI* gene was previously cloned and the protein purified in *Pichia Pastoris* in order to describe its pectinolytic activity (Voxeur *et al.*, 2019). It was shown that this PNL is highly active on methylesterified pectins and has a basic optimal pH like the majority of the PNL described (Yadav *et al.*, 2009). Thereby we hypothesized that *BcPNLI* deletion would impact the growth of the fungus cultivated in the presence of a pectin- containing medium. Even if slight differences were visible between the mutant strains, we did not observe any significant impact of *BcPNLI* deletion on *in vitro* spore production on PDA and growth with Czapeck minimal medium supplemented with glucose or highly methylesterified pectin as the sole carbon sources (Figure 3A, B). Moreover, the  $\Delta Bcpnll$  mutants showed a delay in spore germination on onion epidermis in comparison with the wild-type B05.10 strain, but no penetration defects at the 24h time point (Figure 3C).

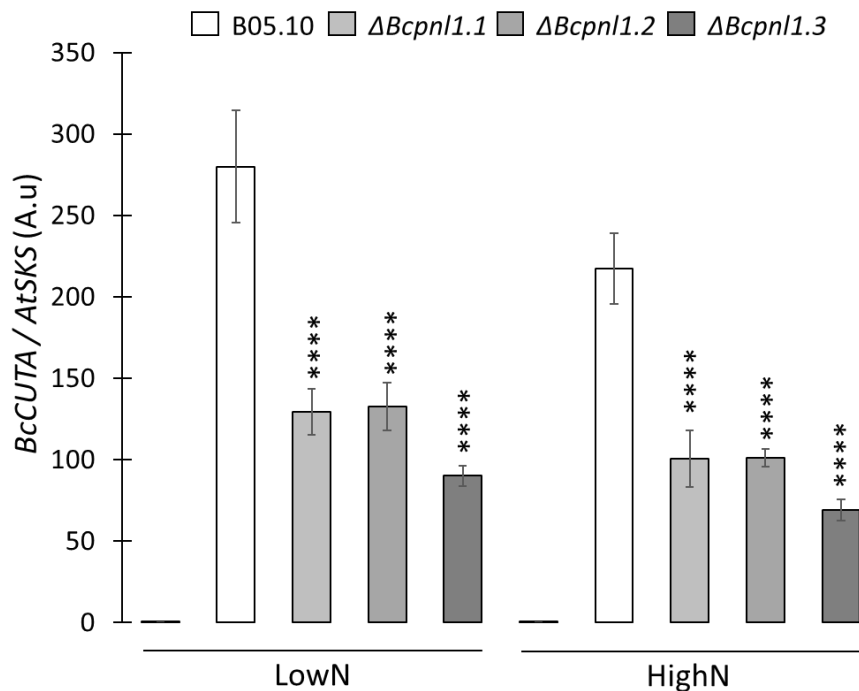
Plant nitrogen nutrition has been described to impact the sensitivity of the plant to the fungus and also cell wall remodelling processes (Fagard *et al.*, 2014; Landi & Esposito, 2017). Accordingly, we tested if the *BcPNLI* deletion could impact pathogenicity and nitrate dependent sensitivity of the plant to the fungus.  $\Delta Bcpnll$  mutants showed a significantly reduced pathogenicity on *A. thaliana* leaves whatever the plant nitrate nutrition status and on tomato at 2 dpi and 3 dpi (Figure 4). In addition, qPCR quantification of fungal DNA during infection of *A. thaliana* leaves confirmed the hypovirulence of these mutants (Figure S3). Finally, we observed the same impact of host nitrate supply on the interaction between *A. thaliana* and the WT strain (B05.10) with the  $\Delta Bcpnll$  mutant strains (Figure 4A, C).



**Figure 3: Analysis of development, germination and penetration abilities of the *ΔBcpl1* mutants.** (A) *In vitro* linear growth speed of *B. cinerea* on Czapeck or Malt medium. Data are the means of triplicates ( $\pm SD$ ). In each condition, two sample t-test was conducted between the B05.10 strain and the mutants: \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,005$ . (C) Coton blue coloration of the fungus on onion epidermis. Onion epidermis were inoculated with spore droplets of either B05.10 or the *ΔBcpl1* mutant strains in  $\frac{1}{2}$  PDB and incubated for 8h (top panel) or 24h (lower panel) before coloration and observation under the microscope. Red arrows show penetrating hyphae. Since results were the same with *ΔBcpl1.1/2/3* here are only presented the observations for *ΔBcpl1.1*. Scale bar = 200  $\mu m$ .



**Figure 4: Pathogenicity test on detached leaves with *B. cinerea* B0510 (WT) and the  $\Delta BcplI$  mutant strains and impact of the *A. thaliana* nitrate status.** (A) *A. thaliana* leaves, from plants grown either with 0.5 mM nitrate (LowN) or 10 mM nitrate (HighN), 2 days after inoculation. (B) *S. lycopersicum* leaves, from plants grown either with 10 mM nitrate, 3 days after inoculation. (C) Boxplot and statistical analysis of the lesions on *A. thaliana* leaves. Boxplots represent the results of four biological replicates each normalized in % of the larger lesion identified. (D) Boxplot and statistical analysis of the lesions on tomato leaves, 2 and 3 dpi. Absolute values of one replicate are represented and at least three independent experiments were conducted with similar results. In each condition, two sample t-test was conducted, unless indicated by bars, between the B05.10 strain and the mutants: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . n indicate the number of samples per condition.



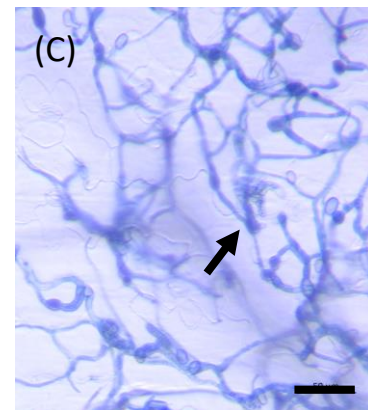
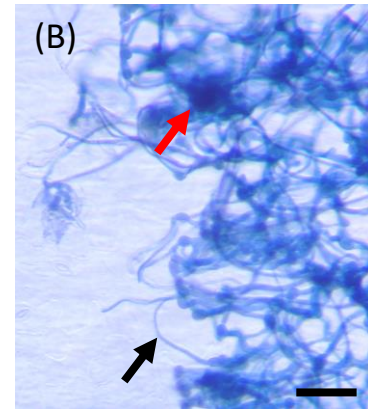
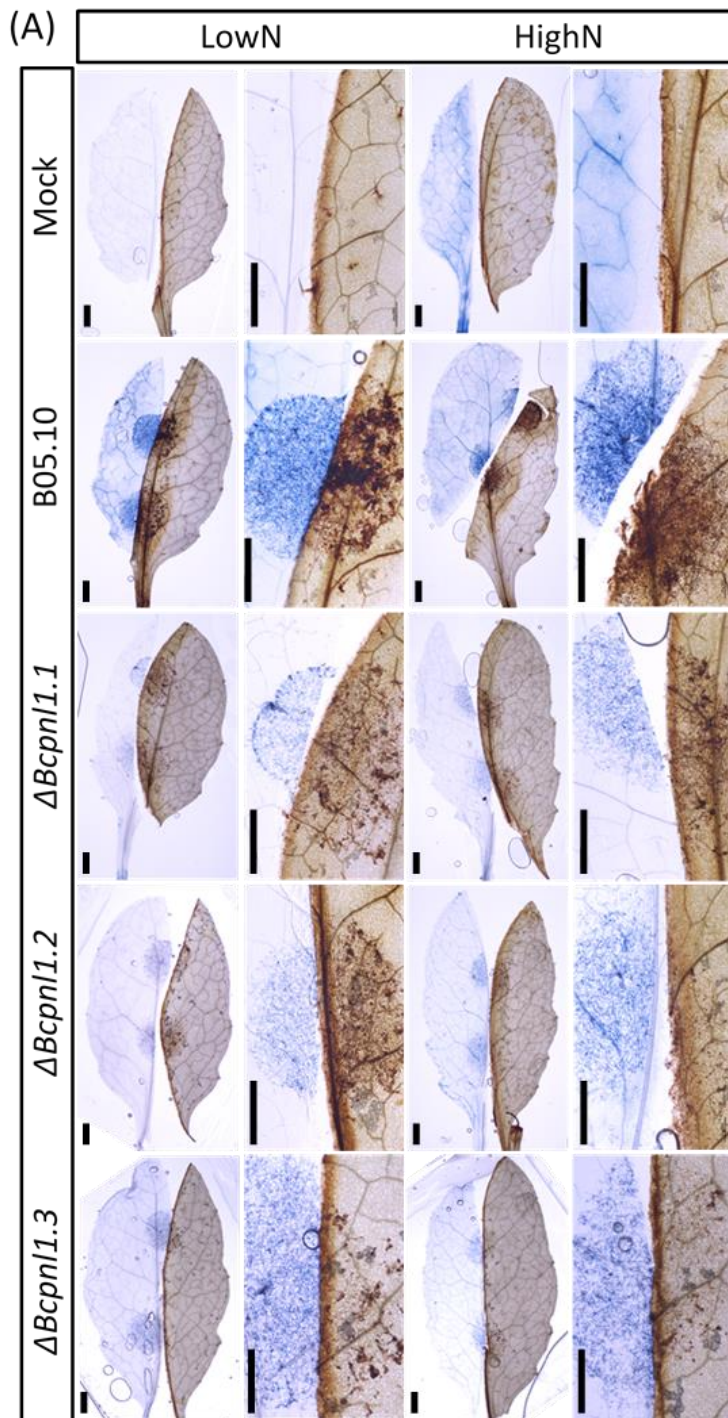
**Figure S3: Fungal DNA quantification of the WT (B05.10) and the  $\Delta Bcprn1$  mutant strains of *B. cinerea* after infection of *A. thaliana* leaves (3 dpi) from plants grown on contrasted nitrate supply.** For each condition, at least three independent experiments were conducted with similar results. Data are expressed as mean quantification of the fungal *BcCUTA* gene over the plant *AtSKS* gene in arbitrary units (a.u.) and are the means of triplicates ( $\pm SD$ ). Two sample t-test was conducted, unless bar indications, between the B05.10 strain in each condition and the mutants: \*\*\*\* $p < 0,001$ . \*

### Reduced cell death and oxidative burst with the $\Delta Bcprn1$ mutants

In order to characterize the plant response to the hypovirulent  $\Delta Bcprn1$  mutants we analysed the oxidative burst through the  $H_2O_2$  production with a 3,3'-diaminobenzidine (DAB) coloration at an early time point after inoculation. At 1 dpi, WT-infected leaves showed a strong DAB coloration at the inoculation site and around, whereas the mutant-infected leaves were just slightly stained at the inoculation site (Figure 5). We also analysed plant cell death upon infection using a trypan blue (TB) coloration. At the same time point (1 dpi) TB coloration revealed fungal growth as well as small darker spots of plant cell death only for the WT strain (Figure 5B, 5C). These results indicate that at this early time point the plant had reacted to the virulent B05.10 strain but not towards the mutants.

Altogether, these results indicate a lower aggressiveness of the  $\Delta Bcprn1$  mutants compared to the WT (B05.10) as it was seen above with pathogenicity tests.





**Figure 5: Cell death and oxidative burst reaction during infection.**

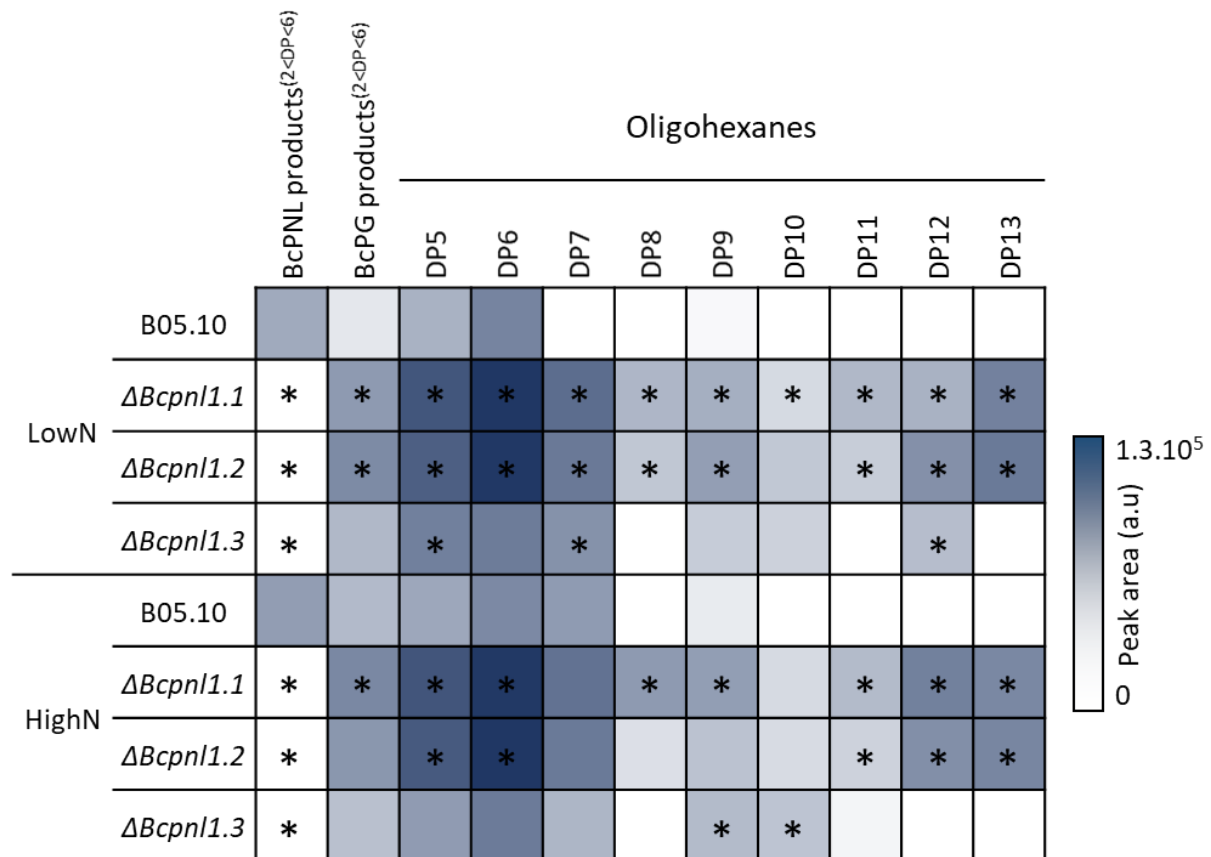
(A) Detached leaves of *A. thaliana* were infected with spores droplets of B05.10 or the  $\Delta Bcprn1$  mutants strains of *B. cinerea*. One day after inoculation, infected leaves were cut in half and each half was immediately colored with TB for cell death visualisation or DAB for oxidative burst visualisation. Three leaves were stained by condition and three independent biological replicats were analysed. Scale bar = 500µm. (B) Zoom of a WT (B) or mutant (C) infected leaf colored with TB. Black arrows show the fungus and the red arrow shows a spot of induced necrosis. Scale bar = 50µm. Images were taken with a ZEISS Axio Zoom V16.

(A) Detached leaves of *A. thaliana* were infected with spores droplets of B05.10 or the  $\Delta Bcprn1$  mutants strains of *B. cinerea*. One day after inoculation, infected leaves were cut in half and each half was immediately colored with TB for cell death visualisation or DAB for oxidative burst visualisation. Three leaves were stained by condition and three independent biological replicats were analysed. Scale bar = 500µm. (B) Zoom of a WT (B) or mutant (C) infected leaf colored with TB. Black arrows show the fungus and the red arrow shows a spot of induced necrosis. Scale bar = 50µm. Images were taken with a ZEISS Axio Zoom V16.

### ***In vivo* pectin digestion profile of the $\Delta BcPnl1$ mutant is altered**

Previous results on *B. cinerea* pectin digestion during infection of *A. thaliana* leaves showed that BcPNLs are responsible of 80% of the pectin degradation profile (Voxeur *et al.*, 2019). We also showed above that host nitrogen supply modifies this pectin degradation profile (Figure 1B). Thus, we studied the impact of *BcPnl1* deletion on cell wall degradation and its regulation by host nitrogen nutrition during infection.

In liquid culture at both nitrate conditions, the analysis of cell wall degradation in presence of the  $\Delta BcPnl1$  mutants at 18 hpi showed no production of PNL products thus confirming the absence of PNL activity (Figure 6). Moreover, PG products were more accumulated in presence of the  $\Delta BcPnl1$  mutants compared to the WT. This could be explained by the absence of other alternative than PMEs and PGs in the mutants to degrade pectin. Furthermore, we did not find with the mutants the increase in PG products at high N that we observed with the WT. Surprisingly, we identified some DP5 to DP6 oligohexanes, which could originate from hemicellulose, cellulose or also from the fungal cell wall, during infection with the mutants whereas low levels or total absence was observed with the WT (Figure 6).



**Figure 6:** *BcPnl1* deletion highly affect pectin and hemicellulose degradation during the interaction between *A. thaliana* and *B. cinerea*. LC-MS/MS quantitative analysis of pectin OGs and polyhexanes derived products after 18 h of liquid infection with the WT strain or the  $\Delta BcPnl1$  mutants on *A. thaliana* plants cultivated at LowN or HighN. Two independent experiments were conducted with similar results. Fisher's LSD test was conducted between the WT (B05.10) and the  $\Delta BcPnl1$  mutants in each condition: \* $p < 0.05$ . DP: degree of polymerisation.

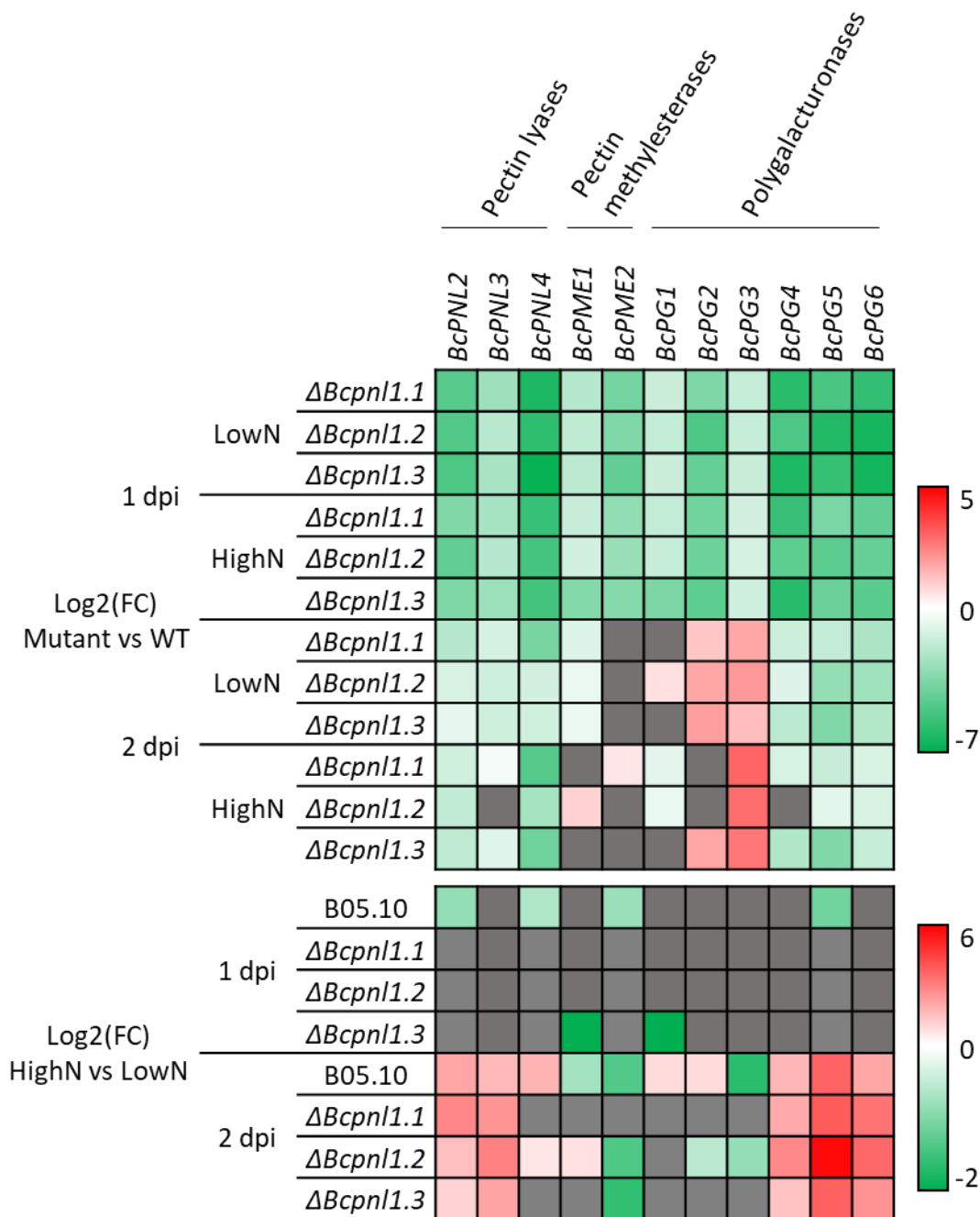


## Gene expression of fungal pectinases is altered in the $\Delta Bc pnl1$ mutants and is differently impacted by plant nitrate nutrition

Knowing that  $\Delta Bc pnl1$  mutants displays a stronger accumulation of cell wall derived PG products during infection than the WT (Figure 6) and that the loss of BcPNL1 activity could be compensated by the activity of other enzymes, we investigated the expression of the *BcPNLs* homologues as well as other pectinases genes during the infection with the  $\Delta Bc pnl1$  mutants. We also wanted to know if nitrate nutrition could still impact the expression of pectinase genes in those mutants.

At both tested time point (1 dpi and 2 dpi) and nitrate supply conditions (high N and low N), *BcPNL2,3,4* and *BcPG4,5,6* gene expressions were down-regulated in the mutants compared to the WT (Figure 7, upper panel). Furthermore, we found that *BcPG1,2,3* and *BcPME1,2* were strongly down-regulated in the mutants at 1 dpi compared to the WT (Figure 7, upper panel) and a little less down-regulated at 2 dpi. However, *BcPG2* and *BcPG3* were up-regulated at 2 dpi in the mutants compared to the wild-type. Thus, at the transcriptional level the deletion of *BcPNL1* led to a global repression of pectinase gene expressions that was more pronounced at 1 dpi.

Regarding host nitrogen nutrition impact, the same regulation depending on plant nitrate supply as the WT strain seems to occur in the  $\Delta Bc pnl1$  mutants especially on the genes such as *BcPNL2,3*, *BcPME2* and *BcPG3,4,5,6* (Figure 7, lower panel). However, *BcPNL4*, *BcPME1* and *BcPG1,2* were not anymore regulated by host nitrate nutrition in the mutants at 2dpi.



**Figure 7: Differences in *B. cinera* pectinase genes expression between the WT strain B05.10 and the  $\Delta BcpnI$  mutant strains during infection of *A. thaliana* plants grown with low (LowN) or high (HighN) nitrate supply.** The upper panel represents the log2 fold change between the WT and the mutants and the lower panel represents the changes between LowN and HighN conditions. Each fungal gene target was normalized with *BcActA*. Similar results were obtained when normalization was done with *BcUBI*. Three independent experiments were conducted with similar results. Only significant differences obtained with a t-test are shown,  $p < 0.05$ . Unsignificant differences are represented with a grey square.

## Gene expression of defense related genes in plants infected by *ΔBcpnl1* mutants is differently impacted by plant nitrate nutrition

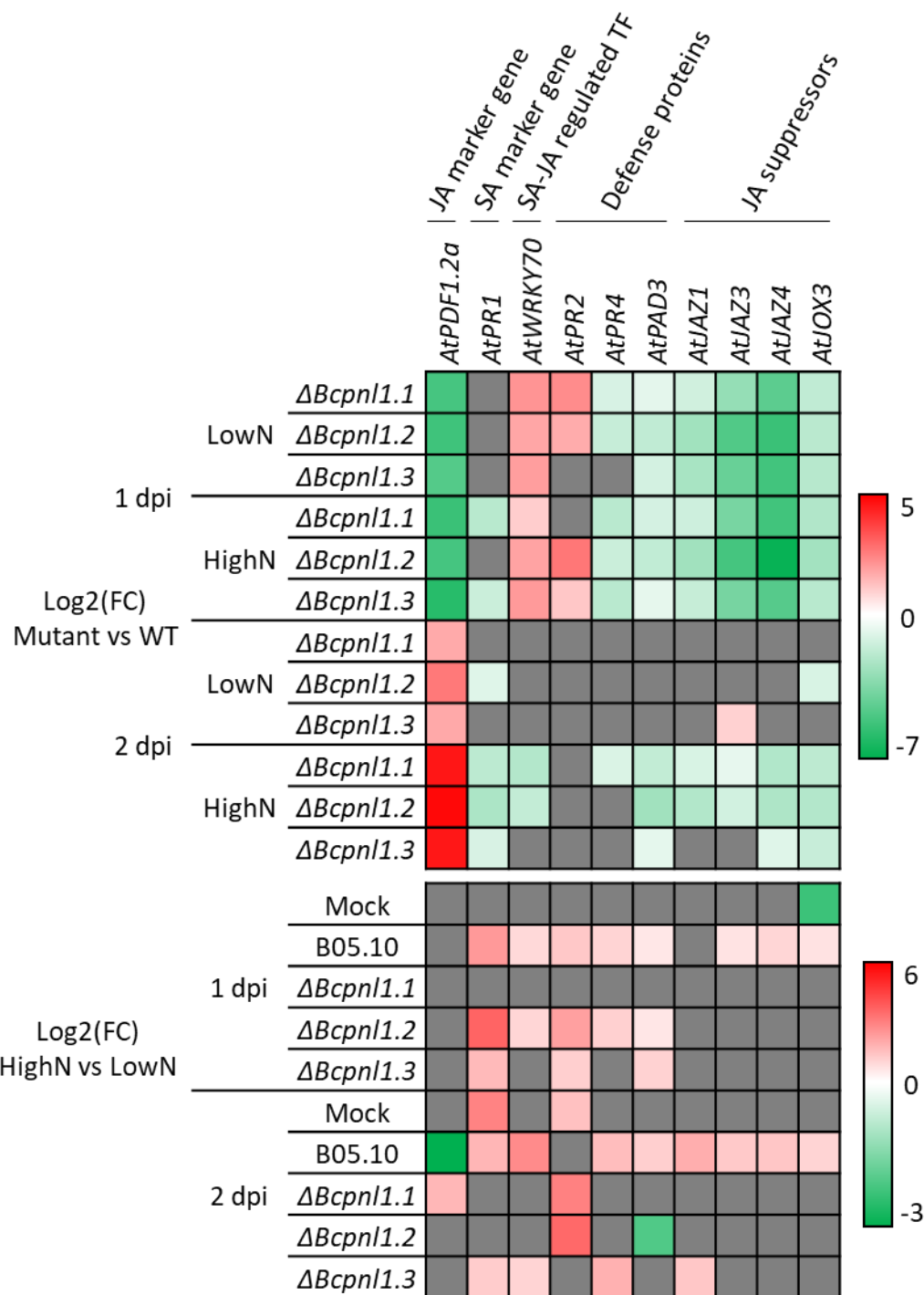
OGs are well known defence regulators acting as DAMPS in triggered immunity (Davidsson *et al.*, 2017). Here we found that OG production is strongly affected by plant nitrogen nutrition and is correlated to the BcPNL1 activity. Furthermore, defense gene expression is known to be affected by the plant nitrogen status (Soulie *et al.*, 2020). Accordingly, we hypothesized that expression of defence-associated genes in plants would be differently regulated in the presence of *ΔBcpnl1* mutants depending on plant nitrate supply.

In response to the *ΔBcpnl1* mutants, we observed at 1dpi a lower expression of the majority of tested defense genes compared to the WT. Indeed, the JA marker gene *AtPDF1.2a*, the SA maker gene *AtPR1* but also the chitinase *AtPR4* and *AtPAD3* involved in camalexin biosynthesis were down regulated in plant infected by the mutants at 1 dpi (Figure 8, upper panel). On the other hand, the glucanase *AtPR2* and the transcription factor (TF) *AtWRKY70* which is activated by SA and repressed by JA (Li *et al.*, 2004), are repressed genes upon infection (Figure S4) but are less repressed after infection with the *ΔBcpnl1* mutants at 1dpi. Moreover, *AtJOX3* and the transcription factors *AtJAZ1,3,4* genes, respectively involved in repression of the JA pathway by inactivation of JA through hydroxylation (Caarls *et al.*, 2017; Smirnova *et al.*, 2017) and repression of JA induced genes (F. Zhang *et al.*, 2015), were also down regulated in plants infected with the mutants. Overall, the response to the *ΔBcpnl1* mutants is limited at 1dpi compared to the WT. However, at 2 dpi a strong up -regulation of *AtPDF1.2* was observed during infection with the *ΔBcpnl1* mutants and a down-regulation of *AtPR1*, *AtWRKY70* and *AtPAD3* (Figure 8, upper panel). Moreover, we observed that, *AtJOX3* and *AtJAZ1,3,4* gene expressions were still lower with the *ΔBcpnl1* mutants at 2 dpi compared to the WT strain B05.10 (Figure 8, upper panel). Finally, according to our results using a limited number of genes it suggests that upon pathogen perception, the JA and the SA-mediated defence pathways are respectively more and less induced with the mutants than with the WT strain.

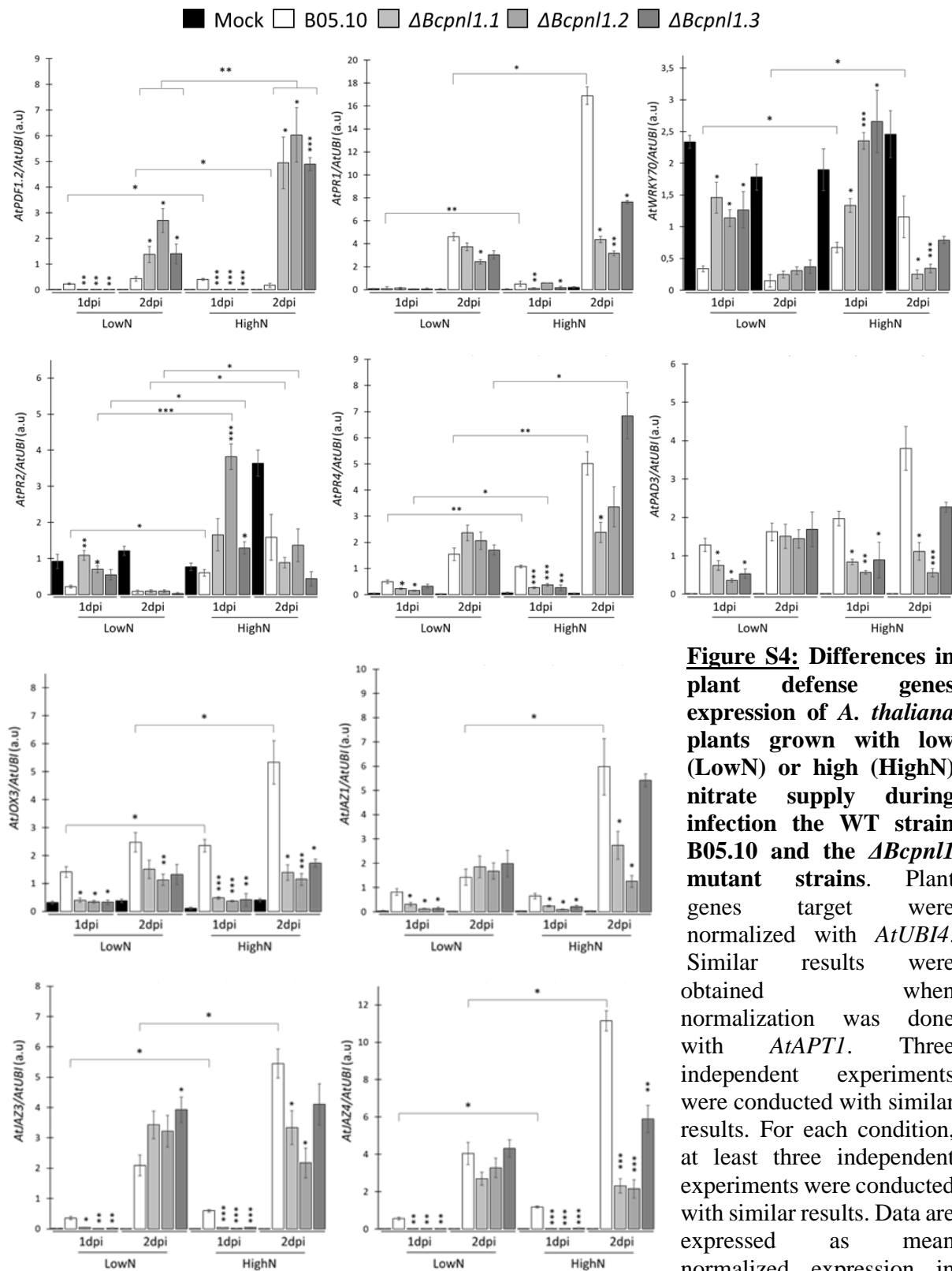
Previous works identified the implication of the JA and SA pathway on the contrasted grey mold disease severity caused by plant nitrogen nutrition (Soulie *et al.*, 2020). The main effect was found on the JA marker gene *AtPDF1.2* whose expression was stronger on plants grown on low N infected with the WT strain at 2 dpi (Figure 8, lower panel). We observed the opposite effect with *ΔBcpnl1.1* mutant and the same tendency with the two other mutants : *AtPDF1.2* was more expressed on plants grown on high nitrate at 2 dpi (Figure 8, lower panel).

Moreover, we found a lower expression level for *AtPR1*, *AtWRKY70*, *AtJAZ1,3,4* and *AtJOX3* in high N. These results showed that the observed lower activation of the JA pathway in high N correlates to the higher induction of genes involved in JA repression and genes of the SA pathway compared to low N. Strikingly, we observed the loss of nitrate nutrition impact on the expression level of *AtPR1*, *AtWRKY70*, *AtPR4*, *AtPAD3*, *AtJOX3* and *AtJAZ1,3,4* for at least two of the three *ΔBcpnl1* mutants. Therefore, BcPNL1 seems to play a role in orchestrating the host nitrate nutrition-dependent regulation of plant defenses and particularly of JA and SA mediated defenses (Figure 8).

To conclude, a strong down regulation of pectinases genes expression with only a late compensation with two BcPGs was found during infection with the *ΔBcpnl1* mutants. Furthermore, even if a global down regulation of defence related genes was found with the *ΔBcpnl1* mutants at an early time point, a strong induction of the JA pathway was revealed at 2 dpi. Finally, in the *ΔBcpnl1* mutants, host nitrate nutrition seemed to keep an impact in the expression of fungal pectinases whereas the impact on defence related genes was lost or reversed.



**Figure 8: Differences in plant defense genes expression of *A. thaliana* plants grown with low (LowN) or high (HighN) nitrate supply during infection the WT strain B05.10 and the *ΔBcpnl1* mutant strains.** The upper panel represents the log2 fold change between the WT and the mutants and the lower panel represents the changes between LowN and HighN conditions. Each plant gene target was normalized with *AtUBI4*. Similar results were obtained when normalization was done with *AtAPT1*. Three independent experiments were conducted with similar results. Only significant differences obtained with a t-test are shown,  $p < 0.05$ . Unsignificant differences are represented with a grey square.



**Figure S4: Differences in plant defense gene expression of *A. thaliana* plants grown with low (LowN) or high (HighN) nitrate supply during infection the WT strain B05.10 and the  $\Delta Bcpl1$  mutant strains.** Plant genes target were normalized with *AtUBI4*. Similar results were obtained when normalization was done with *AtAPT1*. Three independent experiments were conducted with similar results. For each condition, at least three independent experiments were conducted with similar results. Data are expressed as mean normalized expression in

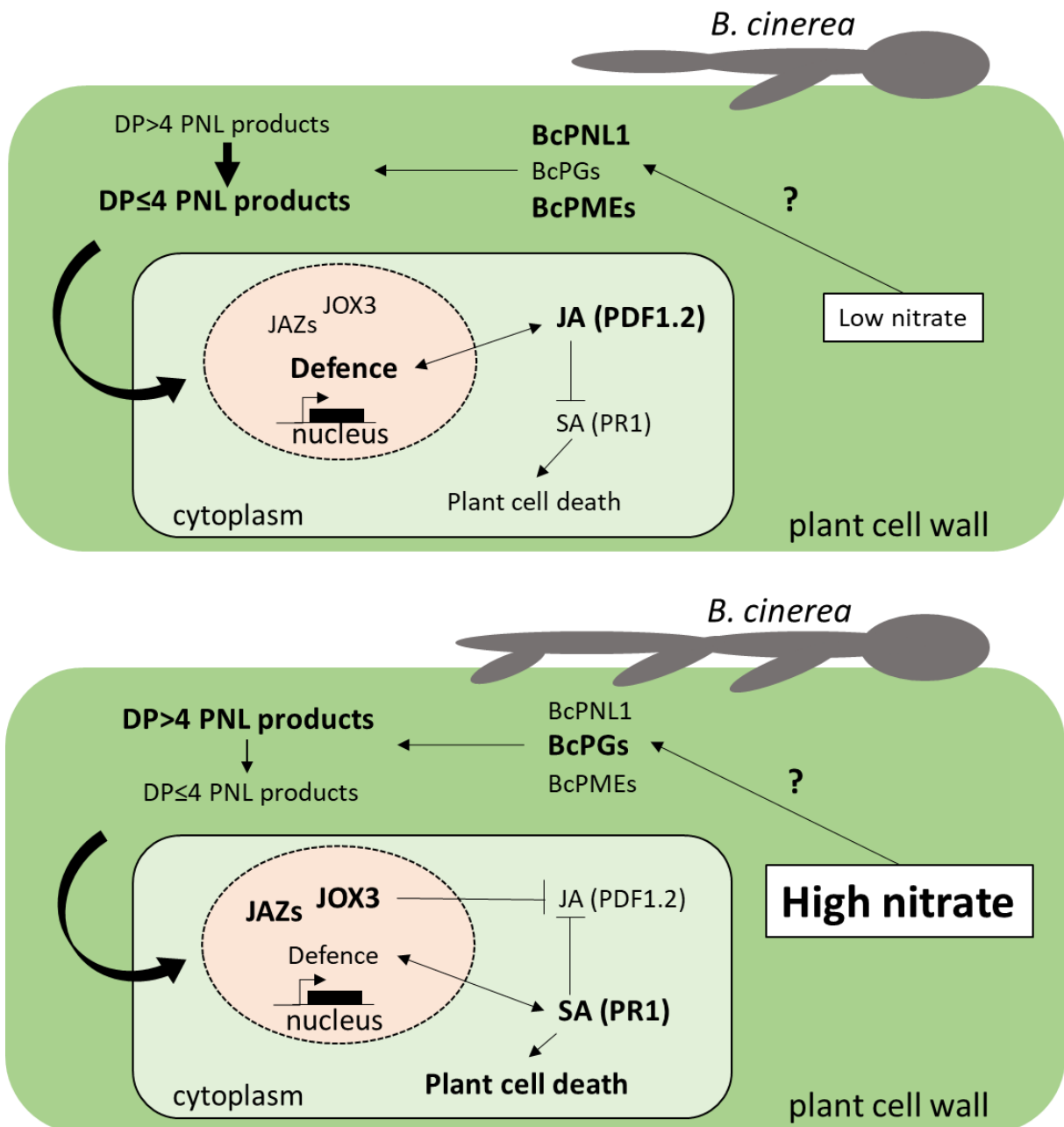
arbitrary units (a.u.) and are the means of triplicates ( $\pm SD$ ). In each condition, two sample t-test was conducted, unless bar indications, between the B05.10 strain and the mutants: \* $p < 0.05$ \*\*,  $p < 0.01$ \*\*\*,  $p < 0.005$ .

## DISCUSSION

Plant nitrogen nutrition and its impact on host-pathogen interactions has been widely studied (Fagard *et al.*, 2014). The underlying mechanisms are thought to involve many genes and processes but are still not well known. A previous study described by a dual transcriptomic approach underlined the importance of plant nitrogen nutrition on the *B. cinerea* – *A. thaliana* pathosystem and showed that high nitrate conditions favours the infection (Soulie *et al.*, 2020). *B. cinerea*, as all pectin degrading fungal pathogens, rely on its pectinases to break the cell wall barrier and release nutrients supporting fungal growth and development. However, a role of these pathogen pectinolytic enzymes in the interaction between plant nitrogen nutrition and pathogenesis had never been reported. Consequently, we studied the role of *B. cinerea* pectinases of several families during infection of *A. thaliana* in low N and high N. In this study we were able to show differences during the infection in the pectin degradation machinery at the transcriptional level and in the final OG production depending on the plant nitrogen supply (Figure 1). Moreover, preliminary results obtained by cell wall enzymatic fingerprint of plants grown with high or low nitrate conditions showed almost no differences in term of profil of pectins thus discrediting the hypothesis of endogenous differences in cell wall chemistry (Figure S3).

Since the role of BcPGs and BcPMEs are well described in *B. cinerea* pathogenesis, we further focused our attention on BcPNLs. In other phytopathogens such as *Erwinia carotovora*, *Penicillium digitatum* and *Verticillium dahlia* activities of PNLs represent important determinants of virulence (Pirhonen *et al.*, 1991; López-Pérez *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). Concerning *B. cinerea*, to our knowledge no study has clearly investigated the role of *BcPNL* genes. Currently, only the work of An *et al* (2005) and our previous work (Voxeur *et al.*, 2019) showed a major role of *B. cinerea* PNLs in the production of OGs during the infection, suggesting a role in virulence. In the present study, we have assessed the role of the *BcPNL1* gene, coding for the most expressed PNL gene during the early phase of infection. Thanks to the recently described CRISPR-Cas9-mediated gene replacement in *B. cinerea* (Leisen *et al.*, 2020), we have obtained and then characterized  $\Delta Bc pnl1$  mutants (Figure 2). *In vitro*, the mutants presented normal growth with glucose or highly methylesterified pectin as the sole carbon source (Figure 3A). Similarly,  $\Delta pnl1$  mutants of *Penicillium digitatum* displayed no growth defects *in vitro* (López-Pérez *et al.*, 2015). Furthermore, we observed a delayed spore germination of  $\Delta Bc pnl1$  mutants on onion epidermis (Figure 3C). In the transcriptome analysis of germinating spores on a plant mimicking surface, Leroch *et al* (2013) showed that *BcPNL1* expression is strongly induced after only one hour of incubation. These observations suggest that *BcPNL1* might be implicated in early germination events upon perception of the plant surface. *In planta*, a reduced pathogenicity of  $\Delta Bc pnl1$  mutants was observed on *A. thaliana* and tomato leaves (Figure 4). The reduced pathogenicity of the  $\Delta Bc pnl1$  mutants on different host plants also suggest that this pathogenicity factor is not linked to host specificity. Supporting this hypothesis, Cotoras & Silva, (2005) observed in WT *B. cinerea* strains isolated from tomato and grape a similar level of secretion of PNLs. In other fungal pathogens such as *V. dahlia* and *P. digitatum*, mutants of PNLs were also hypovirulent on their respective hosts (J. Y. Chen *et al.*, 2016; López-Pérez *et al.*, 2015). Authors not only mention their role in promoting penetration through cell wall degradation but also their necrotizing activity. In our study, according to trypan blue colorations, initial necrosis of the plant cells seemed to be reduced in presence of the  $\Delta Bc pnl1$  mutants (Figure 5). Movahedi & Healen in 1990 showed that a PNL purified from *B. cinerea* germinating spores had a cell death activity on carrot cell culture and was able to produce elicitors from cell wall components. Since *BcPNL1* was the only *PNL* gene that was strongly expressed in the early interaction, it might be the same enzyme that the authors purified and characterized as a necrosis-inducing protein. It would be interesting to purify *BcPNL1* in order to confirm this hypothesis. Concerning the potential role of the other *BcPNLs* genes (*BcPNL2*, *BcPNL3* and *BcPNL4*), in the B05.10 wild-type strain their expressions were not specific to an infection phase since, in contradiction to *BcPNL1*, they are still expressed 2 dpi during maceration spreading (Figure 1). Wei *et al* (2002) have shown that *Colletotrichum gloeosporioides f. sp.*

*Malvae* possess two PNLs with different regulation mechanisms and that one of them was specific to the necrotrophic phase whereas the other was also expressed in the biotrophic phase. The authors postulated that each PNL has a specific role in degrading pectin depending on the ongoing strategy of the fungus. Thereby, the other *BcPNLs* of *B. cinerea* could be late infection pathogenicity factors and their individual and multiple deletions might reveal new clues about *B. cinerea* pathogenesis.



**Figure 9:** Schematic model of the plant nitrate nutrition impact on the *B. cinerea*-*A. thaliana* interaction via the regulation of pectin degradation and the regulation of JA and SA pathways. BcPGs: polygalacturonases, BcPMEs: pectin methylesterases, BcPNLs: pectin lyases, SA: salicylate, JA: jasmonate, JOX3: Jasmonate-induced oxygenase 3, JAZs: Jasmonate-zim-domain proteins.

In the  $\Delta Bcpgn1$  mutants, pectin degradation capacities were strongly affected. No more PNL derived cell wall products were detected upon infection with the  $\Delta Bcpgn1$  mutants (Figure 6) which corroborates the absence of functional compensation observed with *BcPNL2,3* and *4*. Moreover, PG products seemed to be accumulated but not significantly in all mutants and all conditions. But surprisingly, at the transcriptional level *PMEs* and *PGs* gene expressions were mostly down-regulated in the mutants (Figure 7). This PG product accumulation with the mutants presenting no PNL activity might just be the result of obligate *PMEs* and *PGs* degradation. It is known that pectinases are regulated at the transcriptional level by pectin and pectic components (Yadav *et al.*, 2009), thus, specific pectin fragments released upon degradation might induce genes coding for enzymes capable to achieve the next degradation step. This could explain the absence of compensation by *PMEs* and *PGs* of the *PNL1* deletion. Overall, deletion of *BcPNL1* seemed to modify deeply the kinetics of pectin degradation and OG turnover during infection which can partly explain the delayed pathogenicity of the mutants. Interestingly we detected the presence of oligohexans of various DP released during infection with the  $\Delta Bcpgn1$  mutants but almost none with the WT strain. It might be the reflection of a potential feedback control of *BcPNL1* on other enzymes such as glucanases that would need further investigation.

During host-pathogen interactions, OGs produced by pectinases are considered to be important DAMPs which modulate immunity in plant (Davidsson *et al.*, 2017; Voxeur *et al.*, 2019; Pontiggia *et al.*, 2020). In our study we found a reduced pathogenicity in the presence of the *B. cinerea*  $\Delta Bcpgn1$  mutants on *A. thaliana* leaves. At the transcriptional level, we observed at 1 dpi, a reduced expression or repression of all defense-related genes tested (Figure 8). We attributed this result to the delayed germination of  $\Delta Bcpgn1$  mutants and to the down regulation of the expression of all pectinase genes. At 2 dpi, when necrosis is observed both in plants infected with WT and  $\Delta Bcpgn1$  strains, we observed a stronger induction of *AtPDF1.2*, a marker of the JA defence pathway with the  $\Delta Bcpgn1$  mutants at both nitrate conditions while *PDF1.2* induction is likely inhibited with the WT strain (Figure 8). By contrast, *AtPR1*, a marker of the SA-pathway and *AtJOX3* involved in repression of the JA pathway were less induced in response to  $\Delta Bcpgn1$  mutants in comparison with the WT strain B05.10. Altogether, these data underline that *BcPNL1* and/or its pectin products is/are involved in regulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signalling,

Interestingly, we found that several *BcPNLs*, and *BcPGs* were more expressed during infection in high N conditions, which favours the infection, whereas it is the opposite for *BcPNL1* and *BcPMEs*. Consistently, the production of GalA<sub>4</sub>MeAc-H<sub>2</sub>O is promoted at low N, activating JA pathway and restricting fungal pathogenicity. By contrast, higher levels of PG products were observed when the plants were grown on high nitrate, leading to a relative lower level of PNL products (Figure 1A, Figure 8). In High N, we also observed an upregulation of *AtJOX3* and *AtJAZs* with the WT strain B05.10. These genes are involved in repression of the JA pathway which is strongly implicated in efficient defence strategy against *B. cinerea* (AbuQamar *et al.*, 2017; Thomma *et al.*, 1998). This pathway is induced by long methyl esterified PNL products, accumulated upon plant infection with the  $\Delta Bcpgn1\Delta Bcpgme2$  mutant, hypervirulent on *A. thaliana*. In  $\Delta Bcpgn1\Delta Bcpgme2$  mutant, these high DP (>5) PNL products, that cannot be further degraded by *PGs* induce an up-regulation of genes involved in JA pathway repression such as *AtJOX3* and *AtJAZs* (Voxeur *et al.*, 2019). Consistently, *BcPMEs* are downregulated in High N compared to low N both at 1 and 2 dpi, the turnover of long PNL-products might be therefore slower in High N leading to a transient accumulation of these OGs and inducing a higher *AtJOX3* and *AtJAZs* activation. Since we observed a downregulation of *AtJOX3* and *AtJAZs* in response to  $\Delta Bcpgn1$  mutants in comparison with the WT strain B05.10 in High N, we conclude that OGs involved in *AtJOX3* and *AtJAZs* activation are likely produced by *BcPNL1*. We can therefore clearly establish the link between pathogenicity, *BcPNL1* produced OGs and JA-pathway modulation and confirm



that the fungus is able to hijack the DAMPs-mediated immunity by the PNLs-mediated production of long OGs.

We also investigated if plant nitrogen impacts plant defense regulation with the *ΔBcpnl1* mutants. We found a complete loss of host-nitrogen nutrition regulation on several defense-related genes such as the *AtPDF1.2* that was no more repressed, *AtJOX3* and *AtJAZs* that were no more induced in high N conditions during infection with the mutants (Figure 8). This indicates a loss of the ability to better repress the JA-mediated defense pathway under high nitrate versus low nitrate conditions with *ΔBcpnl1* mutants. These results further underline the connection of the higher JA repression in high N conditions with *BcPNL1*. However, nitrogen nutrition of *A. thaliana* plants was still affecting pathogenesis of the *ΔBcpnl1* mutants indicating that this one gene cannot entirely explain this complex interaction.

In conclusion, this work revealed that in the pathosystem studied, fungal pectinases play a central role in the contrasted disease severity dependent on nitrate nutrition. This new insight into the effect of plant nitrogen nutrition on disease severity might help the understanding of this complex interaction. This study also provides evidences on the importance of the *BcPNL1* gene in the interaction between *B. cinerea* and its hosts. Finally, the role of PNL produced OGs in hijacking OG-induced immunity demonstrates the fine regulation of this process not only by the plant but also by the pathogen.

## MATERIALS AND METHODS

### Fungal and plant material

*B. cinerea* strain B05.10 collected from *Vitis* in Germany (Quidde *et al.*, 1998) was used throughout this work as the WT reference strain. Strains of *B. cinerea* were routinely cultured on Potato dextrose agar (PDA, Difco) or Malt Agar (1% malt extract, 1.2% agar) at 23°C under constant light. For fungal growth rate measurements, we used Czapeck minimal media containing 2.55 g/L NaNO<sub>3</sub>, 0.5 g/L KCl, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O and either 30 g/L glucose or 10 g/L of highly methylesterified citrus pectin (sigma) as sole carbon source. *A. thaliana* ecotype *Col-0* was obtained from the INRAE-Versailles collection. For all experiments, plants were cultured in growth chambers (65% relative humidity, 8 hr photoperiod, 21°C) for 6 weeks on nonsterile sand either supplied with a nutrient solution containing 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Low N) or 10 mM (High N). Tomato plants (Monalbo) were cultured in the same conditions for 6 weeks but were only supplied with 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nutritive solution.

### Construction of *ΔBcpn11* mutants

*ΔBcpn11* mutants were obtained by using CRISPR-Cas9 mediated HR of a Fenhexamid resistance cassette (figure 3) as described in Leisen *et al.*, 2020. Briefly, fresh spores of the B05.10 strain (1.10<sup>8</sup> conidia) were cultured overnight in 100 mL of HA rich liquid medium (1% malt extract, 0.4% glucose, 0.4% yeast extract, pH 5.5). The obtained fungal biomass was washed twice in KCl/NaPi buffer (0.6 M KCl, 100 mM sodium phosphate pH 5.8) and then incubated in KCl/NaPi buffer with 1.35 % (w/v) protoplasting enzymes (Glucanex) 1h at 28° on a rotary shaker at 60 rpm. Protoplast were then washed twice with TMS buffer (1 M sorbitol, 10 mM MOPS, pH 6.3) and concentrated in TMS buffer (TMS + 50 mM CaCl<sub>2</sub>) at the desired concentration (2.10<sup>7</sup>.100μL<sup>-1</sup>). PEG-mediated transformation was achieved by addition of PEG solution (0.6 g ml<sup>-1</sup> PEG 3350, 1 M sorbitol, 10 mM MOPS, pH 6.3) to the protoplasts previously incubated for 10 min on ice with the ribonucloprotein (RNP) complex and the DNA repair template (10 μg). The RNP complex was obtained by incubating for 30min at 37°C in 15 μL of EngesCas9 specific buffer (NEB), 6 μg of the commercial EngenCas9 (NEB) with 2 μg of the freshly synthesized SgRNA1 obtained with the HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB). DNA repair templates containing the fenhexamid resistance cassette surrounded by 60 bp for homologous recombination were obtained by PCR using primer X1 and X2 on the pTEL-fenh plasmid kindly provided by Pr. Matthias Hahn (Kaiserslautern, Germany). Protoplast were then plated on SH agar medium (0.6 M sucrose, 5 mM Tris-HCl pH 6.5, 1 mM (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 g.L<sup>-1</sup> bacto agar) supplemented with 1 μg.mL<sup>-1</sup> fenhexamid (Sigma) for regeneration. Resistant transformants were then subcultured with the selection pressure on HA agar (HA, 1.5 % agar) and once again on PDA and MA for stock solution of spores and DNA extraction respectively. Finally, correct homokaryotic integration was verified by PCR on genomic DNA extracted as described in Feng *et al.*, 2010. Unique integration of the cassette was then controlled by Southern blot using DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Sigma). Primers used in this study are listed in Table S1. Selection of the SgRNA protospacer sequences targeting *BcPNLI* was done with the online CRISPOR tool (Concordet & Haeussler, 2018).

**Table S1 : List of primers used in each experiment.**

Name	Sequence	Purpose
P1	5'-GGATGTTGAATGTCTCGAGGTT-3'	PCR verification of the mutants
P2	5'-GAACCGAGCTTGATAGCACT-3'	PCR verification of the mutants
P3	5'-ATCTCACTCTCTCCTTCTGTTGT-3'	PCR verification of the mutants
F1	5'-AGATAACCATTGCGCGAATCC-3'	PCR amplification of probe for Southern-blotting
F2	5'-TTCCTTGGGCTGCATTCAGT-3'	PCR verification of the mutants/PCR amplification of probe for Southern-blotting
SgRNA1	5'- AAGCTAATACGACTCACTATAGGTTGACGCCGCA GCAGTCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'	Specific primer for SgRNA synthesis
PNL1FenR fwd	5'- AGTTATATCAATAACTTCACTTCAATCAATCATCA TGGTTTCAATCAAGACCCTCGCTATCATTTTTGG GCTTGGCTGG-3'	DNA template amplification
PNL1FenR rev	5'- CTTCATCCCTCCAGTCTACCATCTCCAACCCATCCT TAAATCTTTCAATACCGCGTTAGGCTCACTATA CATCTGGC-3'	DNA template amplification
BcACTA fwd	5'-CGCCATTGCTCGTGTGAC-3'	RT-qPCR
BcACTA rev	5'-TCGGCAGTGGTGGAGAAAGT-3'	RT-qPCR
BcUBI fwd	5'-ACCATAACAACCTCGGCATGC-3'	RT-qPCR
BcUBI rev	5'-ACCGCGATGTAAACTGACG -3'	RT-qPCR
BcPME1 fwd	5'-TATCTCTGCCACACCAC-3'	RT-qPCR
BcPME1 rev	5'-CGACGACGAGACATTTA-3'	RT-qPCR
BcPME2 fwd	5'-AAAACAACGAAGCCACCCTC-3'	RT-qPCR
BcPME2 rev	5'-CGTAGGAGGAGAGAGCAAGG-3'	RT-qPCR
BcPG1 fwd	5'-CCCTCTCCGGCATTACATCC-3'	RT-qPCR
BcPG1 rev	5'-CGTTGGTAGCACTGGAGGAG-3'	RT-qPCR
BcPG2 fwd	5'-TCAAACCGGCACCAAAGTT-3 '	RT-qPCR
BcPG2 rev	5'-CCAAGTCCATCCCACCATCT-3'	RT-qPCR
BcPG3 fwd	5'-CTCAGCTTCCACTGGTCTCC-3'	RT-qPCR
BcPG3 rev	5'-GCAACAGTAGCCAAGGTGGT-3'	RT-qPCR
BcPNL1 fwd	5'-AGCTTGTCAACTGGCTCTCC-3'	RT-qPCR
BcPNL1 rev	5'-GTTGGAGATGGTGACACGGT-3'	RT-qPCR

## **Infection experiments**

For all infection experiments, spores of each strain were harvested from 2 weeks old PDA cultures. For pathogenicity assays, RT-qPCR experiments and colorations, detached leaves were inoculated on their upper surface with 20  $\mu\text{L}$  drops containing  $5.10^5$  conidia/mL in  $\frac{1}{2}$  Potato dextrose broth (PDB, Difco). Leaves were then kept in Petri dish under high humidity conditions and daylight at 23°C. Fungal DNA quantification in infected leaves was performed according to Gachon & Saindrenan (2004). For OG production experiments, triplicates of 2 detached leaves were directly immersed in 7 mL of a *B. cinerea* spores suspension containing  $3.10^5$  conidia/mL in Gamborg's B5 basal medium, 2% fructose and 10 mM phosphate buffer pH 6.4. Samples were incubated at 23°C on a rotary shaker at 80 rpm for 20 h as described in Voxeur *et al.*, 2019. For OG production analysis on leaves infected with drops of spores, experiments were set as described for pathogenicity assays and leaves were collected at 3 days post-inoculation and directly immersed with 50 % Ethanol prior to OG analysis.

## **DAB and BT coloration experiments**

For coloration assay, leaves were infected as described above and cut in half 24 h after inoculation prior to coloration. Detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production was achieved by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. Briefly, samples were immersed in an aqueous solution containing 1 mg/mL DAB (ph 3.6, Sigma) and incubated overnight at RT on a rotary shaker. To destain the leaves, chlorophyll was extracted by incubation in 75% ethanol. To detect cell death, Lactophenol Trypan Blue (TB, Sigma) was performed as described in Chassot *et al.*, 2008. Pictures were taken on a ZEISS Axio Zoom V16.

## **Gene expression analysis**

For RT-qPCR, in each condition total RNA was extracted from a pool of 8 leaves and extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). Three independent biological replicates were analysed. Reverse transcription was performed using an oligo-dT20 for a primer and Superscript II RNaseH-reverse transcriptase (Invitrogen). PCR was performed on a Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System with SYBR Green PCR MasterMix (Eurogentec). Each reaction was performed on a 1:20 dilution of the cDNA, synthesized as described above, in a total reaction of 5  $\mu\text{L}$ . For quantification, the standard curve method was used. Gene expression values were normalized to expression of the *A. thaliana* *AtAPT1* and *AtUBI4* genes or *B. cinerea* *BcACTA* and *BcUBI* (Ren *et al.*, 2017). We obtained similar results with both genes, therefore results with only one reference gene are shown. Specific primer sets are given in Table S1.

## **Analysis of OGs production**

After 20 h of incubation of the leaves in a suspension of spores an equal volume of ethanol 96% was added in order to precipitate the largest molecules. Analysis of OG production was performed as described in Voxeur *et al.*, 2019.

## **Cell wall enzymatic fingerprinting**

The cell wall of *A. thaliana* plant leaves grown in low N conditions or high N conditions was analysed by cell wall enzymatic fingerprint as described in Paterlini *et al.*, 2022.

**Table S1:**

BcPNL2 fwd	5'-TCGTGTCATCGTTCTCACCA-3'	RT-qPCR
BcPNL2 rev	5'-TGGAACCCTCACCGATCAAA-3'	RT-qPCR
BcPNL3 fwd	5'-CAACCAGGCTCTTCGATTG-3'	RT-qPCR
BcPNL3 rev	5'-CACAATGTGTTTCCTGCCGA-3'	RT-qPCR
BcPNL4 fwd	5'-AGCTGGCAGACTCACAATCT-3'	RT-qPCR
BcPNL4 rev	5'-GGCCTGCGACATTGTAGAAG-3'	RT-qPCR
BcPNL5 fwd	5'-AGCCGTCTAATGGTGGTCAA-3'	RT-qPCR
BcPNL5 rev	5'-CCAAACATGTGCAGGGTTCA-3'	RT-qPCR
AtAPT1 fwd	5'-CCTATTGCGTTGGCTATTG-3'	RT-qPCR
AtAPT1 rev	5'-TCTTCACTCCTACTCGTTC-3'	RT-qPCR
AtUBI4 fwd	5'-TGACACCATCGACAACGTGA-3'	RT-qPCR
AtUBI4 rev	5'-GAGGGTGGACTCCTTCTGGA-3'	RT-qPCR
AtPDF1.2 fwd	5'-TTTGCTTCATCATCACCTTATCTT-3'	RT-qPCR
AtPDF1.2 rev	5'-ACACTTGTGTGCTGGGAAGA-3'	RT-qPCR
AtPR1 fwd	5'-CTGGCTATTCTCGATTTTAAATCG-3'	RT-qPCR
AtPR1 rev	5'-TCCTGCATATGATGCTCCTTATTG-3'	RT-qPCR
AtPAD3 fwd	5'-CCTCGTCCTTACCCTGA-3'	RT-qPCR
AtPAD3 rev	5'-GAAGCTTCTTTGGACCCGGA-3'	RT-qPCR
AtWRKY70 fwd	5'-CCCAAGAAGTTACTTTAGATGCAC -3'	RT-qPCR
AtWRKY70 rev	5'- TTGCTCTTGGGAGTTTCTGC-3'	RT-qPCR
AtJOX3 fwd	5'- GAACCAGCTCCTCATGCTTT-3'	RT-qPCR
AtJOX3 rev	5'- GGGTTCACATCACTCTGTG-3'	RT-qPCR

## **ACKNOWLEDGMENTS**

A.D was supported by a doctoral fellowship. This work benefited from the support of IJPB's Plant Observatory technological platforms. IJPB received support from Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

## Chapitre III: La protéase *BcACPI* de *B. cinerea* présente des rôles opposés lors de l'infection d'*A. thaliana* en fonction de la nutrition en nitrate de la plante

---

Dans ce chapitre j'ai réalisé la caractérisation fonctionnelle de la protéase glutamique BcACPI de *B. cinerea* afin de comprendre son rôle dans la modulation de la sévérité de la maladie chez *A. thaliana* par la nutrition azotée de la plante. Rolland *et al* (2008, 2009) ont précédemment mis en évidence par des travaux *in vitro* sur cette protéase sa forte régulation selon la disponibilité en carbone, en soufre et en azote ainsi que le pH. Mon travail sur la nutrition azotée de la plante s'appuie sur des précédents résultats de l'équipe ayant montré une forte régulation de l'expression de *BcACPI* en fonction de la nutrition azotée de la plante lors de la phase précoce de l'infection (Soulié *et al.*, 2020). Cette dernière étude avait également révélé le rôle de *BcACPI* dans la virulence en caractérisant un mutant de ce gène.

Mon analyse du phénotype de ce mutant ainsi que de l'expression de ce gène sur un panel d'accession naturelles d'*A. thaliana* a permis de mettre en évidence une régulation de son rôle en fonction de la nutrition azotée lors de l'interaction, cette protéase pouvant agir soit comme facteur de virulence soit comme facteur d'avirulence. L'analyse de l'apoplasme de plantes cultivées à fort nitrate lors de l'infection avec la souche sauvage du champignon, décrite dans le chapitre I, a été réalisée en parallèle avec la souche mutante  $\Delta Bcacp1$ . Grâce à ces données, des cibles potentielles de la protéase chez la plante ont pu être identifiées dans ce compartiment. Ces résultats permettent de poser de nouvelles hypothèses sur le fonctionnement de cette protéase et sa contribution à la pathogénicité.

Comme les deux précédents chapitres, ce chapitre sera présenté sous format d'article bien qu'avant sa soumission il faille répéter certaines expériences et également rajouter des données complémentaires en cours d'obtention pour appuyer nos conclusions, comme notamment l'analyse comparée de l'apoplasme à faible et fort nitrate.

# **The *BcACP1* protease of *B. cinerea* has opposite roles during the infection of *A. thaliana* depending on plant nitrate supply.**

Antoine Davière<sup>ab</sup>, Sylvie Jolivet<sup>a</sup>, Gilles Clement<sup>a</sup>, Stephanie Boutet<sup>a</sup>, Thierry Balliau<sup>c</sup>, Mélisande Blein-Nicolas<sup>c</sup>, Louis Lambret<sup>a</sup>, Alexandre De Saint Germain<sup>a</sup>, Marie-Christine Soulié<sup>a,d,\*</sup> and Mathilde Fagard<sup>a,\*1</sup>

<sup>a</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), 78000, Versailles, France

<sup>b</sup>Ecole Doctorale 567 Sciences du Végétal, Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, bat 360, 91405 Orsay Cedex, France

<sup>c</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE-Le Moulon, PAPPSO, 91190, Gif-Sur-Yvette, France

<sup>d</sup>Sorbonne Universités, Pierre et Marie Curie Université Paris 06, UFR 927, 75005 Paris, France

**\* These authors contributed equally to this study**

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed, Email : [mathilde.fagard@inrae.fr](mailto:mathilde.fagard@inrae.fr).

Keyword : *Botrytis cinerea*, *Arabidopsis thaliana*, protease, nitrogen, virulence, avirulence



## ABSTRACT

Abiotic factors have a strong influence on plant-pathogen interactions. In the case of plant nitrogen nutrition, high nitrogen fertilization can either increase or reduce disease severity depending on the pathosystem. Using the model plant *A. thaliana*, for which high nitrate nutrition increases the susceptibility to *B. cinerea*, we showed that during the infection process the expression of the fungal glutamic protease *BcACP1* was strongly impacted by plant nutrition. By infecting 21 natural plant accessions with a p*BcACP1*::GUS strain, we observed opposite correlations between *BcACP1* expression and lesion size depending on plant nitrate fertilization. Accordingly, pathogenicity tests with the  $\Delta BcACP1$  mutant strain revealed a reduced susceptibility of the plant in low N and the opposite in high N suggesting a nitrogen dependent dual role of *BcACP1* as pathogenicity factor or avirulence factor promoting plant resistance. To better understand this phenomenon, we used an apoplastic proteomic and metabolomic approach which enables us to select putative plant protein targets of this secreted protease. These proteins were involved in chitin degradation, cell wall remodelling and plant defense regulation. Future work on these candidates and *BcACP1* would enable the comprehension of the impact of plant nitrogen supply on this fungal protease.

## INTRODUCTION

Nitrogen is an essential nutrient for plant growth and development. It can be assimilated in the form of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) or ammonia ( $\text{NH}_4^+$ ) by root transporters and is redistributed to all plant organs (Xuan *et al.*, 2017). The intensive use of nitrogen in the industrial agricultural system since the beginning of the XIX century led to greater crop yields but also caused strong environmental pollution such as freshwater eutrophication, greenhouse gas emission and soil salinization (Paerl, 2009). Furthermore, in some crop high nitrogen fertilization of the plants induced the emergence of diseases. Indeed, abiotic factors influence plant disease severity (Suzuki *et al.*, 2014). In the case of nitrogen fertilization, it was shown that not only the quantity but also the form of nitrogen can impact host-pathogen interaction (Sun *et al.*, 2020). For example, the symptoms of the rice blast disease caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* increased upon high nitrogen fertilization (Long *et al.*, 2000). Similarly high nitrogen nutrition results in higher susceptibility of tomato to *Oidium lycopersicum* and *Pseudomonas syringae pv tomato* (Hoffland *et al.*, 2000). Furthermore for *P. syringae pv tomato* the use of ammonium over nitrate also reduced the susceptibility of the plant (Fernández-Crespo *et al.*, 2015). In the interaction between *Botrytis cinerea* and its hosts, high nitrogen fertilization can either reduce the susceptibility of the plant as it is the case for tomato or increase the susceptibility as observed on lettuce, *Arabidopsis thaliana*, grapevine and strawberry (Fagard *et al.*, 2014; F. Lecompte *et al.*, 2013; Soulie *et al.*, 2020; Vega *et al.*, 2015).

This interaction between plant nitrogen nutrition and disease severity can be partly explained by modifications of the plant growth and defense strategies either promoting resistance in one nitrogen regime or susceptibility in another. It was shown in several pathosystems that the hormonal defense pathways involving jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) play a significant role in this multi-stress combination (Farjad *et al.*, 2018; Fernández-Crespo *et al.*, 2015; Soulie *et al.*, 2020). The regulation of primary and secondary metabolism also plays a role in the crosstalk between defense and nitrogen nutrition (Lecompte *et al.*, 2013; Marino *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019). Moreover, intra-species variability can influence plant responses to nitrogen nutrition and its impact on plant defense. Frontini *et al.* (2022) showed that the nitrogen-induced susceptibility of rice to *M. oryzae* varies in a panel of genotypes and it was correlated to the post-flowering nitrogen uptake efficiency of these genotypes. Another recent study on the genetic variation of the response to nitrogen nutrition on *A. thaliana* revealed a strong variability in the accumulation of glucosinolates which are specialized metabolites involved in plant immunity (Katz *et al.*, 2022). Thereby the use of multiple plant genotypes appears crucial to decipher between common and specific responses to nitrogen and pathogen interaction in a model plant.

Plant nitrogen nutrition also impacts pathogens capacities to produce virulence determinants which contributes to differences in disease severity (Zarattini *et al.*, 2021). Indeed, it was shown during infection with *Fusarium oxysporum* that high nitrate fertilization of cucumber plants reduced the production of the fungal toxins fusaric acid (Zhou *et al.*, 2017). Likewise, a recent study showed that the expression of genes involved in the T3SS secretion system of *Erwinia amylovora* is affected by plant nitrate supply (Farjad *et al.*, 2021). In some cases, modulation of pathogen virulence factors expression by plant nitrogen supply can be correlated to differences in nitrogen accessibility for the pathogen. It was shown that several pathogen virulence factors are under the control of nitrogen catabolic repression such as aflatoxin production of *Aspergillus flavus* (Fasoyin *et al.*, 2019). Oh *et al.* (2017) showed that expression and secretion of *M. oryzae* pathogenicity factors such as small protein effectors are induced upon nitrogen starvation which can contribute to the better development of the disease on plants grown with low nitrate supply. However, nutrient availability for the pathogen cannot totally explain virulence factors regulation by plant nitrogen fertilization. Indeed, we showed in a previous study that *B. cinerea* genes that were differentially expressed *in planta* depending on the plant nitrate supply were not necessarily affected *in vitro* by nitrate availability (Soulie *et al.*, 2020).

The broad host range necrotrophic pathogen *B. cinerea* is one of the most scientifically and economically important fungal pathogen (Dean *et al.*, 2012). Its infectious process relies on the

production of numerous molecules such as toxins, reactive oxygen species (ROS), cell wall degrading enzymes (CWDE) and cell-death inducing proteins (CDIPs) (Bi *et al.*, 2022). There are also evidences that this fungus manipulates plant immunity to its advantage *via* cross-kingdom RNAi and by inducing plant programmed cell-death (Govrin & Levine, 2000; Qin *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2017). Since the use of nitrogen fertilization affects its interaction with host plants, understanding the molecular mechanisms involved would enable a more efficient control of the disease and limit the losses caused by this fungus. We previously showed that the SA and JA defense pathway were involved in the reduced susceptibility to this fungus of *A. thaliana* plants grown with a limitation in nitrate (Soulie *et al.*, 2020). On the other hand, 22 genes of the fungus were found differentially expressed, including *BcACP1* a secreted glutamic protease that we showed to be involved in pathogenicity. Before that, no secreted protease of the fungus was demonstrated to be involved in pathogenicity, even the *BcAP8* aspartic protease which was found to be the most abundant protein in the *B. cinerea* early secretome (Espino *et al.*, 2010; Have *et al.*, 2010). *In vitro* characterisation of the *BcACP1* protease revealed that it is under the control of sulphur, nitrogen and carbon catabolic repression and that its expression and maturation are regulated by the pH (Rolland *et al.*, 2009; Rolland & Bruel, 2008).

In this study, we focused on the role of *BcACP1 in planta* and its contribution to the interaction between *A. thaliana* nitrogen nutrition and *B. cinerea* infection. By the study of multiple plant accessions, we observed a dual activity of this protease depending on nitrate nutrition acting either as a pathogenicity factor or as an avirulence factor. Finally, the analysis of the initial non-destructive apoplastic phase of the fungus enabled us to identify putative protein targets of *BcACP1* that could explain its particular role in plant defense activation and pathogenicity.

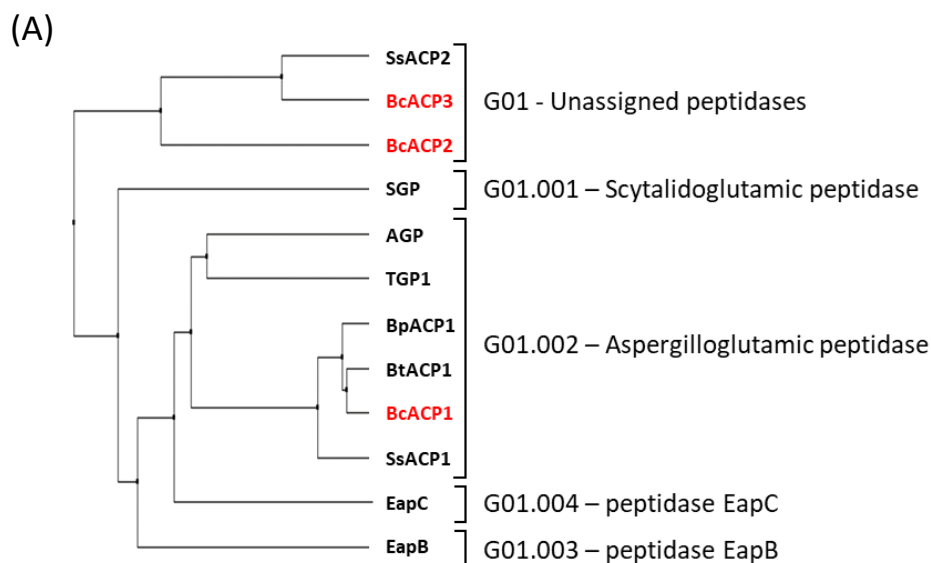
## RESULTS

### Regulation of *BcACP1* and its homologs during *B. cinerea* infection on wild-type *A. thaliana* Col-0 accession

The *BcACP1* protease (Bcin15g02380) of *B. cinerea* is part of the glutamic protease family identified as the G01 family in the MEROPS database of proteases and the subfamily aspergilloglutamic protease (G01.002). Among other species of the genus *Botrytis* such as *B. tulipae* and *B. porri*, which possess orthologs of *BcACP1*, *B. cinerea* is the only species that possesses two other unassigned glutamic proteases that we named *BcACP2* and *BcACP3* (Figure S1A, B).

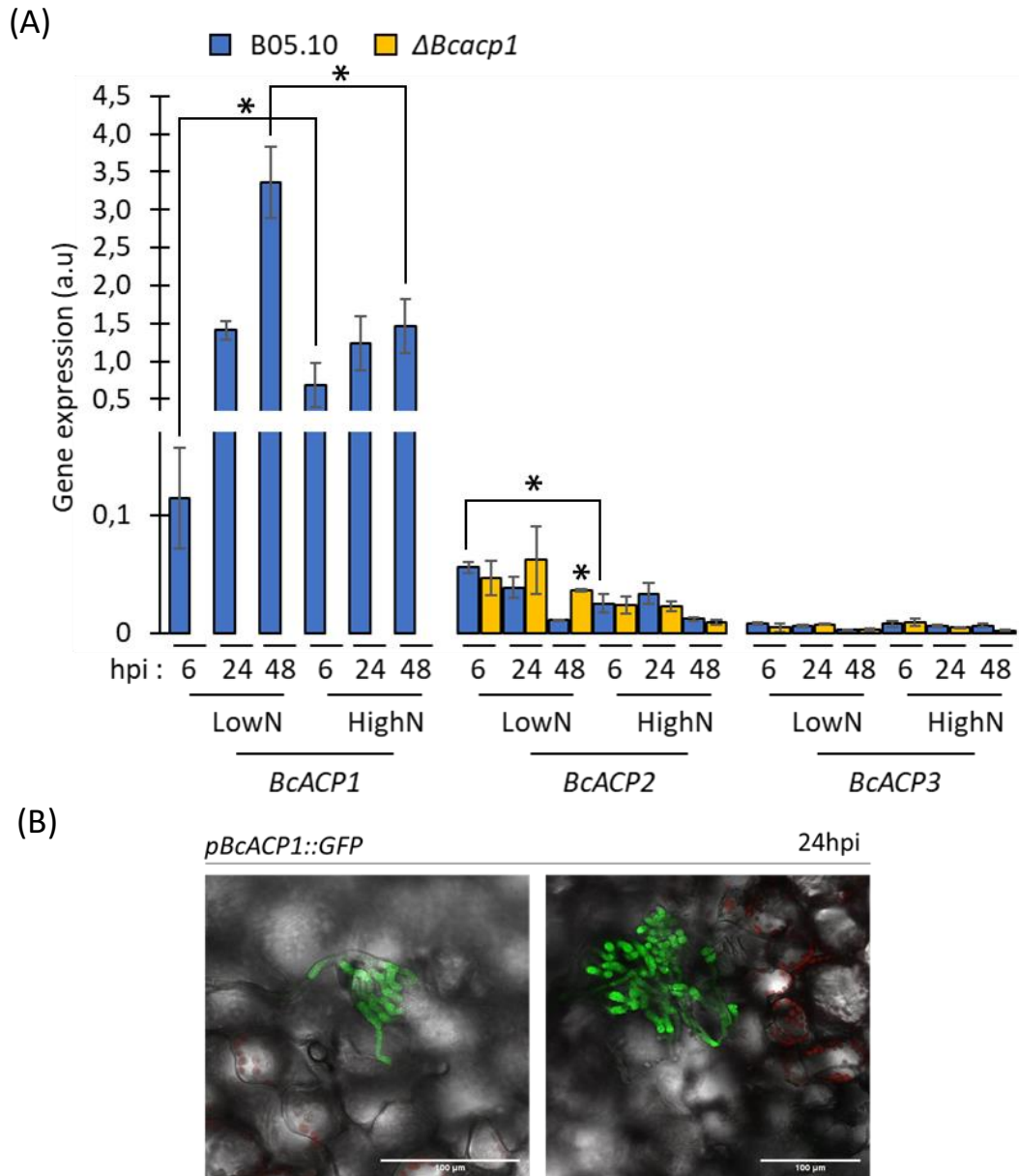
Since *BcACP1* was found to have a role in pathogenicity on *A. thaliana* (Col-0) and to be regulated by host nitrogen nutrition (Soulie *et al.*, 2020), we analysed the expression of its two paralogs, *BcACP2* (Bcin05g03580) and *BcACP3* (Bcin07g02280), in these conditions. As shown before, with the WT strain at 6 hpi, *BcACP1* was more expressed in mycelium infecting plants grown with 10 mM nitrate (high N) compared to plants grown with 0.5 mM nitrate (low N) (Figure 1A). Interestingly, at a later time point (48 hpi), we observed a shift of this regulation leading to a stronger expression of *BcACP1* in low N conditions compared to highN. Furthermore, by the study of a *pBcACP1::GFP* strain obtained by CRISPR-Cas9 (Figure S2), we observed a strong localized expression of *BcACP1* in infectious cushions of the fungus during infection in both nitrate conditions (Figure 1B). Concerning *BcACP2* and *BcACP3* expression levels which were weaker than *BcACP1*, a higher expression was observed only at 6 hpi in low N compared to high N conditions for *BcACP2* but not for *BcACP3* (Figure 1A). Then, we analyzed the expression of *BcACP2* and *BcACP3* in the  $\Delta BcACP1$  mutant to research a potential compensation. With the  $\Delta BcACP1$  mutant strain we only observed a higher expression of *BcACP2* in low N at 48 hpi suggesting a compensation in this condition where *BcACP1* is in its highest level of expression in the WT strain.

To conclude, *BcACP2* and *BcACP3* were not impacted by plant nitrate conditions as strongly as *BcACP1*. The weaker expression of these *BcACP1* paralogs and the absence of significant compensation at the transcriptional level in the  $\Delta BcACP1$  mutant suggested that *BcACP1* is the main glutamic protease of *B. cinerea*.









**Figure 1: Gene expression analysis of the *B. cinerea* glutamic protease family during *A. thaliana* infection.** (A) Expression kinetic of *BcACP1*, *BcACP2* and *BcACP3* genes in the WT strain (B05.10) and *BcACP2* and *BcACP3* genes in the  $\Delta Bcacp1$  mutant strain during infection of *A. thaliana* plants grown with 0.5 mM (LowN) or 10 mM (HighN) nitrate. Each gene target was normalized with *BcActA* and similar results were obtained when normalization was done with *BcUBI*. Three independent experiments were conducted with similar results. In each condition, two-sample t-test was conducted, unless bar indications, between B05.10 and the  $\Delta Bcacp1$  mutant strain: \* $p < 0,05$ . (B) Confocal microscopy of a *pBcACP1::GFP* reporter strain showing strong fluorescence in infection cushions at 24 hpi on *A. thaliana* grown in low N conditions (left panel) and high N (right panel). Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

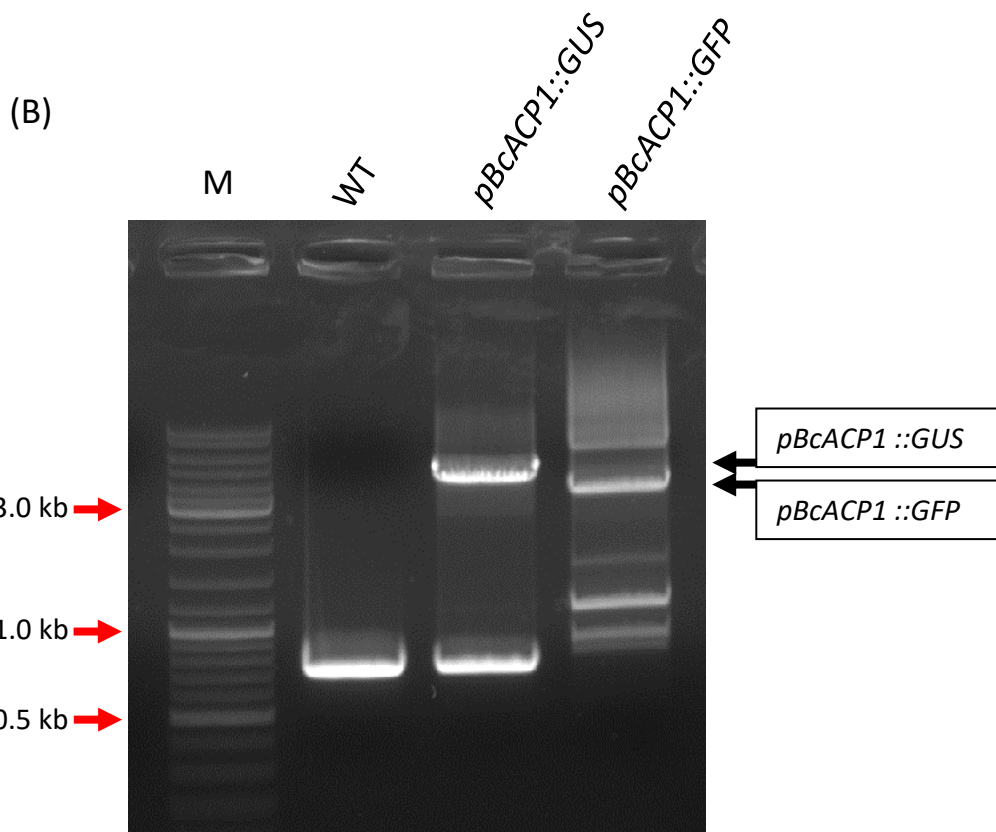
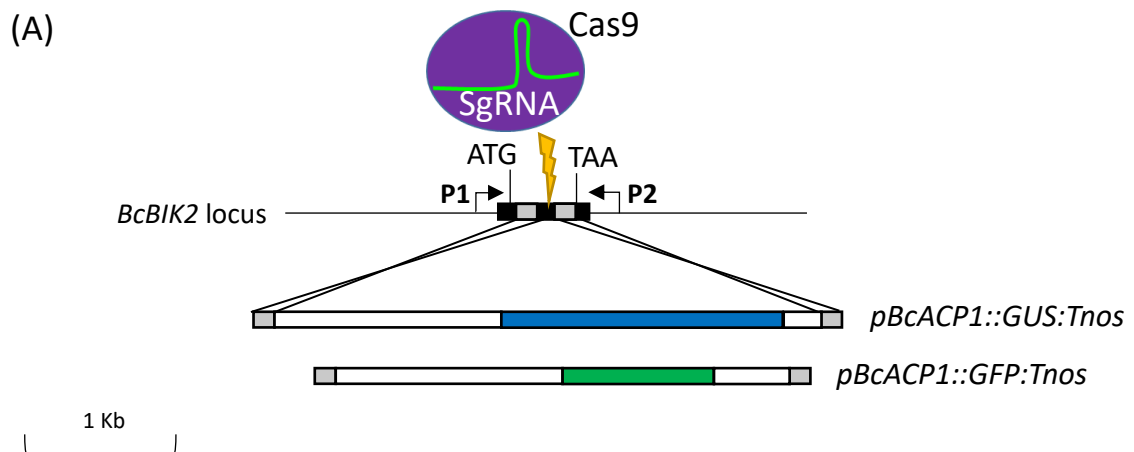
## Opposite correlations between *BcACP1* and pathogenicity depending on plant nitrate nutrition in 21 natural accessions of *A. thaliana*

In order to better understand the contribution of *BcACP1* in pathogenicity we characterized its role during the infection on different plant natural accessions in both nitrate nutrition status. For this purpose, we selected 21 accessions of *A. thaliana* as a core collection to assess the natural variability of this plant species. Firstly, we had to investigate the response of these accessions to the combination of nitrate variations and *B. cinerea* infection. Independently of nitrate conditions, we observed a strong variability among genotypes in susceptibility to *B. cinerea*, going from Bur-0 to Pyl-1 that presented respectively the lower and the stronger susceptibility to *B. cinerea* (Figure 2). Regarding the impacts of nitrate nutrition, the large number of conditions tested imposed a limitation on the number of technical replicates which reduced the significance of the statistical test performed. Indeed, for some accessions such as Col-0 for which we previously demonstrated the impact of nitrate nutrition on susceptibility to *B. cinerea* (Soulie *et al.*, 2020), the differences were not significant. However, the analysis of the trend on a majority of plant accessions showed that the increase in nitrate supply increased the susceptibility to *B. cinerea* (Figure 2).

Then, since host natural variability impacted plant susceptibility to *B. cinerea*, we hypothesized that it would also impact the expression of pathogenicity factors such as *BcACP1*. Using a *pBcACP1::GUS* reporter strain of the fungus obtained by CRISPR-Cas9 targeted insertion (Figure S2) we analysed the expression of *BcACP1* by GUS coloration concomitantly with the pathogenicity on our pool of accessions. Analysis of GUS coloration intensity 24 h after inoculation revealed that at this time point seven accessions presented a stronger expression of *BcACP1* in highN conditions (Figure 3A) contrary to Col-0 for which at this time point no difference is observed between low N and high N conditions, consistently with what was observed by RT-qPCR (Figure 1A). When we combined the data of GUS activity and lesion sizes obtained with the *pBcACP1::GUS* reporter strain of the fungus, we observed a positive correlation between lesion size and *BcACP1* expression during infection of the *A. thaliana* natural accession population when plants were cultivated in low N conditions, a Pearson test revealed that this correlation was weak but significant with a coefficient of 0.23 (Figure 3B). Surprisingly, in high N conditions the correlation was negative with an estimated coefficient of -0.25, which means that an increase in *BcACP1* expression led to a reduction of lesion size (Figure 3B). These results suggested that *BcACP1* could promote disease severity at low N while reducing it at high N.

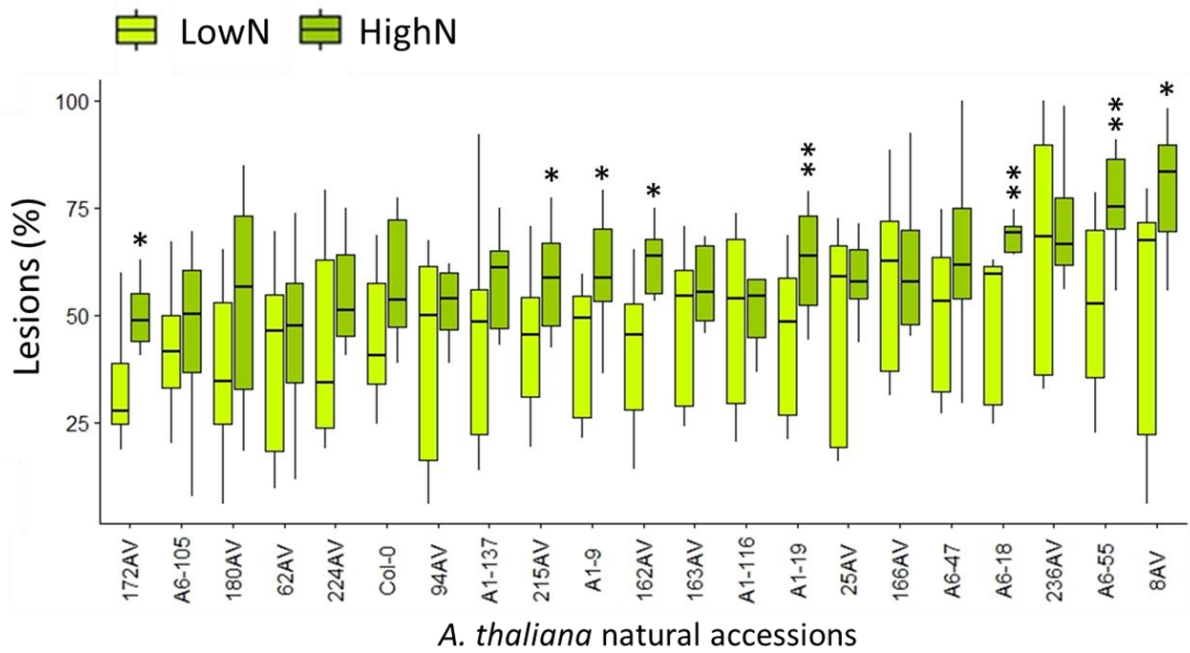
To go further, we analysed the susceptibility of our different plant natural accessions to the  $\Delta BcACP1$  mutant compared to the WT strain B05.10. As shown in Figure 4, we observed a common trend for the majority of *A. thaliana* accessions that had at low N a reduced susceptibility when infected with the  $\Delta BcACP1$  mutant compared to the WT, whereas at high N it was increased. For Col-0, even if the trend was visible, the differences were not significant even though a reduced susceptibility toward the  $\Delta BcACP1$  mutant was observed in a previous study on plants grown with 2 mM nitrate (Soulie *et al.*, 2020). Our results could be explained by a lack of technical replicates in each experiment. However, differences of susceptibility to the  $\Delta BcACP1$  mutant depending on plant nitrate nutrition were significant for Jea, Shahdara and A1-9 (Figure 4).

To conclude, these results suggested that during the interaction between *B. cinerea* and *A. thaliana*, *BcACP1* contributes to pathogenesis on plants grown in low N conditions whereas it promotes plant resistance on plants grown in high N conditions. We could see here a dual role of *BcACP1* as virulence or avirulence factor depending on plant N regimes.

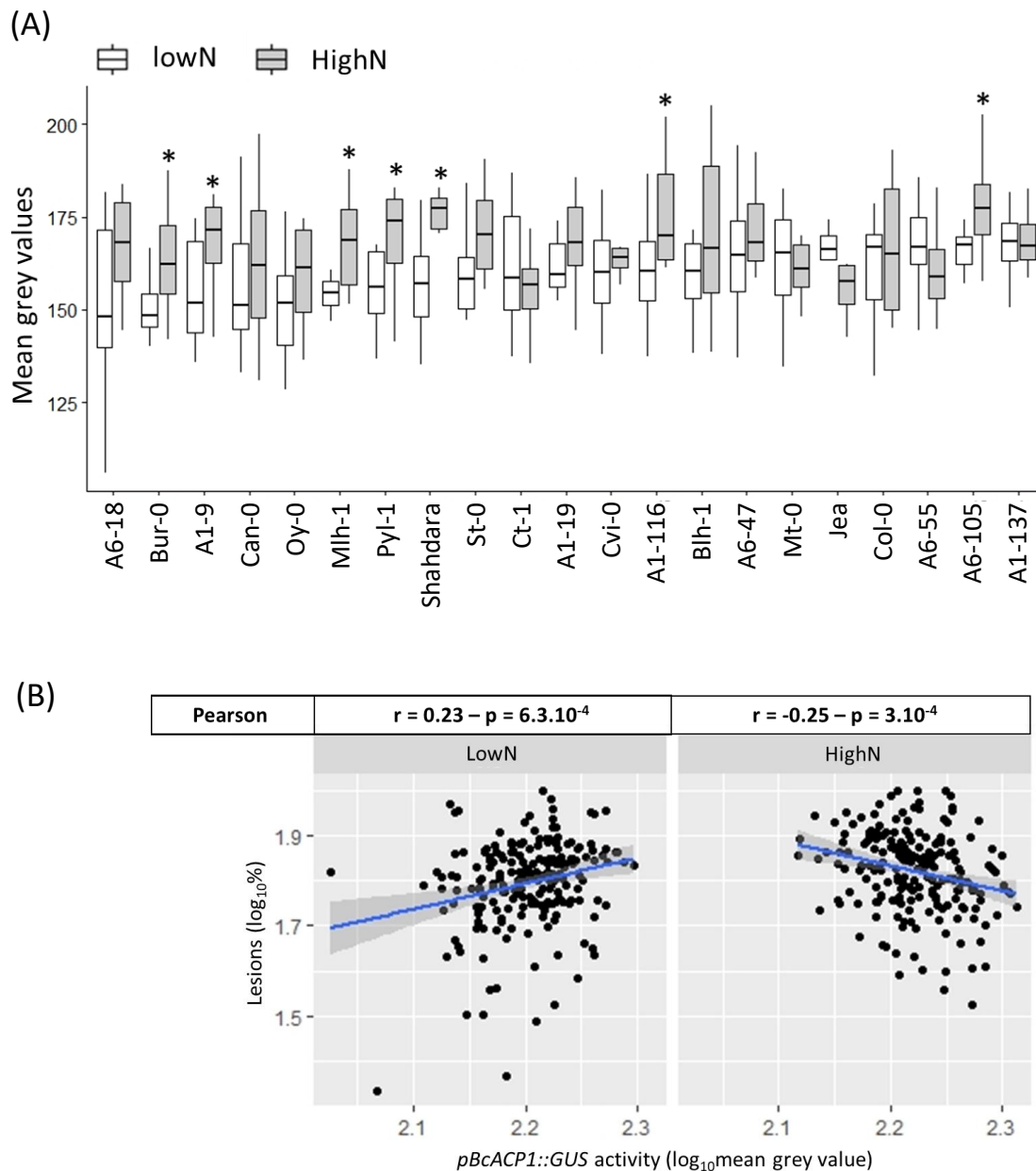


**Figure S2: Construction of reporter strains in *B. cinerea* by targeted insertion in the locus of the pseudogene *BcBIK2*.** (A) Representation of the replacement strategy used to obtain *pBcACP1::GUS* and *pBcACP1::GFP* strains (arrows indicate primers used for diagnostic PCR). (B) Diagnostic PCR showing successful integration of the constructs in the reporter strains used in this study.

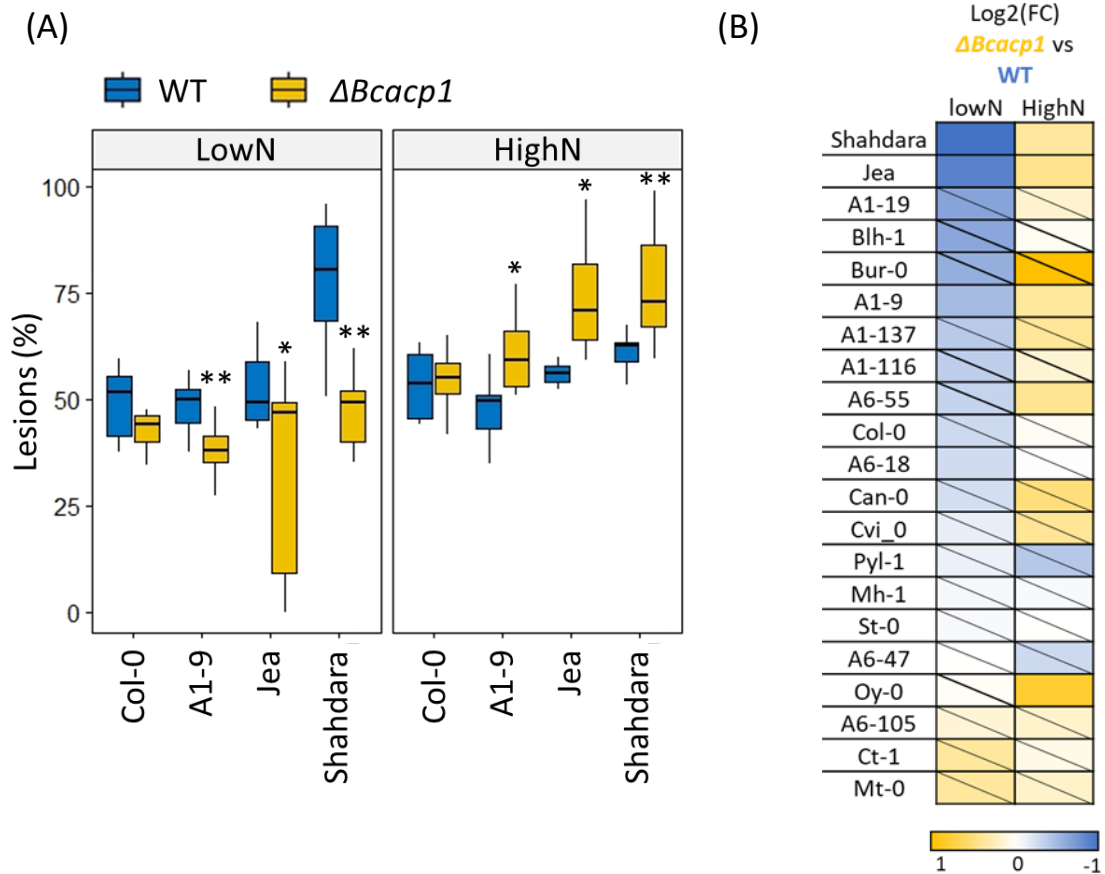




**Figure 2:** Pathogenicity test on detached leaves of 21 natural *A. thaliana* accessions 48 h after inoculation with *B. cinerea* B05.10 (WT) and impact of the plant nitrate status. *A. thaliana* plants were grown either with 0.5 mM nitrate (LowN) or 10 mM nitrate (HighN). Boxplots represent the results of 3 biological replicates each normalized in % of the largest lesion identified. For each accession, two-sample t-test was conducted between LowN and HighN: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 3: The correlation between the expression of the *B. cinerea* protease *BcACP1* and pathogenicity on a pool of *A. thaliana* natural accessions depend on plant nitrate supply.** (A) GUS activity measured by coloration intensity of leaves of the 21 accessions of *A. thaliana*, grown with lowN or highN, 24 hpi with a *pBcACP1::GUS* reporter strain of *B. cinerea*. Three biological replicates are represented and  $n = 10$  for each accession in each nitrate condition. (B) Correlation graph between GUS activity and lesion sizes 24 h after inoculation of *A. thaliana* accessions, grown with lowN or highN, with a *pBcACP1::GUS* reporter strain of *B. cinerea*. Three biological replicates are represented and lesions were normalized in % of the larger lesion identified in each replicate. Data were normalized in  $\log_{10}$ . 210 leaves (corresponding dots on the chart) were analysed in each nitrate condition. A Pearson correlation test was performed and the estimated coefficient ( $r$ ) and the  $p$ -value are indicated ( $p$ ).

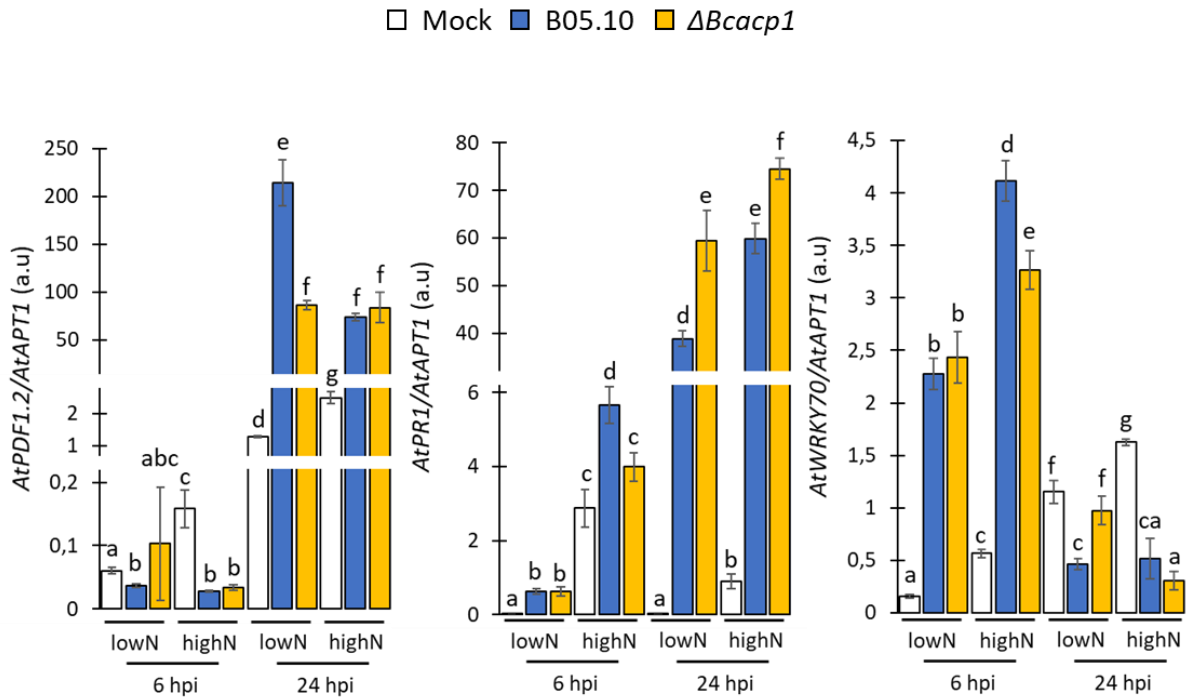


**Figure 4: Pathogenicity of the  $\Delta Bcacp1$  mutant strain on *A. thaliana* natural accessions highly depend on plant nitrate supply.** (A) Pathogenicity test at 48 hpi on four accessions of *A. thaliana* representatives of the results. Plants were grown either with 0.5 mM (LowN) or 10 mM nitrate (HighN) and infected with the WT (B05.10) strain of *B. cinerea* or the  $\Delta Bcacp1$  mutant. Boxplot represent the infection lesions of four biological replicates normalized in percentage compared to the largest lesion observed in each replicate. Unpaired t-test was performed between the WT and the  $\Delta Bcacp1$  mutant : \* $p < 0.05$ . (B) Heat map representing the log2 fold changes of symptoms observed with the  $\Delta Bcacp1$  mutant strain compared to the WT at 48 hpi on all the different *A. thaliana* accessions grown with LowN or HighN. Unpaired t-test was performed between the WT and the  $\Delta Bcacp1$  mutant, insignificant ( $p > 0.05$ ) differences are represented by crossed out boxes. Data used for (A) and (B) are derived from six biological replicates normalized in percentage compared to the largest lesion observed in each replicate.

## ***BcACPI* deletion impacts the activation of the SA and the JA defense pathways during the infection**

To better understand the differences in *A. thaliana* susceptibility to the  $\Delta BcACP1$  mutant caused by the plant nitrate supply, we investigated plant defense gene expression under low and high nitrate supply conditions. It was shown previously that defense pathways mediated by JA and SA were implicated in differences of in Col-0 susceptibility depending on nitrate regimes (Soulie *et al.*, 2020). Thereby, we analysed in Col-0 the expression of markers of these pathways in response to the  $\Delta BcACP1$  mutant in plants grown under low or high N. At an early time-point (6 hpi), *AtPDF1.2a*, which is a marker gene of the JA pathway, was slightly repressed by the infection in both nitrate conditions and no differences were observed in Col-0 in response to the WT and the mutant strains. At a later time-point (24 hpi), we found that *AtPDF1.2a*, which was strongly induced by the infection, was less expressed in response to the  $\Delta BcACP1$  mutant compared to the WT in low N conditions whereas it followed the WT-infected level in high N (Figure 5). Consequently, at 24 hpi *AtPDF1.2a* was not regulated differently by nitrate nutrition in response to the  $\Delta BcACP1$  mutant contrary to the WT strain where *AtPDF1a* was more expressed in low N. These differences in JA pathway activation in the late infection phase might be explained by the reduced pathogenicity of the  $\Delta BcACP1$  mutant at low N. Concerning *AtPRI*, a marker gene of the SA pathway, we observed at both time points a stronger induction of this gene by the infection in high N compare to low N (Figure 5). At 6 hpi and in in high N, *AtPRI* expression in response to the mutant strain was weaker compared to the WT. Then, we observed at 24 hpi a stronger induction of *AtPRI* in response to the  $\Delta BcACP1$  mutant in both nitrate conditions. Thereby, activation of the SA pathway in the initial phase of the infection with the mutant is affected in a N dependent manner. We then investigated the expression of *AtWRKY70* which is involved in the JA-SA crosstalk. Indeed, JA and SA can respectively repress and induce *AtWRKY70* expression and it can respectively repress and induce JA and SA inducible genes (J. Li *et al.*, 2004). Compared to the mock, we found a strong induction of this gene at 6 hpi by the infection in both nitrate conditions but at high N, *AtWRKY70* expression was weaker in response to the mutant compared to the WT. At 24 hpi, *AtWRKY70* expression was repressed by the infection with the WT (Figure 5) and a similar repression was visible in response to the  $\Delta BcACP1$  mutant at high N. However, at low N we didn't observe the repression of *AtWRKY70* expression with the mutant but only with the WT.

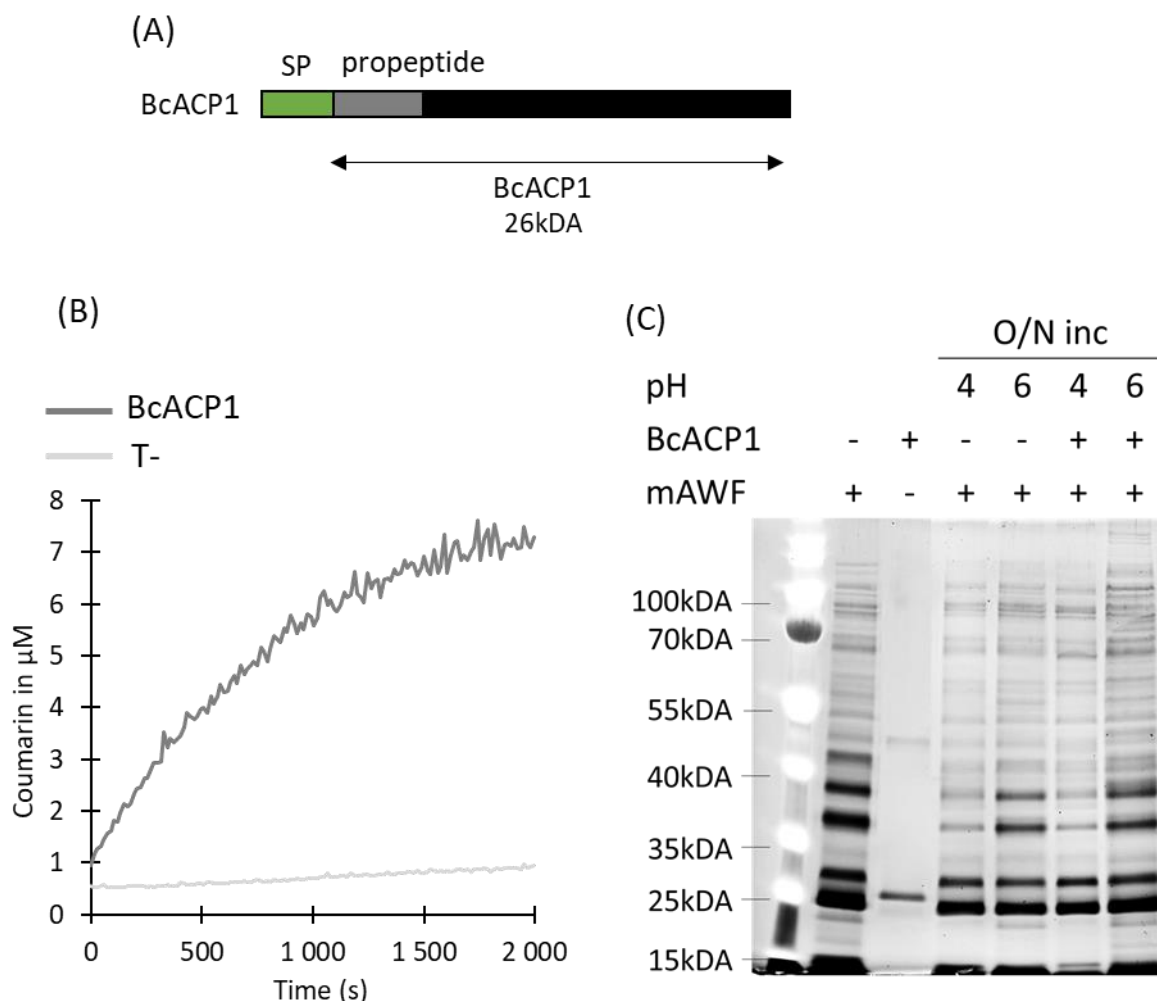
Altogether, at 6 hpi our results suggested no differences in JA pathway activation between the mutant and the WT whereas we observed for the SA pathway a weaker activation in response to the  $\Delta BcACP1$  mutant in high N. Then at 24 hpi the JA pathway was less activated with the mutant in low N resulting in a loss of N regulation whereas for the SA pathway a stronger activation was found with the mutant in both N regimes. Thus, the SA dependent response of the plant was affected early during infection with the mutant whereas differences were observed latter for the JA dependent response, both being dependent on plant nitrate supply. Early differences in SA activation between the  $\Delta BcACP1$  mutant and the WT could be more likely involved in the phenotype of the mutant.



**Figure 5: Differences in expression of plant gene related to hormone defense pathways obtained by RT-qPCR.** Plant genes expression levels were analysed during infection of *A. thaliana Col-0* plants grown with low or high nitrate supply after 6 h and 24 h of inoculation with the WT strain B05.10 or the  $\Delta Bcaccp1$  mutant strain of *B. cinerea*. Each plant gene target was normalized with *AtAPT1*. Similar results were obtained when normalization was done with *AtUBI4*. Three independent experiments were conducted with similar results. Letters indicates the results obtained with an unpaired t-test ( $p < 0.05$ ).

## Protease activity and specificity of the purified BcACP1 protease

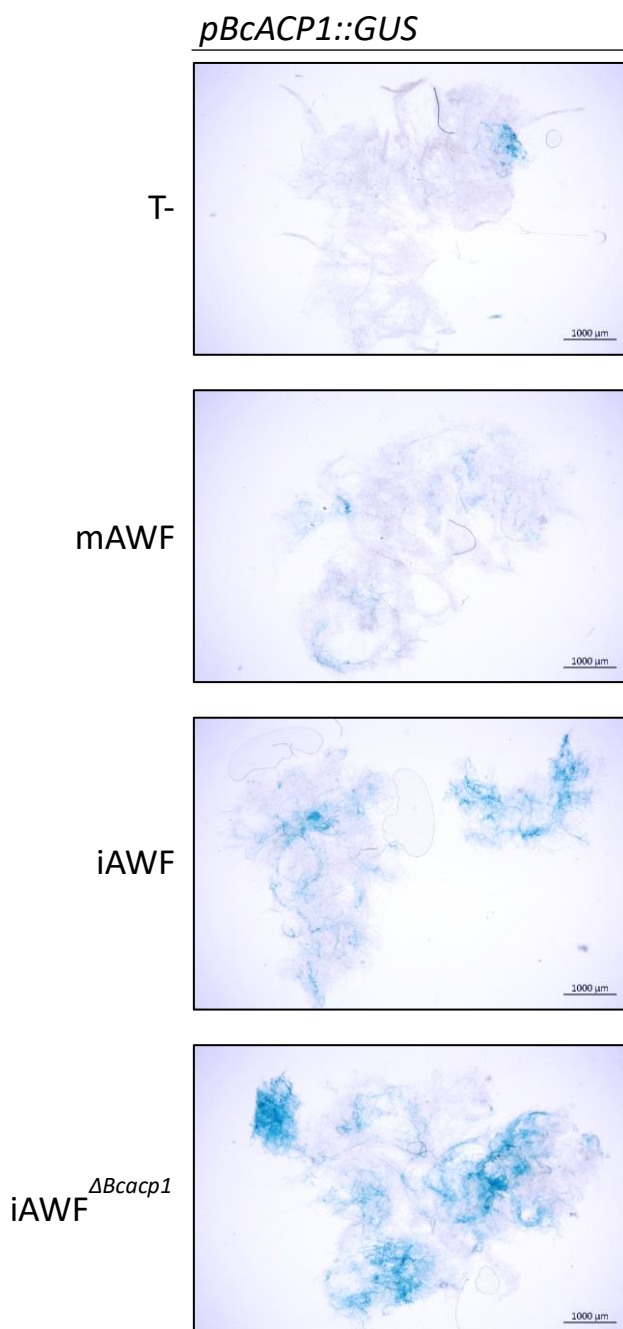
Since BcACP1 is a protease, we hypothesized that at least part of its role in pathogenicity is mediated by degradation of plant protein targets. To confirm its protease activity, we expressed and purified the protein in *E. coli*. Then we tested its activity by following the hydrolysis of a fluorescent probe GC522 and the release of coumarin by cleavage of an ester bond mimicking a peptide bond (de Saint Germain *et al.*, 2021). As shown in Figure 6B, we were able to confirm BcACP1 protease activity with this test. We also hypothesized that BcACP1, which is secreted early in the interaction (Espino *et al.*, 2010), would have protein targets in the apoplastic compartment. Thereby we tried to observe protein degradation on a protein gel after SDS-PAGE of pre-incubated apoplastic washing fluid extracts (AWF) of uninfected *A. thaliana* leaves (mAWF) with the purified BcACP1 protein. We observed no clear band differences in the protein profiles of mAWF proteins with or without the BcACP1 protein in both acidic pH tested (Figure 6C). These results suggested that BcACP1 is not a highly active generalist protease and that its targets might be low-abundance proteins.



**Figure 6: Purification of BcACP1 in *E. coli* and analysis of protease activity on a synthetic substrate of mAWF.** (A) schematic representation of cloned and purified proteins in *E. coli*. (B) Protease activity of 1 $\mu$ M of protein followed by the hydrolysis of the fluorescent probe GC522 in coumarin. (C) Protein gel showing the results of an *in vitro* digestion assay of apoplastic proteins by purified BcACP1. mAWF extracts were incubated over night with or without BcACP1 purified protein in buffer at pH4 or pH6 before SDS-PAGE. Experiments were repeated twice with similar results.

## Proteomic and metabolomic analysis of AWF extracts revealed putative targets of the BcACP1 protease

To detect low-abundance proteins that could be targets of BcACP1 we compared the apoplastic protein content of leaves at 6 hpi with the WT (iAWF) or with the  $\Delta Bcaccp1$  mutant (iAWF $^{\Delta Bcaccp1}$ ). We selected high N condition for AWF extraction since at 6 hpi *BcACP1* is more expressed in this condition. We also analysed the metabolite content of the apoplast since it could help to reveal indirect targets of the protease. Interestingly we observed that growing the *pBcACP1::GUS* reporter strain of the fungus with the AWF extracts led to an induction of GUS activity with iAWF and a stronger one with iAWF $^{\Delta Bcaccp1}$  (Figure 7). This suggested that some inducers of *BcACP1* expression were produced in the apoplast after infection and more accumulated with the mutant than the WT strain. Likewise, the depletion of repressors of *BcACP1* expression in the apoplasm after infection could also explain the results.



**Figure 7:** GUS-staining of *B. cinerea* mycelium from a 48h liquid culture of the *pBcACP1::GUS* reporter strain in PDB with or without (T-) different AWFs extracts. AWF extractions were done 6 h after inoculation of *A. thaliana* leaves with a mock (mAWF), the WT strain of *B. cinerea* (iAWF) or the  $\Delta Bcaccp1$  mutant strain (iAWF $^{\Delta Bcaccp1}$ ). For AWF extraction, plants were grown at high N. AWF extracts used in this experiment were obtained with H<sub>2</sub>O as infiltration solution. Experiments were done with 4 biological replicates of AWFs and were repeated twice. Pictures were taken with the ZEISS Axio Zoom V16. Scale bar = 1000 $\mu$ m.

The metabolome analysis of AWF extracts obtained with ddH<sub>2</sub>O as infiltration buffer revealed 23 annotated primary metabolites differently accumulated between iAWF and iAWF<sup>*ΔBcacp1*</sup> (Table 1) and 45 putative specialized metabolites (data not shown) among which 9 were partly annotated (Table S1). The 23 primary metabolites were all more accumulated in iAWF<sup>*ΔBcacp1*</sup>. Among them we found 6 amino acids, including tryptophan which is a precursor of specialized metabolites, five sugars, known to be involved in plant-pathogen interactions and 8 organic acids, three of which are involved in the TCA cycle (citrate, 2-oxoglutarate, malate) and one (shikimate) which is a precursor of specialized metabolites of the shikimate and phenylpropanoid pathway (Table 1). Among the specialized metabolites we observed an important depletion in sinapate, which is involved in defense and can serve as precursor for lignin and other metabolites of the shikimate and phenylpropanoid pathway (Table S1).

**Table 1: Annotated primary metabolites significantly different in abundance between iAWF<sup>*ΔBcacp1*</sup> and iAWF extracts.** Log<sub>2</sub> fold change between iAWF<sup>*ΔBcacp1*</sup> and iAWF extracts are indicated.

Class	Annotation	Log <sub>2</sub> (FC)	
		iAWF <sup><i>ΔBcacp1</i></sup>	P_value
Amino acids	Tryptophan	0,48	2,92E-02
	Alanine	0,42	6,18E-03
	Glutamine	0,39	4,80E-02
	Asparagine	0,33	2,02E-02
	Arginine	0,29	1,80E-02
	beta-Alanine	0,26	9,12E-03
Sugars	Glucopyranose	0,58	3,19E-02
	Mannose	0,36	5,62E-03
	Fructose	0,34	9,24E-03
	Galactose	0,32	4,42E-02
	Xylose	0,28	2,59E-02
Organic acids	2-Oxoglutarate	0,40	1,28E-02
	Citrate	0,38	4,38E-02
	Malate	0,31	3,85E-02
	Glycerate	0,29	3,92E-03
	Shikimate	0,29	4,14E-02
	Ribonate	0,26	1,23E-02
	Galactonate	0,25	2,96E-02
	Erythronate	0,20	9,51E-03
Other	Glycerol-3-P	0,46	8,52E-04
	Adenine-1	0,36	2,66E-03
	Ethanolamine	0,32	2,46E-02
	myo-Inositol	0,17	3,85E-02



**Table S1: Annotated specialized metabolites significantly different in abundance between iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> and iAWF extracts.** Log2 fold change between iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> and iAWF extracts are indicated.

Pathway	Superclass	Proposed annotation	m/z_rt	Formula	mDA <sup>1</sup>	mSigma <sub>2</sub>	Log <sub>2</sub> (FC)	Raw p_value
Shikimates and phenylpropanoids	Flavonoids		413,088_4,72	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	0	3,2	0,64	3,73E-03
	Lignans		561,125_125	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	0,4	34,7	-1,14	1,30E-03
	Phenylpropanoids C6 C3	Sinapate*	233,061_4,97	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	0,1	3,9	-0,97	2,42E-02
	Phenylpropanoids C6 C3		425,073_4,38	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	1,5	46,9	0,86	2,42E-02
Amino Acids and peptides	Small peptides		461,109_4,72	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S	0,3	76,52	0,72	5,57E-04
	Aminoglycosides		709,110_5,00	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>6</sub>	0,2	25,9	0,69	1,88E-02
Fatty Acids	Fatty acids and conjugates	alpha-Linoleic acid	277,215_18,33	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,2	59,3	0,79	2,35E-02
Polyketides	Coumarins		293,065_4,36	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	0,9	7,1	0,71	3,87E-02
Terpenoids	Sesquiterpenoids		217,158_6,12	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	0,5	24,3	0,76	1,43E-02

<sup>1</sup> Mass differences between the proposed annotation and the experimental data

<sup>2</sup> Identification score obtained with annotation software based on the fragmentation spectra, the lower the score, the more robust the annotation

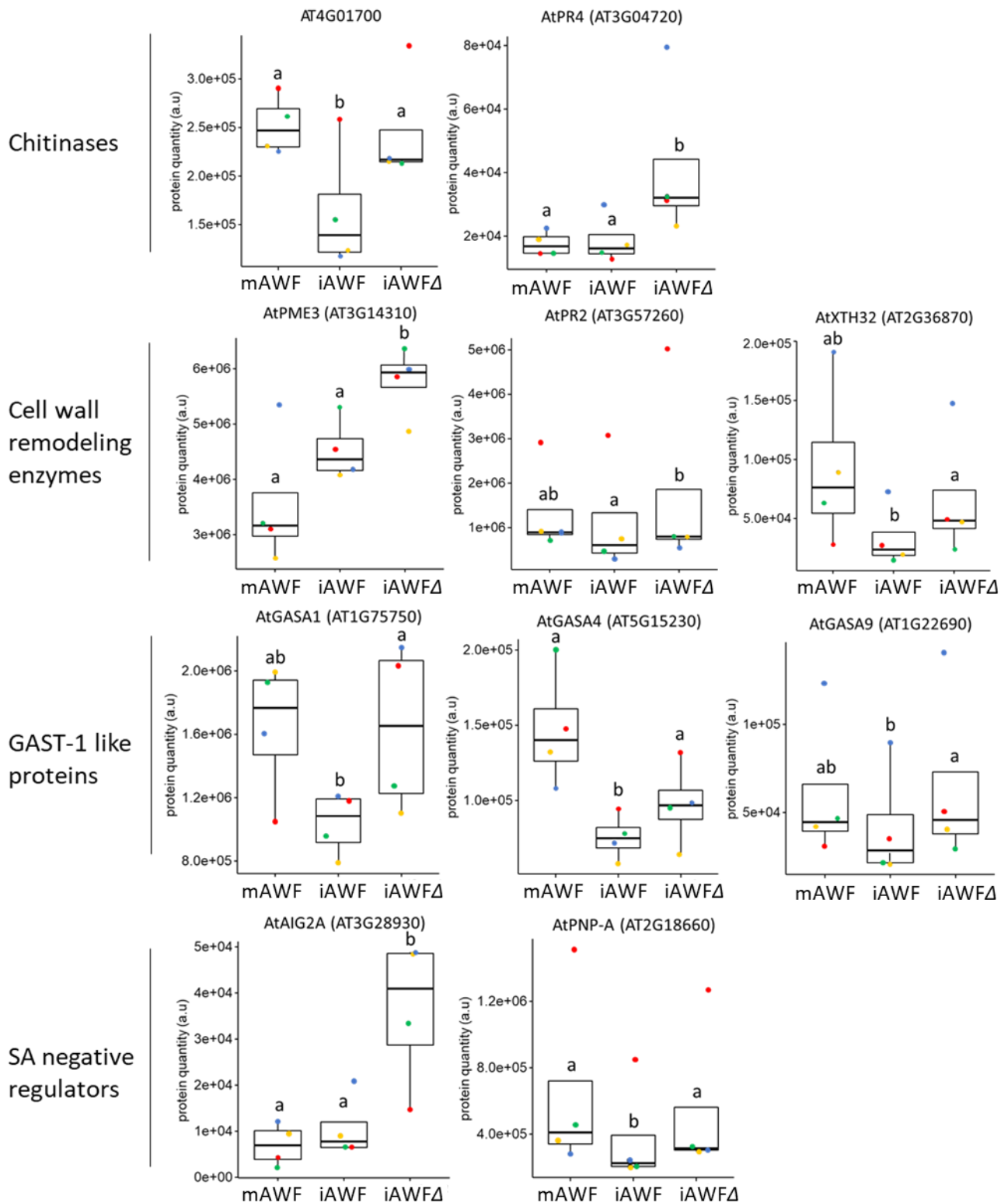
\* confirmed by standard molecules

With the proteome analysis obtained with mannitol-CaCl<sub>2</sub> as infiltration buffer, a total of 55 plant proteins were differently accumulated between iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> and iAWF and among them 45 were more accumulated in iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> (Table S2). Since proteins that accumulated more in iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> might be direct targets of BcACP1, we searched in this list of 45 proteins those that contain a signal peptide and/or with a known role in plant pathogen-interactions. We found two chitinases, At4G01700 and AtPR4, and three cell wall remodelling enzymes, AtPME3, AtPR2 and AtXTH32, that were more accumulated in iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> (Figure 8). Interestingly, *AtPME3* is known to be involved in *B. cinerea* infection as an important plant susceptibility factor (Alessandro Raiola *et al.*, 2011). We also observed an accumulation in iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> of three GAST1-like proteins, AtGAS1, 4 and 9, that are known to respond to gibberellins and be involved in various stress responses (Rubinovich & Weiss, 2010). Since these proteases have preferences in the amino acid sequence of the cutting site, the presence of several members of this protein family with conserved protein sequences make them potential substrates of BcACP1 (Stocchi *et al.*, 2018). Interestingly we also found an accumulation of AtAIG2A and AtPNP-A in iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup>, these two proteins were shown to be transcriptionally induced by SA and to act as feedback negative regulators of the SA pathway (Pyo Lee *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Furthermore, At4G01700, AtGASA4 and AtPNP-A were significantly depleted in iAWF compared to mAWF. Thereby, this lack of depletion in iAWF<sup>ΔBcacpl1</sup> could suggest either an absence of down-regulation of these proteins in response to the mutant or that they were targeted by BcACP1 in the WT.

To conclude, plant apoplastic accumulation levels of some metabolites and proteins were affected in response to the *ΔBcacpl1* mutant. The high proportion of them being involved in plant-pathogen interaction was consistent with a perturbation of the infectious process with the mutant. Furthermore, the identification of two negative regulators of the SA pathway as potential protein targets strongly correlated with the reduced SA pathway activation observed during infection with the mutant. Finally, these potential direct or indirect targets of the BcACP1 protease would need further validation by other approaches.

**Table S2: Differentially accumulated proteins between AWF extracts from infected plants with the WT strain (iAWF) or with the *ΔBcaccp1* mutant (iAWF<sup>*ΔBcaccp1*</sup>). The significant differences between iAWF and mock AWF extracts for the same proteins are also indicated.**

AGI	Annotation	Commun name	Target P	Log2 paired Fold change			
				iAWF <sup><i>ΔBcaccp1</i></sup> / iAWF	Raw p_value	iAWF/ mAWF	Raw p_value
AT3G04720	pathogenesis-related 4	AtPR4	SP	1,06	1,78E-02		
AT2G36870	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase32	AtXTH32		0,95	4,18E-03		
AT3G07470	transmembrane protein2C putative (Protein of unknown function2C DUF538)			0,71	3,00E-02		
AT1G22690	Gibberellin-regulated family protein	AtGASA9		0,65	1,07E-02		
AT4G01700	Chitinase family protein			0,63	1,59E-02	-0,69	3,06E-02
AT1G75750	GAST1 protein homolog 1	AtGASA1		0,62	1,04E-02		
AT2G18660	plant natriuretic peptide A	AtPNP-A		0,52	4,35E-03	-0,76	2,95E-02
AT5G15230	GAST1 protein homolog 4	AtGASA4		0,34	2,37E-02	-0,94	1,62E-02
AT5G34940	glucuronidase 3	AtGUS3		0,32	2,76E-03	-0,75	1,13E-02
AT3G26380	Melibiose family protein	AtAPSE		-0,51	4,59E-02		
AT4G12730	FASCIKLIN-like arabinogalactan 2	AtFLA2		-0,54	3,70E-02		
AT3G14067	Subtilase family protein	AtSASP		-0,57	4,23E-02		
AT5G39580	Peroxidase superfamily protein	AtPRX62		-0,67	4,75E-03	2,46	3,92E-02
AT3G28930	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein	AtAIG2A	OTHER	1,79	1,37E-02		
AT5G06690	WCRKC thioredoxin 1	AtTRXL2.1		1,48	4,62E-02	-0,48	1,55E-02
AT2G19750	Ribosomal protein S30 family protein	AtRPS30A		1,47	3,25E-02		
AT3G46000	actin depolymerizing factor 2	AtADF2		1,24	1,07E-02		
AT2G43160	ENTH/VHS family protein	AtEPS2		1,16	2,38E-02		
AT5G42890	sterol carrier protein 2	AtSCP2		1,13	7,17E-03		
AT4G08280	Thioredoxin superfamily protein			0,94	4,71E-02		
AT1G72930	toll/interleukin-1 receptor-like protein (TIR-LRR)	AtTN10		0,94	3,14E-04		
AT4G32150	vesicle-associated membrane protein 711	AtVAMP711		0,92	3,34E-02		
AT1G26630	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A 1) protein	AtELF5A-2		0,85	4,44E-02		
AT1G54290	Translation initiation factor SUI1 family protein			0,75	1,22E-02		
AT3G52560	ubiquitin E2 variant 1D-4	AtUEV1D		0,73	3,58E-02		
AT4G20260	plasma-membrane associated cation-binding protein 1	AtPcaP1		0,73	2,27E-02		
AT1G16890	ubiquitin-conjugating enzyme 36			0,67	7,61E-03	1,05	2,44E-02
AT2G33470	glycolipid transfer protein 1	AtGLTP1		0,65	3,91E-02		
AT3G26420	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein with retrovirus zinc finger-like domain-containing protein	AtRZ-1A		0,64	4,15E-02		
ATCG01060	iron-sulfur cluster binding3Belectron carriers3B4 iron2C4 sulfur cluster binding protein			0,64	3,36E-02		
AT3G57260	beta-12C3-glucanase2	AtPR2		0,63	3,83E-02		
AT4G34870	rotamase cyclophilin 5	AtROC5		0,58	9,47E-04		
AT3G26450	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein			0,55	4,45E-02		
AT1G06400	Ras-related small GTP-binding family protein			0,51	3,98E-02	0,50	1,47E-02
AT4G02530	chloroplast thylakoid lumen protein			0,35	1,89E-02	1,16	2,22E-02
AT3G14310	pectin methylesterase 3	AtPME3		0,35	1,05E-02		
AT1G78370	glutathione S-transferase TAU 20	AtGSTU20		-0,41	1,94E-02		
AT3G48990	AMP-dependent synthetase and ligase family protein	AtAAE3		-0,47	3,81E-03	0,84	2,69E-02
AT2G35370	glycine decarboxylase complexH	AtGDCH	mTP	0,88	4,18E-02		
AT5G08670	ATP synthase alpha/beta family protein			-0,44	3,00E-02	1,40	1,53E-02
AT1G48030	mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1	AtMTLPD1		-0,48	1,93E-02		
AT1G03600	photosystem II family protein	AtPSB27	ITP	0,90	4,69E-03		
AT5G64040	photosystem I reaction center subunit PSI-N2C chloroplast2C putative / PSI-N2C putative (PSAN)	AtPSAN		0,63	7,36E-03	1,90	1,81E-02
AT3G50820	photosystem II subunit O-2	AtPSBO2		-0,53	2,06E-02	1,92	5,78E-03
AT5G17560	BOLA-like family protein	AtBOLA4	cTP	1,46	3,44E-02		
AT4G28730	Glutaredoxin family protein	AtGRXC5		1,28	1,83E-02		
AT2G20260	photosystem I subunit E-2	AtPSAE2		1,16	1,32E-02		
AT4G11175	Nucleic acid-binding2C OB-fold-like protein			0,76	4,46E-02		
AT1G50320	thioredoxin X			0,76	2,00E-03		
AT3G53460	chloroplast RNA-binding protein 29			0,73	4,88E-02	0,99	4,38E-02
AT2G25080	glutathione peroxidase 1	AtGPX1		0,64	3,10E-02		
AT3G08740	elongation factor P (EF-P) family protein			0,57	3,34E-02		
AT4G28440	Nucleic acid-binding2C OB-fold-like protein			0,50	3,02E-02		
AT3G52960	Thioredoxin superfamily protein	AtPRXIIE		0,38	2,66E-02		
AT3G27830	ribosomal protein L12-A			-0,45	1,29E-03	1,36	2,60E-02

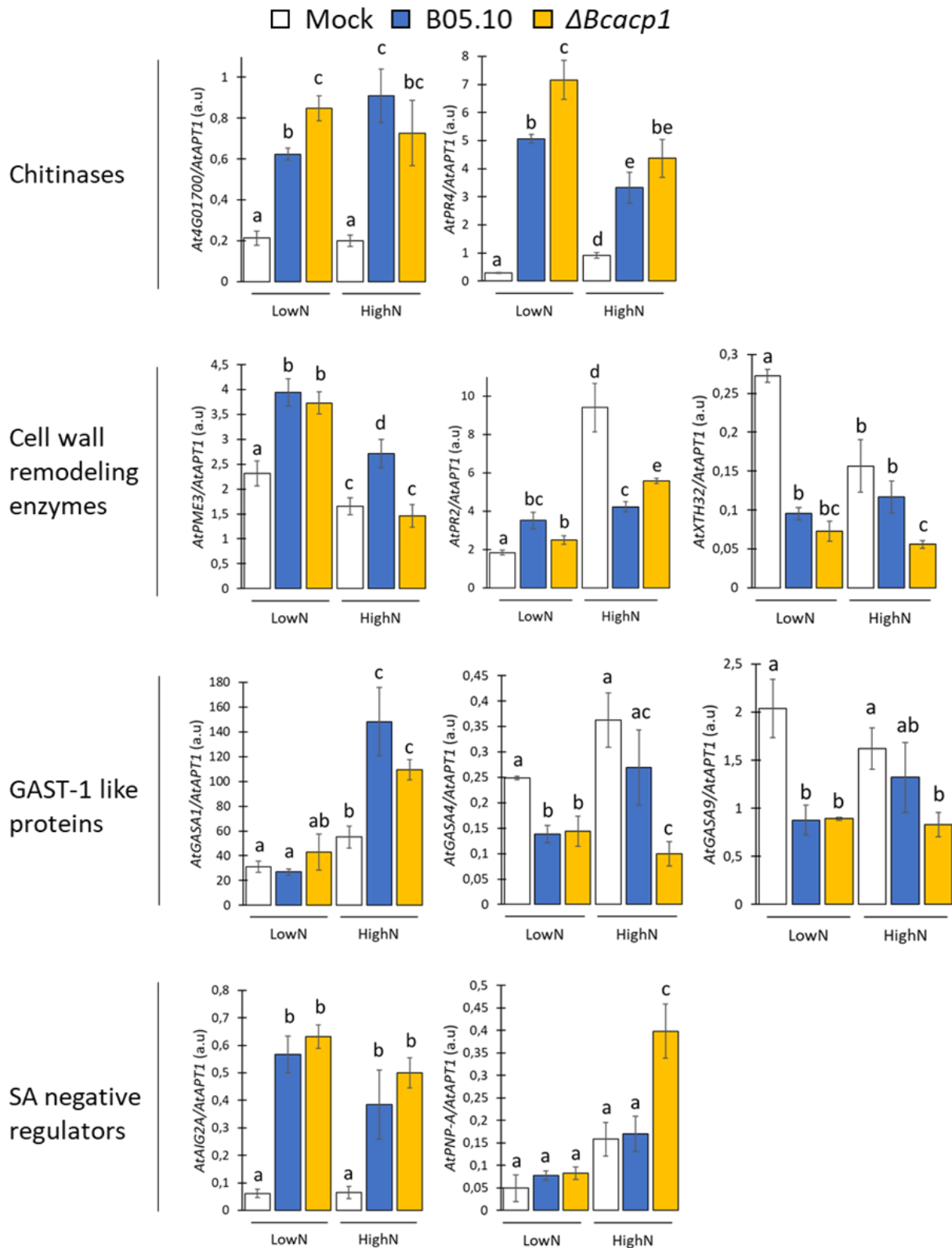


**Figure 8:** Stress related *A. thaliana* proteins significantly accumulated in AWF extracts at 6 hpi with the  $\Delta Bcacr1$  mutant strain (iAWFΔ) compared to the WT strain (iAWF). Accumulation levels of proteins in mock apoplast extract (mAWF) are also represented. Plants were grown at highN and mannitol-CaCl<sub>2</sub> was used as infiltration buffer. Boxplots represent the results of 4 biological replicates indicated by dots (each color correspond to one replicate). Letters indicates the results obtained with a paired t-test (p < 0.05).

## Gene expression levels of putative targets of BcACP1 identified in the proteome

To go further in the identification of BcACP1 protein targets, we analysed the pattern of genes expression coding for our apoplastic protein candidates. We observed that the expression of the two chitinase genes *At4G01700* and *AtPR4* at 6 hpi was induced by the infection with the WT strain of *B. cinerea* (Figure 9). After infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant, *At4G01700* was less expressed at high N compared to low N whereas we found the opposite for *AtPR4*. When we compared the  $\Delta BcACP1$  mutant with the WT, we observed a stronger expression of both genes in low N and no differences in high N. Regarding cell wall remodelling enzymes, the expression of *AtPME3* was induced by the infection and regulated by nitrogen since a stronger expression was found in low N (Figure 9). Interestingly, no induction of *AtPME3* expression was retrieved in high N during infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant. *AtPR2* was slightly induced by the infection in low N whereas it was strongly repressed in high N. Infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant led to a stronger expression level of *AtPR2* in high N compared to the WT. Infection with the WT led to a repression of *AtXTH32* expression that was more pronounced in low N. With the  $\Delta BcACP1$  mutant, repression of *AtXTH32* was stronger than the WT in high N. Concerning the three *AtGASA* genes, infection with the WT led to an induction of *AtGASA1* that was more pronounced in high N and a repression of *AtGASA2* and *AtGASA3*. There were all more expressed in high N after infection compared to low N. Moreover, we didn't observe any significant difference during the infection between the WT and the  $\Delta BcACP1$  mutant strains for the three *AtGASAs* genes. Finally, concerning SA regulators, *AtAIG2A* expression levels were strongly induced by the infection in both N regimes and no differences were observed between low N and high N. Infection with the mutant strain did not affect differently *AtAIG2A* expression compared to the WT. On the contrary, *AtPNP-A* expression levels were not affected by the infection with the WT but infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant strongly induced its expression in high N.

To conclude, the gene expression results in high N confirmed a transcriptional regulation of protein accumulation for *AtPR2* and mainly *AtPNP-A* during infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant. Furthermore, we observed a reduced expression of *AtPME3* and *AtXTH32* during infection with the WT compared to the  $\Delta BcACP1$  mutant which is contradictory with the up-accumulation of the corresponding proteins in *iAWF $\Delta BcACP1$* . Thus, post-transcriptional regulation and maybe BcACP1 degradation could be responsible for the accumulation of the other proteins in *iAWF $\Delta BcACP1$* . Finally, we observed a stronger expression of *AtPR4* and *At4G01700* in response to the mutant highlighting a N dependent response of the plant to the  $\Delta BcACP1$  mutant.



**Figure 9: Relative transcript abundance of genes encoding *A. thaliana* apoplastic proteins that were either accumulated or depleted after infection with the  $\Delta Bcaccp1$  mutant strain of *B. cinerea* compared to the WT strain (B05.10). *A. thaliana* Col-0 plants were grown either with low (LowN) or high (HighN) nitrate supply and gene expression was analysed by RT-qPCR at 6 hpi with the WT strain B05.10 of *B. cinerea* or the  $\Delta Bcaccp1$  mutant. *AtAPT1* was used as a reference gene and similar results were obtained with *AtUBI4*. Two independent experiments were conducted with similar results. Letters indicates the results of an unpaired t-test ( $p < 0.05$ ).**

## DISCUSSION

We have known for a long time that the interaction between a phytopathogen and its host is influenced by the plant nitrogen nutrition, but this complex interaction is still not completely understood (Fagard *et al.*, 2014). Studies on different pathosystems revealed the implication of some plant defense pathways in this interaction but also the capacity of pathogens to produce their pathogenicity factors (Farjad *et al.*, 2018, 2021; Fernández-Crespo *et al.*, 2015; Soulie *et al.*, 2020). On the *A.thaliana* – *B. cinerea* pathosystem, we have shown in a previous study that 22 genes of *B. cinerea* were differentially expressed during infection depending on plant nitrate nutrition (Soulie *et al.*, 2020). Among them we identified the *BcACP1* gene coding for a glutamic protease. In this work we confirmed that BcACP1 is involved in the link between plant nitrogen nutrition and pathogenicity by studying the plant response to the  $\Delta BcACP1$  mutant strain and searching for plant protein targets of this protease in the apoplastic space.

First, we validated that *BcACP1* is the main glutamic protease of *B. cinerea* and that no potential functional redundancy of other glutamic proteases could influence the phenotype of the  $\Delta BcACP1$  mutant. Stocchi *et al* (2018) postulated that functional diversification has occurred in the family of glutamic proteases diverging substrate specificity and binding. In their analysis, BcACP2 and BcACP3 were part of a separate and more recent clade of proteases which suggests that they play a distinct role from BcACP1. Supporting that, in our results *BcACP2* and *BcACP3* expression levels during infection were not impacted by plant nitrate conditions as strongly as *BcACP1* (Figure 1A). Furthermore, they were weakly expressed in all condition tested with the WT and the  $\Delta BcACP1$  mutant. In the transcriptomic analysis of Blanco-Ulate *et al* (2014), *BcACP2* was strongly expressed on grape berries suggesting that this homolog has host-specific targets, contrary to *BcACP1* which was highly expressed on all tested host plants. Concerning *BcACP1*, the longer kinetic of expression during infection obtained in this study revealed that its regulation by plant nitrate nutrition varies from a stronger expression at high N in the initial phase of infection (6 hpi) to a stronger expression at low N in the final phase (48 hpi). Therefore, the expression dynamic of these gene might be important to understand its role in the link between nitrogen nutrition and plant disease. Finally, we also observed that its expression is higher in infection cushions as it was observed by transcriptomic analysis of these structures involved in penetration and host degradation (Figure 1B ; Choquer *et al.*, 2021).

Then, to better understand the role of *BcACP1*, we analysed its contribution to pathogenicity and nitrate interaction on a set of *A. thaliana* natural accessions. We found that at 24 hpi, *BcACP1* expression, quantified with a *pBcACP1::GUS* strain, varies within the set of accessions. Furthermore, the impact of plant nitrate nutrition on BcACP1 expression varied among accessions (Figure 3). Interestingly, the correlation analysis of *BcACP1* expression levels and lesion size obtained revealed a positive correlation at low N and a negative correlation at high N. This observation was further confirmed with the  $\Delta BcACP1$  mutant upon which the majority of plant accessions were less susceptible and more susceptible at low N and high N respectively (Figure 4). This ambivalent susceptibility of the plants to the mutant suggested a dual role of the BcACP1 protease depending on plant nitrate conditions either acting predominantly as a virulence factor in low N or as an avirulence factor in high N. Many pathogen enzymes have these two potential roles, such as CWDE that are involved not only in pathogen penetration (through cell wall degradation) but also produce cell wall derived oligos that can trigger plant defense (Voxeur *et al.*, 2019; Zarattini *et al.*, 2021). To test this hypothesis, it would be interesting to select some accessions for which *BcACP1* expression levels during infection and susceptibility levels with the WT and the  $\Delta BcACP1$  mutant were contrasted to analyse their specific defense response more closely. A1-9, Jea and Shahdara accessions are good candidates since they were significantly affected in response to the  $\Delta BcACP1$  mutant and representative of the tendency observed with most of the accessions. Furthermore, Pyl-1 and A6-105 accessions would also be good candidates for further analysis. Indeed, Pyl-1 presented during infection strong variation in *BcACP1* expression depending on plant

nitrate supply and the highest susceptibility to the WT strain of *B. cinerea* together with a reduced susceptibility to the mutant in both plant nitrate regime. Interestingly, Pyl-1 was shown to be highly sensitive to CWDEs due to its low methyl-esterification status of pectin which could explained its strong susceptibility to the fungus (Francocci *et al.*, 2013) . On the contrary, A6-105 presented during infection a strong expression of *BcACP1* depending on plant nitrate supply and a low susceptibility to the WT together with a high susceptibility to the mutant in both nitrate conditions. Another hypothesis on the dual role of *BCACP1* would be that this protein is important for the fungus in unfavourable environments such as more resistant host plants at low N whereas it is less important or even detrimental in optimal conditions such as susceptible plants at high N. Supporting this hypothesis, it was shown *in vitro* that *BcACP1* expression is downregulated in rich medium containing sulphur and ammonium whereas limiting medium induced its expression (Rolland & Bruel, 2008). Thereby, testing the pathogenicity of the  $\Delta BcACP1$  mutant in different abiotic stress conditions for the plant might help understanding the role of BcACP1.

To further characterize the role of BcACP1 in nitrogen-pathogen interaction we focused on the extensively studied Col-0 accession that was initially used to characterize the mutant. Interestingly, we found differences in plant defense activation with the mutant which were dependent on nitrate nutrition. Indeed, *AtPDF1.2*, *AtPRI* and *AtWRKY70*, that are markers of the SA and JA defense pathways were differentially activated with the mutant (Figure 5). Altogether it suggested that in the initial phase of the infectious process before any visible symptoms (6hpi), the SA pathway was less activated with the mutant but only at high N. Later on, when typical symptoms of the disease arose, the JA pathway was less activated in response to the mutant only in low N whereas the SA pathway was more induced in both nitrate regimes compared to the WT. Since these hormonal pathways were shown to be strongly impacted by plant nitrate supply (Soulie *et al.*, 2020), their perturbation with the  $\Delta BcACP1$  mutant could explain its nitrate-dependent phenotype. JA is known to be strongly accumulated in response to *B. cinerea* and to be involved in resistance whereas some SA-induced reactions like programmed cell death promote the infection (AbuQamar *et al.*, 2017; Thomma *et al.*, 1998). Thereby, we attributed the reduced induction of the JA pathway at 24 hpi in low N to the observed reduced severity of the infection with the mutant in this condition. Nevertheless, the repression of the SA pathway at 6hpi in high N and its induction in both low N and high N conditions at 24 hpi seemed to originate from a more complex phenomenon and could signify that *BcACP1* can regulate this defense pathway. Supporting the hypothesis of a role of *BcACP1* in regulation of defense activation, Krishnan *et al* (2018) identified glutamic proteases of *Zymoseptoria tritici* as potential suppressors of plant defense involved in the biotrophic phase of the infection. Thereby, it would be interesting to analyse if BcACP1 itself can induce a plant reaction by agroinfiltration of direct infiltration with the purified protein.

Interestingly the dynamic of *BcACP1* expression at low N and high N seemed to correlate with JA and SA pathway activation. In one hand, *BcACP1* was more expressed in high N at 6 hpi and infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant led to a reduced SA activation in high N compared to the WT. In the other hand, *BcACP1* was expressed at the same level in low N and high N at 24 hpi and infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant led to an increased SA activation in both N regimes. Therefore, we could hypothesise that a strong expression of *BcACP1* promoted SA activation in the early phase of the infectious process whereas it repressed its activation in the latter phases. Increased SA activation by *BcACP1* at high N in the early phase would favour the fungus by inducing plant cell death and could participate to the higher susceptibility of the plant in this condition.

Since BcACP1 is an active secreted protease that is expressed and secreted early during the infection (Figure 1 A, B ; Figure S3; Espino *et al.*, 2010), we hypothesised that it can degrade apoplastic targets in the initial phase of the infectious process and that this activity mediates its effect on pathogenicity. Supporting this hypothesis, we confirmed the peptidase activity of a purified version of the BcACP1 protein and observed an absence of extensive proteolysis of mAWF proteins suggesting some specificity in protein substrate (Figure 6). In order to test this hypothesis, we extracted and compared AWF extracts obtained at 6 hpi of Col-0 plants with the WT and the



*ΔBcacp1* mutant. This analysis was performed at high N since at this infection phase *BcACPI* was more expressed in this plant nitrate regime. We found by metabolomic analysis that some defense related metabolites were accumulated in iAWF<sup>ΔBcacp1</sup> such as shikimate and tryptophan that are precursors of specialized metabolites (Table 1). Some sugars were also accumulated, such as fructose that has a role in plant defense against fungal pathogens as fuel for specialized metabolites synthesis (F. Lecompte *et al.*, 2013). Accumulation of these precursors suggested that some regulation mechanism involving secondary metabolism were affected during infection with the *ΔBcacp1* mutant. Indeed, we found many differences in specialized metabolites (45 identified features differentially accumulated, data not shown). Four of them manually annotated were related to the shikimate and phenylpropanoid pathway but none to the tryptophan-derived secondary metabolism (Table S1). These differences might be the reflection of the differences in defense pathways activation by the mutant but could also be caused by the absence of degradation by *BcACPI* of protein targets involved in plant metabolism. Interestingly we found that iAWF extracts and to a greater extend iAWF<sup>ΔBcacp1</sup> were able to induce *BcACPI* expression in vitro suggesting inducers accumulation or repressors depletion (Figure 7). Thereby it would be interesting to test the *BcACPI* expression inducing activity of metabolites identified as accumulated in iAWF<sup>ΔBcacp1</sup>.

To identify potential protein targets, we analysed the protein content of the apoplasmic extracts. Interestingly, 80 % of the differentially accumulated proteins were more accumulated in iAWF<sup>ΔBcacp1</sup> which makes them potential targets of *BcACPI* (Table S2). In this list of potential targets, we identified two chitinases (At4G01700 and AtPR4), three cell wall remodelling enzymes (AtPME3, AtPR2 and AtXTH32), three GAST-1 like proteins (AtGASA1, 4 and 9) and two regulators of the SA pathway (AtAIG2A and AtPNP-A) (Figure 8). It is interesting to note the presence of PR proteins since it has been shown that a serine protease of *Fusarium solani f. sp. Eumarti* contributes to virulence by the degradation of two PR proteins, a chitinase and a B-1,3 glucanase (Olivieri *et al.*, 2002). To gain more information about these potential targets of *BcACPI*, we analysed the expression of their coding genes in the same conditions of AWF extraction (high N). We hypothesized that transcriptionally regulated proteins were most likely indirect targets of *BcACPI*. Only the accumulation of AtPR2 and the SA regulator AtPNP-A in iAWF<sup>ΔBcacp1</sup> could be explained by an induction of transcription (Figure 9). However, the accumulation AtAIG2A together with AtPNP-A in iAWF<sup>ΔBcacp1</sup> was very interesting since they were both described as negative regulator of the SA pathway. *AtAIG2A* was shown to act by the repression of the tryptophan derived secondary metabolism (TDSM) which can activate the SA pathway whereas *AtPNP-A* was shown to repress the SA pathway by its interaction with a membrane receptor that mediates the signalling cascade (Pyo Lee *et al.*, 2020; Z. Wang *et al.*, 2022). *AtAIG2A* and *AtPNP-A* were both shown to be involved in resistance against *P. syringae* (Ficarra *et al.*, 2018; Z. Wang *et al.*, 2022). Nevertheless, for *AtAIG2A* no implication in resistance against *B. cinerea* was observed in their conditions. In our results these proteins were accumulated in the apoplast during infection with the mutant at 6 hpi which is consistent with the concomitant reduced activation of the SA pathway observed at this time-point (Figure 5). Furthermore, the accumulation of *AtAIG2A* could explain the accumulation of tryptophan observed in iAWF<sup>ΔBcacp1</sup> that would reflect its repressing activity of the TDSM. Thereby as direct or indirect targets of *BcACPI*, *AtAIG2A* and *AtPNP-A* might be involved in the differences in regulation of the SA pathway and TDSM during infection with the *ΔBcacp1* mutant. It would be interesting to test the response of an *A. thaliana* mutant line impaired in SA synthesis infected with *ΔBcacp1* to confirm these hypotheses. Concerning AtXTH32 and AtGASAs proteins, which are known to participate in growth responses (Kaewthai *et al.*, 2013; Rubinovich & Weiss, 2010), their degradation by *BcACPI* might contribute to release nutrient for fungal growth but it does not explain the plant nitrate dependent phenotype of the mutant. Another identified good candidate was the AtPME3 protein. Indeed, *AtPME3* has been described as a susceptibility factor of the plant during the infection by *B. cinerea* (Alessandro Raiola *et al.*, 2011). Thereby *AtPME3* accumulation during infection with the *ΔBcacp1* mutant at high N might explain the increased susceptibility of the plant. The chitinases At4G01700 and the AtPR4 are also good candidates and especially At4G01700 for which gene transcription was



induced but the protein depleted only after infection with the WT. Zhang *et al* (2002) showed that the defense response activated by chitin perception in *A. thaliana* is mediated in part by the SA pathway. Thus, the differences in accumulation of chitinase during infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant can also be involved in the stronger induction of the SA pathway at 24 hpi. Analysis of the response of *A. thaliana* mutant lines of all these putative targets to the infection with the  $\Delta BcACP1$  mutant compared to the WT strain would be interesting to confirm their implication. Likewise, the purification of those proteins and the realisation of degradation test with the purified BcACP1 can enable us to validate them as direct or indirect targets. Moreover, since the phenotype of the mutant was different depending on plant nitrate nutrition, it could indicate that BcACP1 activity is affected by plant nitrate nutrition through differences in accumulation levels of BcACP1 or its targets. Consistently, we observed some differences in gene expression of putative targets such as *AtPME3* and *At4G01700* between the WT and the mutant that were present at low N and not in high N. Thus, it would be interesting to compare protein accumulation in the apoplast with the  $\Delta BcACP1$  mutant and the WT in low N and high N.

To conclude, we gained insight into the role of the BcACP1 protease in pathogenicity and its implication in regulation of disease severity by plant nitrate nutrition. It appeared that it could act as a pathogenicity factor in conditions of plant nitrate limitation or promote plant resistance in optimal plant nitrate nutrition. This dual role was strongly correlated to the SA defense pathway activation and might be explained by the presence of BcACP1 protein targets in the apoplast compartment or a direct capacity of BcACP1 to regulate plant hormonal immunity. Altogether, this work provides another evidence that the combination of biotic and abiotic stress can deeply modulate the efficiency not only of defense strategies of the host plant but also virulence strategies of the pathogen.

## MATERIALS AND METHODS

### Fungal and plant material

*B. cinerea* strain B05.10 collected from *Vitis* in Germany (Quidde *et al.*, 1998) was used throughout this work as the wild-type (WT) reference strain. The  $\Delta Bcacp1$  mutant strain used in this study was kindly provided by Dr. Nathalie Poussereau. *B. cinerea* was routinely cultured on potato dextrose agar (PDA, Difco) for spores collection or malt agar for infection experiments (MA, 1% malt extract, 1.2% agar) at 23°C under constant light. Some of the *A. thaliana* accessions of the core collection used in this study were obtained from the INRAE-Versailles collection (Col-0, Shahdara, Jea, Pyl-A, Bur-0, Blh-1, Can-0, Cvi-0, Mlh-1, St-0, Oy-0, Ct-1 and Mt-0) whereas accessions of the TOU-A population (Gloss *et al.*, 2022) were kindly provided by Dr. Fabrice Roux (A1-9, A1-19, A1-116, A1-137, A6-18, A6-47, A6-55 and A6-105). For all experiments, plants were cultured in growth chambers (65% relative humidity, 8 hr photoperiod, 21°C) for 6 weeks on nonsterile sand and were supplied with a nutrient solution containing either 0.5 mM (Low N) or 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (High N).

### Infection experiments

For all infection experiments, *B. cinerea* mycelial plugs from a four-day old MA culture were used as inoculum. Infection experiments for RT-qPCR and analysis of *A. thaliana* natural accessions were made on detached leaves with 3mm diameter mycelial plugs from the actively growing edge inverted on the upper surface of each leaf. For AWF extraction, plugs of 1 cm diameter were used as inoculum to cover a maximum of the leaves surface and infection were done on entire rosettes cut at their base as described in chapitre II. Rosettes or detached leaves were then kept in large square dishes under high humidity conditions at 23°C and under constant light during the entire experiment.

### *B. cinerea* transformation

*pBcACPI::GUS* and *pBcACPI::GFP* reporter strains used in this study were obtained by CRISPR-Cas9 transformation as described in Leisen *et al.*, 2020. Transformation was done with a recombinant cassette containing the *BcACPI* promoter fused to the *GFP* gene or the *uidA* gene obtained by PCR fusion (Figure S2) together with the pTEL-fenh plasmid for selection (kindly provided by Pr. Matthias Hahn, Kaiserslautern, Germany). The targeted locus for integration of the recombinant cassette was *BcBIK2*, a previously described pseudogene of *B. cinerea* (Schumacher *et al.*, 2013). The *BcACPI* promoter was amplified from *B. cinerea* genomic DNA whereas the GFP gene was obtained by amplification from the PNDN-OGG plasmid (Schumacher, 2012). Resistant transformants were then subcultured with the selection pressure on HA medium (1% malt extract, 0.4% glucose, 0.4% yeast extract, 1.5 % agar, pH 5.5) and once again on PDA and MA for stock suspension of spores and DNA extraction respectively. Finally, correct integration of the cassette was verified by PCR on genomic DNA extracted as described in Feng *et al.*, 2010. Sanger sequencing of the PCR fragments was conducted to verify the absence of mutations in the integrated recombinant cassettes. Primers used for SgRNA synthesis and PCRs are listed in Table S3. Selection of the SgRNA protospacer sequences targeting *BcBIK2* was done with the online CRISPOR tool (Concordet & Haeussler, 2018).

### GUS coloration

Measurement of GUS activity during infection with the *pBcACPI::GUS* reporter strain were done with the imageJ software after coloration of the leaves. Briefly, at 24 hpi leaves were incubated for 4h at 37°C into a solution containing 2.25 mM X-GlcA, 10 mM EDTA, 0.1 % Triton,

0.5 mM Potassium ferrocyanure, 0.5 mM Potassium ferricyanure in 0.1 M Phosphate buffer pH 7. The leaves were then destained with ethanol and pictures were taken for analysis of GUS activity.

### RT-qPCR analysis

For RT-qPCR, in each condition total RNA was extracted from a pool of 8 leaves and extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). Three independent biological replicates were analysed. Reverse transcription was performed using an oligo-dT20 for a primer and Superscript II RNaseH<sup>-</sup> reverse transcriptase (Invitrogen). PCR was performed on a Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System with SYBR Green PCR MasterMix (Eurogentec). Each reaction was performed on a 1:20 dilution of the cDNA, synthesized as described above, in a total reaction of 5  $\mu$ L. For quantification, the  $2^{-\Delta C_t}$  method was used. For *A. thaliana* target genes, *AtAPT1* and *AtUBI4* were used as reference genes whereas for *B. cinerea* target genes we used *BcACTA* and *BcUBI* (Ren *et al.*, 2017). We obtained similar results with both genes, therefore results with only one reference gene are shown. Specific primer sets are given in Table S3.

### Protein purification and protease activity assay

The open reading frame of the *BcACP1* gene amplified by PCR was cloned and expressed as a 6x His-MBP (Mannose Binding Protein) fusion protein using the expression vector pDEST-HisMBP (Addgene). Primers used for cloning are given in Table S3. BL21 (DE3) cells transformed with the expression plasmid were grown in LB broth at 20°C to an OD600 of ~0.8 and induced with 0.2 mM IPTG for 16 h. Cells were disrupted by sonication in extraction buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM imidazole, 4% Glycerol) and the supernatant was collected by centrifugation (10000 g, 30 min) at 4 °C. The supernatant was loaded onto a HisTrap FF Crude column (5 mL, GE Healthcare, Akta Explorer 10S system) pre-equilibrated with Lysis buffer. The column was washed with washing buffer (200 mM NaCl, 2 mM DTT, 10% glycerol, 25 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0), and treated overnight at 4°C with HRV (human rhinovirus) 3C protease to release the BcACP1 protein free of the 6x His-MBP tag. The final elution of the protein was done with washing buffer. The collected fraction was concentrated by ultrafiltration on Amicon 10K (5000 rpm, 20 min at 10 °C) before a second purification step by chromatography through a Superdex-200 gel filtration column in 20 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 1% Glycerol. A final ultrafiltration step enabled to concentrate the protein at 1-3 mg.ml<sup>-1</sup>. The protein concentration of the pure enzyme was quantified from the absorbance at 280 nm using Epsilon =48150 calculated from amino acids analysis. The purity and molecular mass of the protein were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) under denaturing conditions in Laemmli sample buffer. The identity of the purified protein was verified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy (MALDI–TOF MS). Protease activity tested with a fluorescent probe was achieved as described by de Saint Germain *et al* (2021). *In vitro* degradation assay of mAWF proteins with the BcACP1 proteins was done by adding 1 $\mu$ g of the purified enzyme in 10 $\mu$ g of mAWF proteins in 100mM acetate buffer pH4 or 100mM phosphate buffer pH6. Following an incubation at room temperature for 16 h, the total sample was analysed by SDS-PAGE and the proteins were stained on the gel with SYPRO® ruby protein gel stain (Supelco).

**Table S3: List of primers used in each experiment**

Name	Sequence	Purpose
P1	5'-TTAGTGTTGCCTGCTCCACA-3'	PCR verification
P2	5'-TGTCCACCAGCTGATAAAGC-3'	PCR verification
pBcACP1 fwd	5'GGCATGT CAGCGCCACCGAAGGCATCGCCTAGGGT GAGCGCTTTGCCGTTTACCGAGAATCGCCAAGTAAAGC TTCGTC-3'	Amplification of the <i>pBcACP1</i> promoter
pBcACP1- rev-GUS	5'-TTTGATTGATTGATTGAATTGATTGCCGAAC-3'	Amplification of the <i>pBcACP1</i> promoter for GUS fusion
GUS fwd	5'GTTGCGCAATCAATTCAATCAATCAAAATGTTA CGTCCTGTAGAAACCCCAAC-3'	Amplification of the <i>uidA</i> gene
GUS rev	5'TATGCCATCCTTTCGCGACGCCTTCTCAACGCCAGT CTTAACAGCAACAACGCGGTTCTGATCTAGTAACATAG ATGACACCGCG-3'	Amplification of the <i>uidA</i> gene
pBcACP1- rev-GFP	5'CCTCACCTTGAAACCATTTTATTGATTGATTGAA TTGATTGCC-3'	Amplification of the <i>pBcACP1</i> promoter for GFP fusion
GFP fwd	5'-ATGGTTTCCAAGGGTGAGG-3'	Amplification of the <i>GFP</i> gene
GFP rev	5'TATGCCATCCTTTCGCGACGCCTTCTCAACGCCAGT CTTAACAGCAACAACGCGGTTCTATCTTGTGGGGGGA AGG-3'	Amplification of the <i>GFP</i> gene
BcACP1- gtw-FW	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCCTGGA AGTGCTGTTTCAGGGCCCGATGGCCCCAGGTAAGTCTT TGAG-3'	Cloning of BcACP1 for purification
BcACP1- gtw-RV	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATT AACGTATTTGCAAGTAACACCAGTG-3'	Cloning of BcACP1 for purification
BcACTA fwd	5'-CGCCATTGCTCGTGTGAC-3'	RT-qPCR
BcACTA rev	5'-TCGGCAGTGGTGGAGAAAGT-3'	RT-qPCR
BcUBI fwd	5'-ACCATAACAACCTCGGCATGC-3'	RT-qPCR
BcUBI rev	5'-ACCGCGATGTAAACTGACG -3'	RT-qPCR
BcACP1 fwd	5'-CAAGGGCAAGAGTGTTC-3'	RT-qPCR
BcACP1 rev	5'-CAACAAGGGAACAGTCGGTG-3'	RT-qPCR
BcACP2 fwd	5'-AAATCCGAGACCAAGACCGT-3'	RT-qPCR
BcACP2 rev	5'-TGTTTTCCCTCCTTGGTCTG-3'	RT-qPCR
BcACP3 fwd	5'-CTCCTCAGCGAATACCCTGT-3'	RT-qPCR
BcACP3 rev	5'-TATCCAGTATTTCCGCGCCA-3'	RT-qPCR

**Table S3:**

AtAPT1 fwd	5'-CCTATTGCGTTGGCTATTG-3'	RT-qPCR
AtAPT1 rev	5'-TCTTCACTCCTACTCGTTC-3'	RT-qPCR
AtUBI4 fwd	5'-TGACACCATCGACAACGTGA-3'	RT-qPCR
AtUBI4 rev	5'-GAGGGTGGACTCCTTCTGGA-3'	RT-qPCR
AtPDF1.2 fwd	5'-TTTGCTTCCATCATCACCCCTTATCTT-3'	RT-qPCR
AtPDF1.2 rev	5'-ACACTTGTGTGCTGGGAAGA-3'	RT-qPCR
AtPR1 fwd	5'-CTGGCTATTCTCGATTTTTAATCG-3'	RT-qPCR
AtPR1 rev	5'-TCCTGCATATGATGCTCCTTATTG-3'	RT-qPCR
AtWRKY70 fwd	5'-CCCAAGAAGTTACTTTAGATGCAC -3'	RT-qPCR
AtWRKY70 rev	5'- TTGCTCTGGGAGTTTCTGC-3'	RT-qPCR
At4G01700 fwd	5'- ATAGAGCAGCAAACCGGACT-3'	RT-qPCR
At4G01700 rev	5'- GGTCTTTGGTTCTCGCAGTC-3'	RT-qPCR
AtPR4 fwd	5'- ATCAATGGCCGAAACAAG -3'	RT-qPCR
AtPR4 rev	5'- GCCATCTCATTGTTGACTACCAATTT -3'	RT-qPCR
AtPME3 fwd	5'- AGGAGGCTTCTTCAGGGTTC -3'	RT-qPCR
AtPME3 rev	5'- CGTCCGACCATCTCCATAA -3'	RT-qPCR
AtPR2 fwd	5'- AGTCGGGACGAGTGTGGAAA -3'	RT-qPCR
AtPR2 rev	5'- GCCTTCTCGGTGATCCATTC -3'	RT-qPCR
AtXTH32 fwd	5'- AATCTTTGGGGTCTCAGCA -3'	RT-qPCR
AtXTH32 rev	5'- ACCTCATCATGGAACCCTGG -3'	RT-qPCR
AtGASA1 fwd	5'- ATTGTGGGAGTGC GTGTGTA -3'	RT-qPCR
AtGASA1 rev	5'- ACATCGTCCCATTATCCGCA -3'	RT-qPCR
AtGASA4 fwd	5'- TGGTTATGGCCTCAAGTGGA -3'	RT-qPCR
AtGASA4 rev	5'- AGAGACACTTCTGCAGCAT -3'	RT-qPCR
AtGASA9 fwd	5'- TTGTGCCAAGTGTCAAGTGTG -3'	RT-qPCR
AtGASA9 rev	5'- GCTCACACATCACACATGCA -3'	RT-qPCR
AtAIG2A fwd	5'- TGGAGAATGGGATTTGAGGT -3'	RT-qPCR
AtAIG2A rev	5'- TCGTCGCCGCCTCTATAAAT -3'	RT-qPCR
AtPNP-A fwd	5'- TACTAGGTCTGCGTGTTA -3'	RT-qPCR
AtPNP-A rev	5'- AGAAATCAACTACCTTCACG -3'	RT-qPCR

## **AWF extractions**

AWF extraction was performed as described in chapitre I.

## **Proteomic and metabolomic analysis**

Proteomic and metabolomic analysis of AWF extracts were performed as described in chapitre I.

## **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed with the RStudio software. Unpaired t-test was used for RT-qPCR results, pathogenicity test results and GUS coloration results. A Pearson correlation test was performed between pathogenicity tests and GUS coloration results with the *pBcACP1::GUS* reporter strain of the fungus. Paired t-test was used for proteomic and metabolomic data.

## ACKNOWLEDGMENTS

Proteomics analyses were performed on the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr>) which is supported by INRAE (<http://www.inrae.fr>), the Ile-de-France regional council (<https://www.iledefrance.fr/education-recherche>), IBISA (<https://www.ibisa.net>) and CNRS (<http://www.cnrs.fr>). A.D. was supported by a doctoral fellowship. This work benefited from the support of IJPB's Plant Observatory technological platforms. IJPB received support from Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). We are grateful to Dr. Fabrice Roux (LIPME/INRAE, Toulouse) for sharing *A. thaliana* natural accessions of the TOU-A collection and to Dr. Fabien Chardon (IJPB/INRAE, Versailles) for his advices concerning the selection of *A. thaliana* accessions from the Versailles collection. This work was supported by INRAE-BAP (BcEqolisin).





## Discussion générale et perspectives

---

Les mécanismes qui contrôlent l'interaction entre *B. cinerea* et ses hôtes sont variés et complexes. Cette complexité s'explique par la multitude de facteurs de virulence produits par le champignon et soumis à des régulations fines dépendantes des facteurs environnementaux ainsi que de la perception de signaux provenant de la plante. De plus, les plantes possèdent plusieurs couches de défense modulées non seulement par les facteurs environnementaux mais également par les effecteurs du champignon. Il semblerait néanmoins que le devenir de cette interaction, aboutissant soit à une forte sensibilité soit à une résistance partielle de la plante, dépende grandement de la phase initiale de l'infection par *B. cinerea*. L'objectif global de mon projet de thèse était de mieux comprendre les échanges entre la plante et le champignon prenant place au niveau du compartiment apoplasmique lors de la phase initiale de l'interaction. Comme montré précédemment par mon équipe sur la plante modèle *A. thaliana*, la nutrition azotée a un fort impact sur cette phase initiale de l'interaction et notamment sur la capacité du champignon à produire ses facteurs de virulence (Soulie *et al.*, 2020). Je discuterai ici comment l'analyse de l'espace apoplasmique lors de l'infection ainsi que l'étude fonctionnelle de deux facteurs de virulence modulés par l'azote, *BcPNL1* et *BcACPI*, ont permis de mieux comprendre les processus mis en œuvre lors de la phase initiale de l'interaction entre *A. thaliana* et *B. cinerea*. De plus, nous discuterons de la notion de spécificité dans les réponses multi-stress des plantes en fonction des pathosystèmes étudiés et des différentes contraintes abiotiques.

# 1) Phase précoce de l'infection par *B. cinerea* et interaction avec la nutrition azotée de l'hôte

## A. Composante apoplasmique de l'interaction précoce

Le fluide de la matrice extracellulaire ou fluide apoplasmique contient des protéines et des métabolites constitutifs ou inductibles impliqués dans divers processus dont la défense contre les agents pathogènes (Vincent *et al.*, 2020). Relativement peu de descriptions protéomiques et métabolomiques de ce fluide sont disponibles dans la littérature et encore moins lors des interactions plantes-agents pathogènes. Mes travaux de thèse ont fait la première description multi-omique du fluide apoplasmique d'*A. thaliana* en réponse à *B. cinerea* lors de la phase précoce non-destructive du processus infectieux de ce champignon (chapitre I). Ces analyses révèlent un fort remaniement de ce compartiment en réponse à l'infection et notamment des modifications rappelant le rapide *trade-off* entre la croissance et la défense. Nous avons également montré qu'à un temps très précoce de l'infection (6 hpi), des différences d'accumulation de protéines et métabolites décrits comme impliqués dans la défense contre *B. cinerea* sont déjà visibles. On peut citer notamment les protéines AtPME17, AtDHyPRP1 ou AtPRX71 dont les lignées mutantes des gènes correspondants sont toutes moins résistantes à l'infection par *B. cinerea* (Del Corpo *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2014; Lorrai *et al.*, 2021). Ces analyses ont également révélé une rapide induction de la production de phytohormones à la suite de la perception de l'agent pathogène et probablement modulée par les effecteurs de ce dernier. En effet nous avons pu observer une accumulation de SA et d'un précurseur de l'ET (ACC) accompagnée d'une déplétion en OPDA, précurseur du JA. De plus, malgré leur faible abondance en comparaison avec les protéines végétales, des facteurs de virulence comme la polygalacturonase BcPG1 et la protéine nécrosante BcIEB1 ont pu être identifiées dans l'apoplasme. L'analyse du compartiment apoplasmique semble donc être une bonne méthode pour rechercher des acteurs importants de l'interaction plante-agent pathogène. Enfin, la comparaison des données de protéomique avec le transcriptome précédemment réalisé par l'équipe a permis de mettre en évidence 9 gènes induits par l'infection mais dont les protéines sont déplétées dans l'apoplasme. Il semblerait donc que celles-ci subissent une dégradation par le champignon ou des régulations post-transcriptionnelles. Etant donné qu'un grand nombre de ces protéines appartient à des familles protéiques ayant un rôle dans la défense comme les chitinases ou les LRR (*leucine rich repeat*), leur déplétion dans l'apoplasme lors de l'infection pourrait être impliquée dans l'augmentation de la sensibilité des plantes.

Afin de déterminer le rôle des acteurs identifiés et non décrits dans l'interaction, une analyse fonctionnelle est en cours notamment pour l'allantoïne, par l'analyse d'une lignée mutante délétée

d'un gène codant une allantoïnase et présentant une accumulation de ce composé. Le rôle des gènes *AtXTH23*, *AtPRX62*, *AtRNS1*, *AT4G01700* et *AtPNP-A* sera également étudié à l'aide des lignées mutantes correspondantes. Enfin, côté champignon certains gènes codant des protéines accumulées précocement dans l'apoplasme lors de l'infection sont de bons candidats pour une analyse fonctionnelle comme notamment *Bcin13g00960* codant une protéine chaperone. De plus, l'analyse de l'apoplasme ayant été réalisée à forte nutrition en nitrate, donc en condition de plus grande sensibilité de la plante, il serait intéressant de mener une analyse comparée avec la condition de résistance partielle induite par une faible nutrition en nitrate ou une nutrition en ammonium (Soulie *et al.*, 2020). Ces dernières analyses pourraient permettre de mettre en évidence d'autres facteurs de résistance de la plante.

## B. Implication des facteurs de virulence du champignon dans la régulation de l'interaction par la nutrition azotée

### 1. Les pectinases fongiques et notamment BcPNL1 contribuent à « l'effet azote »

Le rôle des polygalacturonases et des pectine méthylestérases dans le processus infectieux de *B. cinerea* a été décrit depuis longtemps par la communauté scientifique. En revanche, leur implication dans les différences de sensibilité de la plante liées aux contraintes abiotiques n'a jamais été rapporté. Mes travaux de thèse ont pu montrer que la nutrition azotée de la plante influence l'expression des gènes de trois des grandes familles de pectinases de ce champignon non seulement les *BcPGs* et les *BcPMEs* mais également les *BcPNLs*, moins étudiées chez cet agent pathogène. Des différences dans la composition des OGs produits lors de l'infection ont été mises en évidence, validant ainsi une modulation de l'activité des pectinases du champignon en fonction de la nutrition azotée de la plante. En effet, nous avons observé une différence dans le *turn-over* des produits de dégradation de la pectine corrélaté à une répression de la voie du JA à fort nitrate. Ce processus pourrait expliquer la plus grande sensibilité à l'infection d'*A. thaliana* cultivé à fort nitrate (Figure 1). Ces données s'appuient sur la caractérisation fonctionnelle de *BcPNL1*, première pectine lyase décrite comme importante pour la pathogénicité de ce champignon. En effet, celle-ci semblait contribuer à la phase initiale de l'infection non seulement par sa capacité à dégrader la pectine hautement méthylée et acétylée mais également par sa capacité à réprimer la voie du JA lors de l'infection. De plus, une réduction de la dégradation des celluloses et hémicelluloses a été observée avec le mutant *ΔBcpnl1* évoquant un lien entre BcPNL1 et les glucanases. L'approfondissement de ce lien entre dégradation de la pectine et des autres polymères pourrait permettre de mieux comprendre les premières étapes de la dégradation de la paroi lors de l'infection. Concernant les

différences dues à la nutrition azotée, notre hypothèse est que la réduction de l'activation de la voie du JA à fort azote repose en partie sur l'accumulation de longs produits de PNLs qui ont été décrits précédemment comme répresseurs du JA (Figure 1; Voxeur *et al.*, 2019). Lors de nos essais, leur faible abondance n'a pas permis leur détection car ils nécessitent l'utilisation d'une grande quantité de matériel. De ce fait, une nouvelle expérimentation permettant une analyse plus exhaustive des OGs produits au cours du temps lors de l'infection est prévue pour valider notre hypothèse.

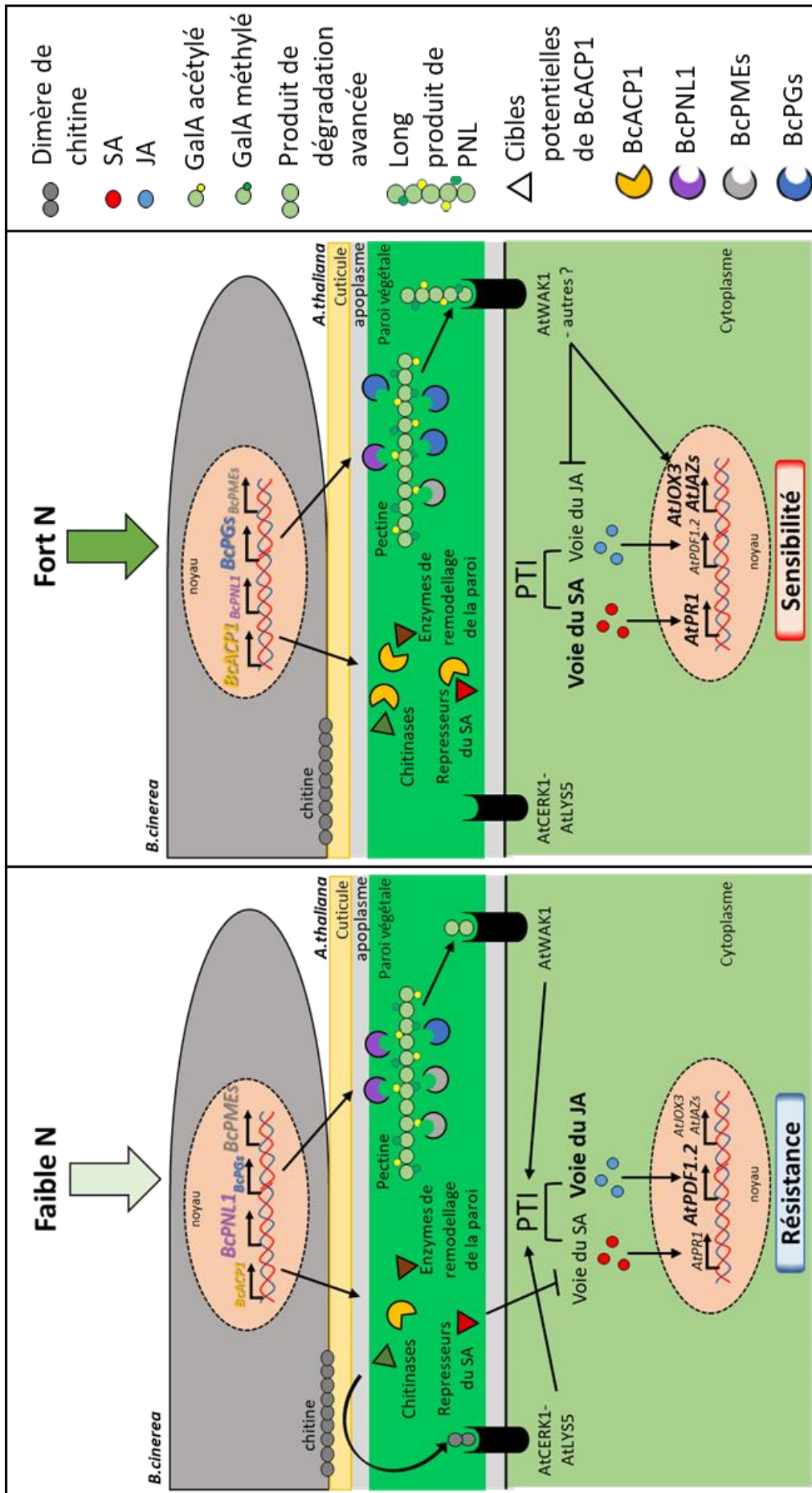
En revanche, une question importante subsiste, c'est celle de la signalisation en aval de ces longs produits de PNLs conduisant à la répression du JA. Chez *A. thaliana*, AtWAK1 a été décrit comme impliqué dans l'activation de la PTI par sa reconnaissance des OGs (Ferrari *et al.*, 2013). Gramegna *et al* (2016) ont montré que deux facteurs de sensibilité à l'infection par *B. cinerea*, AtGRP-3, une *glycin rich protein* de la paroi, et AtKAPP, une *kinase-associated protein phosphatase* de la membrane plasmique, interagissent avec AtWAK1 et conduisent à la répression du signal de la PTI. De ce fait, la perception des long OGs de PNL et la répression du JA pourraient être dépendantes d'AtWAK1 et de ses partenaires. Notre analyse protéomique de l'AWF a révélé une déplétion de AtGRP-3 lors de l'infection. De plus, d'après le transcriptome de l'équipe, ce gène s'exprime plus en conditions de fort nitrate comparé à faible nitrate lors de l'infection. Il serait intéressant de comparer les niveaux d'accumulation de AtGRP-3 dans l'apoplasme après infection à fort et faible nitrate. De même, nous pourrions tester chez *A. thaliana* des mutants de délétion et des surexprimeurs des gènes *AtGRP-3* et *AtKAPP* en les infectant aussi bien avec la souche sauvage du champignon qu'avec le mutant  $\Delta Bcprn1$  en condition de nutrition azotée contrastée. Ces analyses pourraient permettre de valider leur rôle dans la transduction du signal produit par les long OGs de PNL répresseurs des défenses et leur contribution aux différences de sensibilité à l'infection en fonction de la nutrition azotée.

## 2. Dualité du rôle de la protéase BcACP1 dans la pathogénicité de *B. cinerea*

Comme vu ci-dessus, l'analyse conjointe du protéome de l'AWF et du transcriptome après infection par *B. cinerea* suggère que certaines protéines de défense sont dégradées par des protéases fongiques. Le rôle dans la virulence de la protéase glutamique BcACP1 ainsi que sa régulation par la nutrition azotée de la plante avait été mis en évidence dans les précédents travaux de notre équipe (Soulie *et al.*, 2020). L'hypothèse émise par cette étude était que *BcACP1* contribue avec d'autres gènes de virulence du champignon à la plus grande sensibilité des plantes nourries à fort nitrate. Lors de l'étude plus approfondie du mutant  $\Delta Bcacpl$  pendant ma thèse, nous nous attendions à une potentielle réduction de l'effet nitrate sur la sensibilité de la plante. En effet, chez le riz une perte de différences de sensibilité à l'infection par *M. oryzae* en fonction de la nutrition azotée a été

retrouvée chez une lignée mutante au niveau d'un gène différentiellement exprimé en fonction de l'azote (Huang *et al.*, 2017). Mais, en utilisant un panel d'accessions naturelles d'*A. thaliana*, nous avons observé l'effet inverse avec le gène *BcACP1* du champignon puisque l'infection par le mutant  $\Delta BcACP1$  entraînait une augmentation de l'effet azote. En effet, les plantes nourries avec une faible concentration en nitrate étaient plus résistantes au mutant comparé à la souche sauvage alors que les plantes nourries à fort nitrate étaient plus sensibles au mutant. Ces résultats étaient cohérents avec la corrélation positive trouvée à faible nitrate et la corrélation négative observée à fort nitrate entre expression de *BcACP1* et virulence. Chez Col-0, nous avons pu mettre en évidence une réduction de l'activation de la voie du SA lors de la phase initiale de l'infection avec le mutant  $\Delta BcACP1$  en comparaison avec la souche sauvage. De plus, l'analyse des protéines accumulées dans l'AWF lors de l'infection avec le mutant  $\Delta BcACP1$  a permis de donner des pistes de compréhension du phénomène. En effet, les protéines AtAIG2A et AtPNP-A impliquées dans le rétrocontrôle de la voie du SA pourraient ici être des cibles directes ou indirectes de la protéase permettant ainsi d'expliquer la répression du SA (Pyo Lee *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Or nous avons également identifié la protéine AtPNP-A dans le chapitre I comme potentiellement dégradée par l'agent pathogène dans l'AWF renforçant ainsi l'hypothèse de sa dégradation par BcACP1. Bien que nous n'ayons pas encore pu valider expérimentalement des cibles directes de la protéase, l'identification de chitinases, de régulateurs du SA et de protéines de remodelage de la paroi nous permet de faire des hypothèses sur la fonction de BcACP1 (Figure 1).

Pour valider le lien entre ces protéines cibles et la protéase, des tests sur des lignées mutantes des gènes codant pour ces protéines sont en cours dans le but de rechercher une perte du phénotype observé avec le mutant  $\Delta BcACP1$ . Il est intéressant de remarquer que la protéolyse de protéines de remodelage de la paroi par BcACP1 pourrait contribuer, avec les pectinases du champignon, aux différences dans la production des OGs lors de l'infection observée dans le chapitre II. Des résultats préliminaires d'infection soit avec le mutant  $\Delta BcACP1$  soit avec la souche sauvage montrent effectivement des différences dans la production d'OGs (données non présentées). Ces résultats seront confirmés par d'autres expérimentations afin de valider le lien entre BcACP1 et la production d'OGs lors de l'infection. Enfin, cette recherche de cible dans l'AWF n'ayant été réalisée qu'à forte nutrition en nitrate dans un premier temps, les résultats en attente de l'analyse comparée entre fort et faible nitrate nous permettront peut-être de mieux comprendre les différents rôles de BcACP1 en fonction de l'azote.



**Figure 1 :** Représentation schématique des principales conclusions et hypothèses des chapitre II et III. La quantité d'azote apportée à *A. thaliana* conditionne l'expression de *BcACP1* et des enzymes de dégradation de la paroi de *B. cinerea*. Le *turn-over* des produits de dégradation de la paroi est plus rapide à faible azote ce qui conduit à une plus forte activation de la voie du JA importante pour la défense. Toujours à faible azote, la plus faible expression de la protéase *BcACP1* entraîne une accumulation de ses cibles apoplasmiques et une meilleure résistance de la plante, conjointement avec l'activation du JA dépendante des OGs. En condition de fort azote, l'accumulation de longs produits de PNL conduit à une répression de la voie du JA. Parallèlement, *BcACP1* est fortement exprimé dans ces conditions ce qui contribue à l'induction de la voie du SA entraînant une augmentation de la sensibilité des plantes.

### 3. Quels sont les signaux responsables des différences d'expression des facteurs de virulence ?

L'observation initiale qui a conduit mes travaux de thèse à se focaliser sur les gènes de pectinases du champignon et sur *BcACPI* est la modulation de leur expression lors de l'infection en fonction de la nutrition azotée de la plante. Bien que mes travaux aient permis de mieux comprendre leur rôle dans l'infection, les signaux à l'origine des différences d'expression de ces gènes restent inconnus. Des travaux sur d'autres pathosystèmes suggèrent que la fertilisation azotée augmente la disponibilité en nutriments pour l'agent pathogène et donc sa croissance et sa virulence (Huang *et al.*, 2017; Oh *et al.*, 2017). Néanmoins chez différents agents pathogènes, les facteurs de virulence semblent davantage exprimés *in vitro* en condition de limitation en azote (Chu *et al.*, 2015; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992). C'est le cas de la protéase *BcACPI* pour qui Rolland & Bruel (2008) ont mis en évidence une répression de son expression en présence de sources rapidement métabolisables d'azote et de soufre. Néanmoins, nos travaux *in planta* ont révélé une régulation opposée à celle observée *in vitro* puisque *BcACPI* s'exprimait plus fortement lors de l'infection de plante nourries à fort nitrate (Soulie *et al.*, 2020). De plus, cette étude a montré que les légères différences d'accumulation de nitrate et d'ammonium dans les feuilles en fonction de la nutrition ne peuvent expliquer *in vitro* les différences d'expression *in planta* des gènes du champignon, dont *BcACPI*, *BcPGI* et *BcPME3*. Ainsi, la régulation de ces gènes ne dépendrait pas seulement de la disponibilité en azote pour l'agent pathogène.

Concernant les pectinases, nous avons émis l'hypothèse que des différences endogènes dans la composition de la pectine des plantes cultivées à fort ou faible nitrate pourraient contribuer aux différences d'expression des gènes du champignon. En effet, l'expression des pectinases des agents pathogènes est connue pour être induite par la pectine et ses différents composés (Yadav *et al.*, 2009). Néanmoins, aucune différence endogène majeure n'a pu être observée dans les résultats préliminaires d'empreinte enzymatique de la pectine des parois végétales de plantes cultivées à fort et faible nitrate. Une analyse plus complète, incluant les autres polymères de la paroi, permettrait peut-être d'observer des différences liées à la nutrition azotée qui jouerait sur l'accessibilité de la pectine pour le champignon lors de l'infection et donc sur la régulation des enzymes de dégradation.

Concernant *BcACPI*, nous avons observé *in vitro* l'induction de son expression par les composants de l'AWF de feuilles extraites après infection. De plus, les AWFs obtenus avec le mutant *ΔBcacpl* entraînaient *in vitro* une induction plus forte de l'expression de *BcACPI* que ceux obtenus avec la souche sauvage. Des différences d'accumulation de métabolites ou de protéines pourraient donc expliquer ces résultats. Ainsi, il serait intéressant de tester la capacité d'induction d'extraits d'AWF de feuilles non infectées et infectées obtenus à fort et faible nitrate et de comparer

leur contenu protéique et métabolique pour y rechercher des inducteurs. De plus, une dialyse des protéines de l'AWF pourrait permettre de déterminer si l'induction est due à des protéines ou bien des métabolites. Enfin, tester de manière isolée les molécules identifiées dans ces différentes approches pourrait permettre de trouver l'origine des différences d'expression de *BcACP1*. Bi *et al* (2016) ont montré que l'infection par *C. gloeosporioides* peut conduire à une augmentation ou une diminution du pH en fonction de l'hôte infecté. De plus, les auteurs ont montré *in vitro* qu'une forte disponibilité en carbone induit l'acidification du milieu par ce champignon et d'autres comme *P. expansum*, *A. nidulans* and *F. oxysporum* alors qu'une limitation en carbone induit l'alcalinisation du milieu. Etant donné la forte régulation de l'expression de *BcACP1* par le pH, démontrée par Rolland *et al* (2009), il serait intéressant de rechercher des différences de pH dans l'apoplasme dans les différentes conditions de nutrition azotée de la plante.



## 2) Spécificité de la réponse à la combinaison de stress biotiques et abiotiques ?

### A. La nutrition azotée et les autres pathosystèmes

Chaque pathosystème présente des spécificités ce qui contraint l'extrapolation des résultats à d'autres interactions. Même lors de l'infection par le même agent pathogène, en fonction de l'hôte colonisé l'interaction n'est pas soumise aux mêmes règles. Par exemple, dans nos travaux une forte nutrition en nitrate augmente la sensibilité d'*A. thaliana* à l'infection par *B. cinerea* alors qu'elle la diminue sur la tomate (F. Lecompte *et al.*, 2010; Soulie *et al.*, 2020; Vega *et al.*, 2015). Néanmoins, ces études mettent en évidence une modulation de l'activation des défenses par les voies hormonales en fonction de la nutrition azotée de la plante lors de l'infection dans ces deux pathosystèmes. De par leur capacité à moduler les défenses de la plante, les facteurs de virulence que nous avons mis en évidence pourraient être impliqués dans les différences de sensibilité de la tomate en fonction de l'azote (Figure 1). Nous avons montré que la tomate est moins sensible à l'infection par le mutant  $\Delta Bc p n l 1$  (voir chapitre II) et des données non présentées montrent la même chose avec le mutant  $\Delta Bc a c p 1$  ce qui suggère que ces facteurs de virulence n'ont pas de spécificité d'hôte. De ce fait, il serait intéressant de rechercher chez le champignon si les niveaux d'expression de BcPNL1 et des autres pectinases ainsi que de *BcACP1* sont modulés lors de l'infection par la nutrition en nitrate de la tomate et si cette modulation est similaire à celle observée chez *A. thaliana*. Dans le cas du pathosystème *Oriza sativa*-*M. oryzae*, il semblerait qu'il n'y ait pas de différences dans l'expression des pectinases ou des protéases de l'agent pathogène en fonction de la nutrition azotée mais plutôt de petites protéines sécrétées agissant comme effecteurs décrits ou putatifs (Huang *et al.*, 2017). Ces différences pourraient être liées au type trophique étant donné l'importance des effecteurs chez l'hémibiotrophe *M. oryzae* et l'importance des CWDEs chez le nécrotrophe *B. cinerea*. L'étude de l'expression de ces gènes chez d'autres agents pathogènes dans d'autres pathosystèmes modulés par la nutrition azotée de la plante permettrait d'avoir une vision plus globale de l'influence de ce facteur abiotique sur la virulence.

### B. Réponse générique aux différentes combinaisons de stress biotiques et abiotiques chez la plante ?

Dans le domaine d'étude des multi-stress chez la plante un questionnement existe vis-à-vis de l'existence de régulateurs généralistes des réponses à la combinaison de stress abiotiques et biotiques. Côté plante, de tels régulateurs semblent exister puisqu'il a été montré que CBP60g et SARD1 sont non seulement impliqués dans la réponse d'*A.thaliana* à *P. syringae* en condition de

stress thermique mais également en condition de stress hydrique (Choudhary & Senthil-Kumar, 2022; J. H. Kim *et al.*, 2022). De même, les facteurs de transcription NAC semblent être de bons candidats non seulement car ils sont impliqués dans la régulation des stress biotiques et abiotiques mais également car certains gènes de cette famille sont apparus différenciellement exprimés dans des études transcriptomiques en conditions de stress combinés (Soulie *et al.*, 2020; Vega *et al.*, 2015).

La question se pose donc de l'existence chez les agents pathogènes de régulateurs impliqués dans la réponse générale à l'état physiologique de la plante hôte. Dans nos travaux, des gènes de *PGs*, de *PNLs*, de *PMEs* et *BcACPI* ont été identifiés comme différenciellement exprimés en fonction de la nutrition azotée de la plante. Les *PGs* et *BcACPI* ont en commun une régulation par le pH et la disponibilité en carbone (Rolland *et al.*, 2009; Rolland & Bruel, 2008; Wubben *et al.*, 2000). En effet, *BcACPI* et les *BcPGs* sont des gènes plus fortement exprimés à pH acide et réprimés en présence de sources rapidement métabolisables de carbone. De plus, *BcACPI* est soumis également à une répression catabolique au soufre et à l'azote. De ce fait, l'induction de ces gènes en conditions limitantes en azote, carbone et soufre suggère qu'ils pourraient être importants lors de la colonisation d'environnements hostiles pour le champignon comme peut l'être une plante stressée. Tester leur niveau d'expression lors de l'infection de plantes soumises à différents types de stress abiotiques pourrait confirmer cette hypothèse. D'autre part, chez *B. cinerea* le mutant de délétion du facteur de transcription *BcPACC* impliqué dans la régulation des gènes dépendant du pH présente une dérégulation significative de l'expression de *BcACPI* et d'une pectinase (*Bcin10g06130*). Il existe également chez *B. cinerea* un homologue du facteur de transcription *CREA* impliqué dans la répression catabolique au carbone à laquelle *BcACPI* et les gènes de pectinases sont soumis (Tudzynski *et al.*, 2000). Enfin, Zhang *et al* (2016) ont identifié le gène *BcGAAR*, un facteur de transcription induisant chez le champignon l'expression de gènes en réponse à l'acide galacturonique (GalA), monomère du polymère de pectine. Ce facteur de transcription régule notamment des gènes impliqués dans l'utilisation du GalA mais également l'expression de *CWDEs* dont *BcPG2*. Il serait intéressant de rechercher si les différences d'expression en fonction de l'azote des gènes de pectinases et de *BcACPI* observées sont corrélées à des différences d'activité de ces trois facteurs de transcription (*PACC*, *CREA*, *GAAR*) chez *B. cinerea*. De plus, étudier ces facteurs de transcription très conservés dans d'autres pathosystèmes et lors de l'infection de plantes soumises à différentes contraintes abiotiques permettrait de définir s'ils contribuent de manière générale ou spécifique à la réponse aux stress combinés.

Identifier et décrire de façon approfondie des facteurs clés dans la régulation des interactions entre stress biotiques et abiotiques chez les plantes mais également chez les agents pathogènes permettrait de prédire à plus grande échelle l'impact des changements climatiques et des contraintes

environnementales à venir sur les maladies des plantes. Cela permettrait également de trouver des solutions notamment par l'amélioration des plantes ainsi que la modification de nos pratiques culturales.

## Références

---

- Abd El Rahman, T., El Oirdi, M., Gonzalez-Lamothe, R., & Bouarab, K. (2012). Necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12), 1584–1593. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0187-R>
- AbuQamar, S., Moustafa, K., & Tran, L. S. P. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 262–274. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1271767>
- Achuo, E. A., Prinsen, E., & Höfte, M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology*, 55(2), 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>
- Aerts, N., Chhillar, H., Ding, P., & Van Wees, S. C. M. (2022). Transcriptional regulation of plant innate immunity. *Essays in Biochemistry*, 66(5), 607–620. <https://doi.org/10.1042/EBC20210100>
- Aguayo, C., Riquelme, J., Valenzuela, P. D. T., Hahn, M., & Moreno Silva, E. (2011). Bchx virulence gene of *Botrytis cinerea*: Characterization and functional analysis. *Journal of General Plant Pathology*, 77(4), 230–238. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0311-4>
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>
- Almagro, A., Shan, H. L., & Yi, F. T. (2008). Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell*, 20(12), 3289–3299. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056788>
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., ... Dickman, M. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
- An, H. J., Lurie, S., Greve, L. C., Rosenquist, D., Kirmiz, C., Labavitch, J. M., & Lebrilla, C. B. (2005). Determination of pathogen-related enzyme action by mass spectrometry analysis of pectin breakdown products of plant cell walls. *Analytical Biochemistry*, 338(1), 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.11.004>
- Aoi, Y., Hira, H., Hayakawa, Y., Liu, H., Fukui, K., Dai, X., Tanaka, K., Hayashi, K., Zhao, Y., Kasahara, H., & Jolla, L. (2020). UDP-glucosyltransferase UGT84B1 regulates the levels of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 532(2), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.026>
- Aragón, W., Formey, D., Aviles-Baltazar, N. Y., Torres, M., & Serrano, M. (2021). *Arabidopsis thaliana* Cuticle Composition Contributes to Differential Defense Response to *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 12(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.738949>
- Arbelet, D., Malfatti, P., Simond-Côte, E., Fontaine, T., Desquilbet, L., Expert, D., Kunz, C., & Soulié, M. C. (2010). Disruption of the *Bchs3a* chitin synthase gene in *Botrytis cinerea* is responsible for altered adhesion and overstimulation of host plant immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(10), 1324–1334. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-10-0046>
- Asai, S., & Yoshioka, H. (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 22(6), 619–629. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-6-0619>

- Asselbergh, B., & Höfte, M. (2007). Basal tomato defences to *Botrytis cinerea* include abscisic acid-dependent callose formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *71*(1–3), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.10.001>
- Atwell, S., Corwin, J. A., Soltis, N. E., Subedy, A., Denby, K. J., & Kliebenstein, D. J. (2015). Whole genome resequencing of *Botrytis cinerea* isolates identifies high levels of standing diversity. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00996>
- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., & Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *Plant Journal*, *93*(4), 614–636. <https://doi.org/10.1111/tpj.13807>
- Balliau, T., Blein-Nicolas, M., & Zivy, M. (2018). Evaluation of optimized tube-gel methods of sample preparation for large-scale plant proteomics. *Proteomes*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/proteomes6010006>
- Bazinet, Q., Tang, L., & Bede, J. C. (2022). Impact of Future Elevated Carbon Dioxide on C3 Plant Resistance to Biotic Stresses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *35*(7), 527–539. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-21-0189-FI>
- Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M., & Yoshioka, H. (2013). Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(3), 271–277. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0214-CR>
- Beloshistov, R. E., Dreizler, K., Galiullina, R. A., Tuzhikov, A. I., Serebryakova, M. V., Reichardt, S., Shaw, J., Taliansky, M. E., Pfannstiel, J., Chichkova, N. V., Stintzi, A., Schaller, A., & Vartapetian, A. B. (2018). Phytaspase-mediated precursor processing and maturation of the wound hormone systemin. *New Phytologist*, *218*(3), 1167–1178. <https://doi.org/10.1111/nph.14568>
- Ben M'Barek, S., Cordewener, J. H. G., van der Lee, T. A. J., America, A. H. P., Mirzadi Gohari, A., Mehrabi, R., Hamza, S., de Wit, P. J. G. M., & Kema, G. H. J. (2015). Proteome catalog of *Zymoseptoria tritici* captured during pathogenesis in wheat. *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.018>
- Benedetti, M., Pontiggia, D., Raggi, S., Cheng, Z., Scaloni, F., Ferrari, S., Ausubel, F. M., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2015). Plant immunity triggered by engineered in vivo release of oligogalacturonides, damage-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(17), 5533–5538. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504154112>
- Benedetti, M., Verrascina, I., Pontiggia, D., Locci, F., Mattei, B., De Lorenzo, G., & Cervone, F. (2018). Four *Arabidopsis* berberine-bridge enzyme-like proteins are specific oxidases that inactivate the elicitor-active oligogalacturonides. *Plant Journal*, *94*(2), 260–273. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Berbee, M. L., James, T. Y., & Strullu-Derrien, C. (2017). Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. *Annual Review of Microbiology*, *71*, 41–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020324>
- Berkey, R., Bendigeri, D., & Xiao, S. (2012). Sphingolipids and plant defense/disease: The “death” connection and beyond. *Frontiers in Plant Science*, *3*(APR), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00068>
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., & King, J. (2009). Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling and Behavior*, *4*(2), 158–159. <https://doi.org/10.4161/psb.4.2.7688>
- Bi, F., Barad, S., Ment, D., Luria, N., Dubey, A., Casado, V., Glam, N., Mínguez, J. D., Espeso, E. A., Fluhr, R., & Prusky, D. (2016). Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecules that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, *17*(8), 1178–1195. <https://doi.org/10.1111/mpp.12355>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2022). Killing softly: a roadmap of *Botrytis*

- cinerea pathogenicity. *Trends in Plant Science*, xx(xx), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Bi, K., Scalschi, L., Jaiswal, N., Mengiste, T., Fried, R., Sanz, A. B., Arroyo, J., Zhu, W., Masrati, G., & Sharon, A. (2021). The Botrytis cinerea Crh1 transglycosylase is a cytoplasmic effector triggering plant cell death and defense response. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22436-1>
- Bidzinski, P., Ballini, E., Ducasse, A., Michel, C., Zuluaga, P., Genga, A., Chiozzotto, R., & Morel, J. B. (2016). Transcriptional basis of drought-induced susceptibility to the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. *Frontiers in Plant Science*, 7(OCTOBER2016), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01558>
- Blanco-Ulate, B., Morales-Cruz, A., Amrine, K. C. H., Labavitch, J. M., Powell, A. L. T., & Cantu, D. (2014). Genome-wide transcriptional profiling of Botrytis cinerea genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Frontiers in Plant Science*, 5(SEP), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00435>
- Bolton, M. D., & Thomma, B. P. H. J. (2008). The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4–6), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.07.001>
- Borniego, M. L., Molina, M. C., Guiamét, J. J., & Martinez, D. E. (2020). Physiological and Proteomic Changes in the Apoplast Accompany Leaf Senescence in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 10(January), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01635>
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M. T., & Pont-Lezica, R. (2005). Cell wall proteins in apoplastic fluids of Arabidopsis thaliana rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, 5(1), 212–221. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400882>
- Breitenbach, H. H., Wenig, M., Wittek, F., Jordá, L., Maldonado-Alconada, A. M., Sarioglu, H., Colby, T., Knappe, C., Bichlmeier, M., Pabst, E., Mackey, D., Parker, J. E., & Corina Vlot, A. (2014). Contrasting roles of the apoplastic aspartyl protease APOPLASTIC, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1-DEPENDENT1 and LEGUME LECTIN-LIKE PROTEIN1 in arabidopsis systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 165(2), 791–809. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239665>
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4(165). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N. R., De Vries, M., Zeilmaker, T., Van Wees, S. C. M., Schuurink, R. C., & Van den Ackerveken, G. (2017). Arabidopsis JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(24), 6388–6393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701101114>
- Cabianca, A., Müller, L., Pawlowski, K., & Dahlin, P. (2021). Changes in the plant  $\beta$ -sitosterol/stigmasterol ratio caused by the plant parasitic nematode meloidogyne incognita. *Plants*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10020292>
- Camañes, G., Pastor, V., Cerezo, M., García-agustín, P., & Herrero, V. F. (2012). A deletion in the nitrate high affinity transporter responses to Pseudomonas syringae. *June*, 619–622.
- Camañes, G., Pastor, V., Cerezo, M., García-Andrade, J., Vicedo, B., García-Agustín, P., & Flors, V. (2012). A deletion in NRT2.1 attenuates pseudomonas syringae-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiology*, 158(2), 1054–1066. <https://doi.org/10.1104/pp.111.184424>
- Casasoli, M., Spadoni, S., Lilley, K. S., Cervone, F., De Lorenzo, G., & Mattei, B. (2008).

- Identification by 2-D DIGE of apoplastic proteins regulated by oligogalacturonides in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, 8(5), 1042–1054. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700523>
- Caseys, C., Shi, G., Soltis, N., Gwinner, R., Corwin, J., Atwell, S., & Kliebenstein, D. J. (2021). Quantitative interactions: The disease outcome of *Botrytis cinerea* across the plant kingdom. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 11(8). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab175>
- Cassin-Ross, G., & Hu, J. (2014). A simple assay to identify peroxisomal proteins involved in 12-oxo-phytodienoic acid metabolism. *Plant Signaling and Behavior*, 9(JUN), 9–10. <https://doi.org/10.4161/psb.29464>
- Castrillo, G., Teixeira, P. J. P. L., Paredes, S. H., Law, T. F., De Lorenzo, L., Feltcher, M. E., Finkel, O. M., Breakfield, N. W., Mieczkowski, P., Jones, C. D., Paz-Ares, J., & Dangl, J. L. (2017). Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature*, 543(7646), 513–518. <https://doi.org/10.1038/nature21417>
- Chambers, M. C., MacLean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M. Y., Paulse, C., Creasy, D., ... Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*, 30(10), 918–920. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>
- Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, H. J., Métraux, J. P., & Lamotte, O. (2008). Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *Plant Journal*, 55(4), 555–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03540.x>
- Chassot, C., Nawrath, C., & Métraux, J. P. (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant Journal*, 49(6), 972–980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03017.x>
- Chávez Montes, R. A., Ranocha, P., Martinez, Y., Minic, Z., Jouanin, L., Marquis, M., Saulnier, L., Fulton, L. M., Cobbett, C. S., Bitton, F., Renou, J. P., Jauneau, A., & Goffner, D. (2008). Cell wall modifications in *Arabidopsis* plants with altered  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase activity. *Plant Physiology*, 147(1), 63–67. <https://doi.org/10.1104/pp.107.110023>
- Chen, H., Zhang, S., He, S., A. R., Wang, M., & Liu, S. (2022). The necrotroph *Botrytis cinerea* promotes disease development in *Panax ginseng* by manipulating plant defense signals and antifungal metabolites degradation. *Journal of Ginseng Research*, xxx. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2022.03.005>
- Chen, J. Y., Xiao, H. L., Gui, Y. J., Zhang, D. D., Li, L., Bao, Y. M., & Dai, X. F. (2016). Characterization of the *Verticillium dahliae* exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01709>
- Chen, X., Li, X., Duan, Y., Pei, Z., Liu, H., Yin, W., Huang, J., Luo, C., Chen, X., Li, G., Xie, K., Hsiang, T., & Zheng, L. (2022). A secreted fungal subtilase interferes with rice immunity via degradation of SUPPRESSOR OF G2 ALLELE OF *skp1*. 1474–1489.
- Cherrad, S., Girard, V., Dieryckx, C., Gonçalves, I. R., Dupuy, J. W., Bonneau, M., Rascle, C., Job, C., Job, D., Vacher, S., & Poussereau, N. (2012). Proteomic analysis of proteins secreted by *Botrytis cinerea* in response to heavy metal toxicity. *Metallomics*, 4(8), 835–846. <https://doi.org/10.1039/c2mt20041d>
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020). The destructive fungal pathogen *Botrytis cinerea*—insights from genes studied with mutant analysis. *Pathogens*, 9(11), 1–46. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>
- Chiniquy, D., Underwood, W., Corwin, J., Ryan, A., Szemenyei, H., Lim, C. C., Stonebloom, S. H., Birdseye, D. S., Vogel, J., Kliebenstein, D., Scheller, H. V., & Somerville, S. (2019). PMR5, an acetylation protein at the intersection of pectin biosynthesis and defense against

- fungal pathogens. *Plant Journal*, *100*(5), 1022–1035. <https://doi.org/10.1111/tpj.14497>
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). Botrytis cinerea virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, *277*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>
- Choquer, M., Rascle, C., Gonçalves, I. R., de Vallée, A., Ribot, C., Loisel, E., Smilevski, P., Ferria, J., Savadogo, M., Souibgui, E., Gagey, M. J., Dupuy, J. W., Rollins, J. A., Marcato, R., Noûs, C., Bruel, C., & Poussereau, N. (2021). The infection cushion of Botrytis cinerea: a fungal ‘weapon’ of plant-biomass destruction. *Environmental Microbiology*, *23*(4), 2293–2314. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15416>
- Choudhary, A., & Senthil-Kumar, M. (2022). Drought attenuates plant defence against bacterial pathogens by suppressing the expression of CBP60g/SARD1 during combined stress. *Plant Cell and Environment*, *45*(4), 1127–1145. <https://doi.org/10.1111/pce.14275>
- Chu, J., Li, W. F., Cheng, W., Lu, M., Zhou, K. H., Zhu, H. Q., Li, F. G., & Zhou, C. Z. (2015). Comparative analyses of secreted proteins from the phytopathogenic fungus Verticillium dahliae in response to nitrogen starvation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1854*(5), 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.02.004>
- Claverie, J., Balacey, S., Lemaître-Guillier, C., Brulé, D., Chiltz, A., Granet, L., Noirot, E., Daire, X., Darblade, B., Héloir, M. C., & Poinssot, B. (2018). The cell wall-derived xyloglucan is a new DAMP triggering plant immunity in vitis vinifera and arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, *871*(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01725>
- Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Corwin, J. A., Subedy, A., Eshbaugh, R., & Kliebenstein, D. J. (2016). Expansive phenotypic landscape of Botrytis cinerea shows differential contribution of genetic diversity and plasticity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *29*(4), 287–298. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-15-0196-R>
- Cotoras, M., & Silva, E. (2005). Differences in the initial events of infection of Botrytis cinerea strains isolated from tomato and grape. *Mycologia*, *97*(2), 485–492. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832824>
- Craig, R., Cortens, J. P., & Beavis, R. C. (2004). Open source system for analyzing, validating, and storing protein identification data. *Journal of Proteome Research*, *3*(6), 1234–1242. <https://doi.org/10.1021/pr049882h>
- Dalmaï, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I. G., & Viaud, M. (2011a). The Botrytis cinerea phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*, *12*(6), 564–579. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x>
- Dalmaï, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I. G., & Viaud, M. (2011b). The Botrytis cinerea phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*, *12*(6), 564–579. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x>
- Daudi, A., Cheng, Z., O’Brien, J. A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F. M., & Paul Bolwell, G. (2012). The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell*, *24*(1), 275–287. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093039>
- Davidsson, P., Broberg, M., Kariola, T., Sipari, N., Pirhonen, M., & Palva, E. T. (2017). Short oligogalacturonides induce pathogen resistance-associated gene expression in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0959-1>



- Davis, J. L., Armengaud, P., Larson, T. R., Graham, I. A., White, P. J., Newton, A. C., & Amtmann, A. (2018). Contrasting nutrient–disease relationships: Potassium gradients in barley leaves have opposite effects on two fungal pathogens with different sensitivities to jasmonic acid. *Plant Cell and Environment*, *41*(10), 2357–2372. <https://doi.org/10.1111/pce.13350>
- de Saint Germain, A., Jacobs, A., Brun, G., Pouvreau, J. B., Braem, L., Cornu, D., Clavé, G., Baudu, E., Steinmetz, V., Servajean, V., Wicke, S., Gevaert, K., Simier, P., Goormachtig, S., Delavault, P., & Boyer, F. D. (2021). A Phelipanche ramosa KAI2 protein perceives strigolactones and isothiocyanates enzymatically. *Plant Communications*, *2*(5), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100166>
- de Souza, A., Hull, P. A., Gille, S., & Pauly, M. (2014). Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta*, *240*(5), 1123–1138. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2139-6>
- de Vallée, A., Bally, P., Bruel, C., Chandat, L., Choquer, M., Dieryckx, C., Dupuy, J. W., Kaiser, S., Latorse, M. P., Loisel, E., Mey, G., Morgant, G., Rasclé, C., Schumacher, J., Simon, A., Souibgui, E., Viaud, M., Villalba, F., & Poussereau, N. (2019). A Similar Secretome Disturbance as a Hallmark of Non-pathogenic Botrytis cinerea ATMT-Mutants? *Frontiers in Microbiology*, *10*(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02829>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dechorgnat, J., Patrit, O., Krapp, A., Fagard, M., & Daniel-Vedele, F. (2012). Characterization of the Nrt2.6 gene in Arabidopsis thaliana: A link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS ONE*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042491>
- Del Corpo, D., Fullone, M. R., Miele, R., Lafond, M., Pontiggia, D., Grisel, S., Kieffer-Jaquinod, S., Giardina, T., Bellincampi, D., & Lionetti, V. (2020). AtPME17 is a functional Arabidopsis thaliana pectin methylesterase regulated by its PRO region that triggers PME activity in the resistance to Botrytis cinerea. *Molecular Plant Pathology*, *21*(12), 1620–1633. <https://doi.org/10.1111/mpp.13002>
- Delaunoy, B., Colby, T., Belloy, N., Conreux, A., Harzen, A., Baillieul, F., Clément, C., Schmidt, J., Jeandet, P., & Cordelier, S. (2013). Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC Plant Biology*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-24>
- Demkura, P. V., & Ballaré, C. L. (2012). UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against Botrytis cinerea by controlling sinapate accumulation. *Molecular Plant*, *5*(3), 642–652. <https://doi.org/10.1093/mp/sss025>
- Denton-Giles, M., McCarthy, H., Sehrish, T., Dijkwel, Y., Mesarich, C. H., Bradshaw, R. E., Cox, M. P., & Dijkwel, P. P. (2020). Conservation and expansion of a necrosis-inducing small secreted protein family from host-variable phytopathogens of the Sclerotiniaceae. *Molecular Plant Pathology*, *28*(October 2019), 1–15. <https://doi.org/10.1111/mpp.12913>
- Dewdney, J., Lynne Reuber, T., Wildermuth, M. C., Devoto, A., Cui, J., Stutius, L. M., Drummond, E. P., & Ausubel, F. M. (2000). Three unique mutants of Arabidopsis identify eds loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant Journal*, *24*(2), 205–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2000.00870.x>
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *The Fungal Kingdom*, 703–726. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch34>
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(5), 547–

552. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.07.005>
- Dordas, C. (2009). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: A review. *Sustainable Agriculture*, 443–460. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8\\_28](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_28)
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., & Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*, 16(4), 299–302. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., & Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), 12580–12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112>
- El-Oirdi, M., El-Rahman, T. A., Rigano, L., El-Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A., & Bouarab, K. (2011). Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in Tomato. *Plant Cell*, 23(6), 2405–2421. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083394>
- Elad, Y., Pertot, I., Marina Cotes Prado, A., & Stewart, A. (2016). Plant Hosts of Botrytis spp. In *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 413–486). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. *Plant Physiology*, 184(1), 39–52. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00433>
- Erismann, J. W., Sutton, M. A., Galloway, J., Klimont, Z., & Winiwarer, W. (2008). How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience*, 1(10), 636–639. <https://doi.org/10.1038/ngeo325>
- Espino, J. J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R., & González, C. (2010). The Botrytis cinerea early secretome. *Proteomics*, 10(16), 3020–3034. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000037>
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E., & Scharte, J. (2008). RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiology*, 147(3), 1288–1299. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121418>
- Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., Krapp, A., Soulié, M. C., & Masclaux-Daubresse, C. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5643–5656. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru323>
- Fan, J., Doerner, P., & Lamb, C. (2011). Pseudomonas sax Genes Overcome Non-Host Resistance in Arabidopsis. *Science*, 1185(March), 1185–1188.
- Farjad, M., Clément, G., Launay, A., Jeridi, R., Jolivet, S., Citerne, S., Rigault, M., Soulie, M. C., Dinant, S., & Fagard, M. (2021). Plant nitrate supply regulates Erwinia amylovora virulence gene expression in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, 22(11), 1332–1346. <https://doi.org/10.1111/mpp.13114>
- Farjad, M., Rigault, M., Pateyron, S., Martin-Magniette, M. L., Krapp, A., Meyer, C., & Fagard, M. (2018). Nitrogen limitation alters the response of specific genes to biotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113364>
- Fasoyin, O. E., Yang, K., Qiu, M., Wang, B., Wang, S., & Wang, S. (2019). Regulation of morphology, aflatoxin production, and virulence of aspergillus flavus by the major nitrogen regulatory gene area. *Toxins*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/toxins11120718>
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K. F., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., & Zhou, Q. (2010). An inexpensive method for extraction of genomic DNA from fungal mycelia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(3), 396–401. <https://doi.org/10.1080/07060661.2010.508620>

- Fernández-Acero, F. J., Colby, T., Harzen, A., Carbú, M., Wieneke, U., Cantoral, J. M., & Schmidt, J. (2010). 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. In *Proteomics* (Vol. 10, Issue 12, pp. 2270–2280). <https://doi.org/10.1002/pmic.200900408>
- Fernández-Crespo, E., Scalschi, L., Llorens, E., García-Agustín, P., & Camañes, G. (2015). NH<sub>4</sub><sup>+</sup> protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by activation of systemic acquired acclimation. *Journal of Experimental Botany*, *66*(21), 6777–6790. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv382>
- Fernández-Pérez, F., Pomar, F., Pedreño, M. A., & Novo-Uzal, E. (2015). The suppression of AtPrx52 affects fibers but not xylem lignification in *Arabidopsis* by altering the proportion of syringyl units. *Physiologia Plantarum*, *154*(3), 395–406. <https://doi.org/10.1111/ppl.12310>
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F. M., & Dewdney, J. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology*, *144*(1), 367–379. <https://doi.org/10.1104/pp.107.095596>
- Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., & Ausubel, F. M. (2003). *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal*, *35*(2), 193–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01794.x>
- Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, *4*(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00049>
- Ficarra, F. A., Grandellis, C., Garavaglia, B. S., Gottig, N., & Ottado, J. (2018). Bacterial and plant natriuretic peptides improve plant defence responses against pathogens. *Molecular Plant Pathology*, *19*(4), 801–811. <https://doi.org/10.1111/mpp.12560>
- Fiehn, O. (2006). Metabolite profiling in *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *323*(4), 439–447. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:439>
- Fiehn, O., Wohlgemuth, G., Scholz, M., Kind, T., Lee, D. Y., Lu, Y., Moon, S., & Nikolau, B. (2008). Quality control for plant metabolomics: Reporting MSI-compliant studies. *Plant Journal*, *53*(4), 691–704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03387.x>
- Fillinger, S., & Elad, Y. (2015). *Botrytis* - The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, 1–486. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Fillinger, S., & Elad, Y. (2016). Chemical Control and Resistance Management of *Botrytis* Diseases. In *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 189–216). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, *484*(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Floerl, S., Majcherczyk, A., Possienke, M., Feussner, K., Tappe, H., Gatz, C., Feussner, I., Kües, U., & Polle, A. (2012). *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, *7*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031435>
- Foster, J., Kim, H. U., Nakata, P. A., & Browse, J. (2012). A previously unknown Oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate catabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *24*(3), 1217–1229. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096032>
- Fournier, E., & Giraud, T. (2008). Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic

- fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 122–132. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01462.x>
- Francocci, F., Bastianelli, E., Lionetti, V., Ferrari, S., De Lorenzo, G., Bellincampi, D., & Cervone, F. (2013). Analysis of pectin mutants and natural accessions of *Arabidopsis* highlights the impact of de-methyl-esterified homogalacturonan on tissue saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 4–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-163>
- Fraudentali, I., Ghuge, S. A., Carucci, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., Rodrigues-Pousada, R. A., & Cona, A. (2020). Developmental, hormone- and stress-modulated expression profiles of four members of the *Arabidopsis* copper-amine oxidase gene family. *Plant Physiology and Biochemistry*, 147(October 2019), 141–160. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.037>
- Frías, M., González, C., & Brito, N. (2011a). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist*, 192(2), 483–495. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03802.x>
- Frías, M., González, C., & Brito, N. (2011b). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist*, 192(2), 483–495. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03802.x>
- Frías, M., González, M., González, C., & Brito, N. (2016). BcIEB1, a *Botrytis cinerea* secreted protein, elicits a defense response in plants. *Plant Science*, 250, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.009>
- Frías, M., González, M., González, C., & Brito, N. (2019). A 25-residue peptide from *Botrytis cinerea* xylanase bcxyn11a elicits plant defenses. *Frontiers in Plant Science*, 10(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00474>
- Frontini, M., Morel, J., Gravot, A., Lafarge, T., & Ballini, E. (2022). Increased Rice Susceptibility to Rice Blast Is Related to Post-Flowering Nitrogen Assimilation Efficiency.
- Fujimoto, T., Abe, H., Mizukubo, T., & Seo, S. (2021). Phytol, a Constituent of Chlorophyll, Induces Root-Knot Nematode Resistance in *Arabidopsis* via the Ethylene Signaling Pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(3), 279–285. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-20-0186-R>
- Gachon, C., & Saindrenan, P. (2004). Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(5), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.04.001>
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., De Lorenzo, G., & Ferrari, S. (2008). The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 148(3), 1695–1706. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127845>
- Gao, Q. M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gioti, A., Simon, A., Le Pêcheur, P., Giraud, C., Pradier, J. M., Viaud, M., & Levis, C. (2006). Expression Profiling of *Botrytis cinerea* Genes Identifies Three Patterns of Up-regulation in *Planta* and an FKBP12 Protein Affecting Pathogenicity. *Journal of Molecular Biology*, 358(2), 372–386. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.076>
- Gong, B. Q., Wang, F. Z., & Li, J. F. (2020). Hide-and-Seek: Chitin-Triggered Plant Immunity and Fungal Counterstrategies. *Trends in Plant Science*, 25(8), 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.006>
- González-Fernández, R., Aloria, K., Valero-Galván, J., Redondo, I., Arizmendi, J. M., & Jorrín-Novo, J. V. (2014). Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis*

- cinerea wild-type strains. *Journal of Proteomics*, 97, 195–221. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.022>
- Goodman, H. L., Kroon, J. T. M., Tomé, D. F. A., Hamilton, J. M. U., Alqarni, A. O., & Chivasa, S. (2022). Extracellular ATP targets Arabidopsis RIBONUCLEASE 1 to suppress mycotoxin stress-induced cell death. *New Phytologist*, 235(4), 1531–1542. <https://doi.org/10.1111/nph.18211>
- Gottig, N., Vranich, C. V., Sgro, G. G., Piazza, A., & Ottado, J. (2018). HrpE, the major component of the Xanthomonas type three protein secretion pilus, elicits plant immunity responses. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27869-1>
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea. *Current Biology*, 10(13), 751–757. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00560-1)
- Gramegna, G., Modesti, V., Savatin, D. V., Sicilia, F., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2016). GRP-3 and KAPP, encoding interactors of WAK1, negatively affect defense responses induced by oligogalacturonides and local response to wounding. *Journal of Experimental Botany*, 67(6), 1715–1729. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv563>
- Grigoriev, I. V., Cullen, D., Goodwin, S. B., Hibbett, D., Jeffries, T. W., Kubicek, C. P., Kuske, C., Magnuson, J. K., Martin, F., Spatafora, J. W., Tsang, A., & Baker, S. E. (2011). Fueling the future with fungal genomics. *Mycology*, 2(3), 192–209. <https://doi.org/10.1080/21501203.2011.584577>
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., & Shabalov, I. (2014). MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 699–704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>
- Günl, M., Neumetzler, L., Kraemer, F., de Souza, A., Schultink, A., Pena, M., York, W. S., & Pauly, M. (2011). AXY8 encodes an  $\alpha$ -fucosidase, underscoring the importance of apoplastic metabolism on the fine structure of Arabidopsis cell wall polysaccharides. *Plant Cell*, 23(11), 4025–4040. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089193>
- Gupta, K. J., Brotman, Y., Segu, S., Zeier, T., Zeier, J., Persijn, S. T., Cristescu, S. M., Harren, F. J. M., Bauwe, H., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., & Mur, L. A. J. (2013). The form of nitrogen nutrition affects resistance against Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 553–568. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers348>
- Gupta, Ravi, Lee, S. E., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Park, S., Wang, Y., & Kim, S. T. (2015). Understanding the plant-pathogen interactions in the context of proteomics-generated apoplastic proteins inventory. *Frontiers in Plant Science*, 6(June), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00352>
- Gupta, Rupali, Leibman-Markus, M., Anand, G., Rav David, D., Yermiyahu, U., Elad, Y., & Bar, M. (2022). Nutrient elements promote disease resistance in tomato by differentially activating immune pathways. *Phytopathology*®, 2360–2371. <https://doi.org/10.1094/phyto-02-22-0052-r>
- Hahn, M. G., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1981). Host-Pathogen Interactions XIX. THE ENDOGENOUS ELICITOR, A FRAGMENT OF A PLANT CELL WALL POLYSACCHARIDE THAT ELICITS PHYTOALEXIN ACCUMULATION IN SOYBEANS. *Plant Physiology*, 68, 1161–1169.
- Haile, Z. M., Malacarne, G., Pilati, S., Sonogo, P., Moretto, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., Engelen, K., Baraldi, E., & Moser, C. (2020). Dual Transcriptome and Metabolic Analysis of Vitis vinifera cv. Pinot Noir Berry and Botrytis cinerea During Quiescence and Egressed Infection. *Frontiers in Plant Science*, 10(January), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01704>

- Han, L. B., Li, Y. B., Wang, F. X., Wang, W. Y., Liu, J., Wu, J. H., Zhong, N. Q., Wu, S. J., Jiao, G. L., Wang, H. Y., & Xia, G. X. (2019). The Cotton Apoplastic Protein CRR1 stabilizes chitinase 28 to facilitate defense against the fungal pathogen *verticillium dahliae*. *Plant Cell*, *31*(2), 520–536. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00390>
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes and Development*, *23*(21), 2496–2506. <https://doi.org/10.1101/gad.1825209>
- Havé, M., Marmagne, A., Chardon, F., & Masclaux-Daubresse, C. (2017). Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of Experimental Botany*, *68*(10), 2513–2529. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw365>
- Have, A. ten, Espino, J. J., Dekkers, E., Van Sluyter, S. C., Brito, N., Kay, J., González, C., & van Kan, J. A. L. (2010). The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genetics and Biology*, *47*(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.10.008>
- He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C. Y., Wang, S., Miao, W., Ha, T., Wang, Y., & Jin, H. (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, *7*(3), 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- Heller, J., & Tudzynski, P. (2011). Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *Annual Review of Phytopathology*, *49*(1), 369–390. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095355>
- Higaki, T., Kurusu, T., Hasezawa, S., & Kuchitsu, K. (2011). Dynamic intracellular reorganization of cytoskeletons and the vacuole in defense responses and hypersensitive cell death in plants. *Journal of Plant Research*, *124*(3), 315–324. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0408-z>
- Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C., & Tsay, Y. F. (2009). CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell*, *138*(6), 1184–1194. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.004>
- Hoffland, E., Jeger, M. J., & Van Beusichem, M. L. (2000). Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant and Soil*, *218*(1–2), 239–247.
- Hou, S., Jamieson, P., & He, P. (2018). The cloak, dagger, and shield: proteases in plant–pathogen interactions. *Biochemical Journal*, *475*(15), 2491–2509. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170781>
- Howlader, P., Bose, S. K., Jia, X., Zhang, C., Wang, W., & Yin, H. (2020). Oligogalacturonides induce resistance in *Arabidopsis thaliana* by triggering salicylic acid and jasmonic acid pathways against Pst DC3000. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 4054–4064. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.026>
- Hu, Z. J., Sun, Z., Ma, Q., Yang, X., Feng, S., Shao, S., & Shi, K. (2020). N-decanoyl-homoserine lactone alleviates elevated CO<sub>2</sub>-induced defense suppression to *Botrytis cinerea* in tomato. *Scientia Horticulturae*, *268*(November 2019), 109353. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109353>
- Huang, H., Nguyen Thi Thu, T., He, X., Grivot, A., Bernillon, S., Ballini, E., & Morel, J. B. (2017). Increase of fungal pathogenicity and role of plant glutamine in nitrogen-induced susceptibility (NIS) to rice blast. *Frontiers in Plant Science*, *8*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00265>
- Huber, D. M., & Watson, R. D. (1974). Nitrogen Form and Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology*, *12*(1), 139–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.001035>
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Dominguez, H., & Robert-Baudouy, J. (1992). Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*, *174*(23), 7807–7818. <https://doi.org/10.1128/jb.174.23.7807-7818.1992>
- Huot, B., Castroverde, C. D. M., Velásquez, A. C., Hubbard, E., Pulman, J. A., Yao, J., Childs,

- K. L., Tsuda, K., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2017). Dual impact of elevated temperature on plant defence and bacterial virulence in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01674-2>
- Imaizumi, C., Tomatsu, H., Kitazawa, K., Yoshimi, Y., Shibano, S., Kikuchi, K., Yamaguchi, M., Kaneko, S., Tsumuraya, Y., & Kotake, T. (2017). Heterologous expression and characterization of an *Arabidopsis*  $\beta$ -l-arabinopyranosidase and  $\alpha$ -d-galactosidases acting on  $\beta$ -l-arabinopyranosyl residues. *Journal of Experimental Botany*, 68(16), 4651–4661. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx279>
- Ito, S. ichi, Ihara, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ikeda, T., Kajihara, H., Dissanayake, C., Abdel-Motaal, F. F., & El-Sayed, M. A. (2007).  $\alpha$ -Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters*, 581(17), 3217–3222. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.010>
- J. W. Groves and F. L. Drayton. (1939). The Perfect Stage of *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 31(4), 485–489. <https://doi.org/10.1080/00275514.1942.12020904>
- James, T. Y., Carolina, N., Letcher, P. M., Longcore, J. E., Mozley-standridge, S. E., Powell, M. J., & Griffith, G. W. (2006). A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6), 860–871.
- Jara, P., Gilbert, S., Delmas, P., Guillemot, J. C., Kaghad, M., Ferrara, P., & Loison, G. (1996). Cloning and characterization of the *eapB* and *eapC* genes of *Cryphonectria parasitica* encoding two new acid proteinases, and disruption of *eapC*. *Molecular and General Genetics*, 250(1), 97–105. <https://doi.org/10.1007/s004380050055>
- Jeblick, T., Leisen, T., Steidle, C. E., Albert, I., Müller, J., Kaiser, S., Mahler, F., Sommer, F., Keller, S., Hückelhoven, R., Hahn, M., & Scheuring, D. (2023). Botrytis hypersensitive response inducing protein 1 triggers noncanonical PTI to induce plant cell death. *Plant Physiology*, 191, 125–141. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac476>
- Jeffree, C. E. (2006). The Fine Structure of the Plant Cuticle. In *Biology of the Plant Cuticle* (pp. 11–125). <https://doi.org/10.1002/9780470988718.ch2>
- Jensen, K., Østergaard, P. R., Wilting, R., & Lassen, S. F. (2010). Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase. *BMC Biochemistry*, 11(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-11-47>
- Jin, H., Liu, B., Luo, L., Feng, D., Wang, P., Liu, J., Da, Q., He, Y., Qi, K., Wang, J., & Wang, H. Bin. (2014). HYPERSENSITIVE TO HIGH LIGHT1 interacts with LOW QUANTUM YIELD OF PHOTOSYSTEM III and functions in protection of Photosystem II from Photodamage in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26(3), 1213–1229. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122424>
- Johnson, N. D., Liu, B., & Bentley, B. L. (1987). The effects of nitrogen fixation, soil nitrate, and defoliation on the growth, alkaloids, and nitrogen levels of *Lupinus succulentus* (Fabaceae). *Oecologia*, 74(3), 425–431. <https://doi.org/10.1007/BF00378940>
- Joubert, A., Calmes, B., Berruyer, R., Pihet, M., Bouchara, J. P., Simoneau, P., & Guillemette, T. (2010). Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *BioTechniques*, 48(5), 399–404. <https://doi.org/10.2144/000113399>
- Kaewthai, N., Gendre, D., Eklöf, J. M., Ibatullin, F. M., Ezcurra, I., Bhalerao, R. P., & Brumer, H. (2013). Group III-A XTH genes of *Arabidopsis* encode predominant xyloglucan endohydrolases that are dispensable for normal growth. *Plant Physiology*, 161(1), 440–454. <https://doi.org/10.1104/pp.112.207308>
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 41–60.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>

- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. E., & Van Kan, J. A. L. (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant Journal*, *43*(2), 213–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02436.x>
- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L., & Van Kan, J. A. L. (2005). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05.10. *Molecular Plant Pathology*, *6*(6), 641–652. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00312.x>
- Kataoka, Y., Takada, K., Oyama, H., Tsunemi, M., James, M. N. G., & Oda, K. (2005). Catalytic residues and substrate specificity of scytalidoglutamic peptidase, the first member of the eqolisin in family (G1) of peptidases. *FEBS Letters*, *579*(14), 2991–2994. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.050>
- Katz, E., Knapp, A., Lensink, M., Keller, C. K., Stefani, J., Li, J.-J., Shane, E., Tuermer-Lee, K., Bloom, A. J., & Kliebenstein, D. J. (2022). Genetic variation underlying differential ammonium and nitrate responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 4696–4713. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac279>
- Kiddle, G., Pastori, G. M., Bernard, S., Pignocchi, C., Antoniw, J., Verrier, P. J., & Foyer, C. H. (2003). Effects of leaf ascorbate content on defense and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxidants and Redox Signaling*, *5*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1089/152308603321223513>
- Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L. F., Reher, R., Kang, K. Bin, Van Der Hooft, J. J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *Journal of Natural Products*, *84*(11), 2795–2807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399>
- Kim, J. H., Castroverde, C. D. M., Huang, S., Li, C., Hilleary, R., Seroka, A., Sohrabi, R., Medina-Yerena, D., Huot, B., Wang, J., Nomura, K., Marr, S. K., Wildermuth, M. C., Chen, T., MacMicking, J. D., & He, S. Y. (2022). Increasing the resilience of plant immunity to a warming climate. *Nature*, *607*(7918), 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04902-y>
- Kim, J. Y., Wu, J., Kwon, S. J., Oh, H., Lee, S. E., Kim, S. G., Wang, Y., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Kang, K. Y., Ahn, I. P., Kim, B. G., & Kim, S. T. (2014). Proteomics of rice and *Cochliobolus miyabeanus* fungal interaction: Insight into proteins at intracellular and extracellular spaces. *Proteomics*, *14*(20), 2307–2318. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400066>
- Kim, S. G., Wang, Y., Lee, K. H., Park, Z. Y., Park, J., Wu, J., Kwon, S. J., Lee, Y. H., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Kim, S. T., & Kang, K. Y. (2013). In-depth insight into in vivo apoplast secretome of rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Journal of Proteomics*, *78*, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.10.029>
- Kiselev, A., Clemente, H. S., Camborde, L., Dumas, B., & Gaulin, E. (2022). A Comprehensive Assessment of the Secretome Responsible for Host Adaptation of the Legume Root Pathogen *Aphanomyces euteiches*. *Journal of Fungi*, *8*(1). <https://doi.org/10.3390/jof8010088>
- Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A. S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., & Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *65*(3), 789–798. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru001>
- Krishnan, P., Ma, X., McDonald, B. A., & Brunner, P. C. (2018). Widespread signatures of selection for secreted peptidases in a fungal plant pathogen. *BMC Evolutionary Biology*, *18*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1123-3>



- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., Zotti, C., Moreau, E., Vedel, R., Pugin, A., & Boccara, M. (2006). Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytologist*, *170*(3), 537–550. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01682.x>
- Kusch, S., Larrouy, J., Ibrahim, H. M. M., Mounichetty, S., Gasset, N., Navaud, O., Mbengue, M., Zanchetta, C., Lopez-Roques, C., Donnadiou, C., Godiard, L., & Raffaele, S. (2022). Transcriptional response to host chemical cues underpins the expansion of host range in a fungal plant pathogen lineage. *ISME Journal*, *16*(1), 138–148. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01058-x>
- Kushwah, S., Banasiak, A., Nishikubo, N., Derba-Maceluch, M., Majda, M., Endo, S., Kumar, V., Gomez, L., Gorzsas, A., McQueen-Mason, S., Braam, J., Sundberg, B., & Mellerowicz, E. J. (2020). Arabidopsis XTH4 and XTH9 contribute to wood cell expansion and secondary wall formation1[Open]. *Plant Physiology*, *182*(4), 1946–1965. <https://doi.org/10.1104/PP.19.01529>
- Kuźniak, E., & Skłodowska, M. (2004). The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, *55*(397), 605–612. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh076>
- Lacrampe, N., Lopez-Lauri, F., Lugan, R., Colombié, S., Olivares, J., Nicot, P. C., & Lecompte, F. (2021). Regulation of sugar metabolism genes in the nitrogen-dependent susceptibility of tomato stems to *Botrytis cinerea*. *Annals of Botany*, *127*(1), 143–154. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa155>
- Landi, S., & Esposito, S. (2017). Nitrate uptake affects cell wall synthesis and modeling. *Frontiers in Plant Science*, *8*(August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01376>
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., & Zivy, M. (2017). X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *Journal of Proteome Research*, *16*(2), 494–503. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00632>
- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L. S., Schuster, M., Tanaka, S., Liang, L., Ludwig, N., & Kahmann, R. (2017). *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(7), 409–421. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.33>
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I. H., & Kunkel, B. N. (2006). The Arabidopsis thaliana JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(7), 789–800. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0789>
- Lecompte, F., Abro, M. A., & Nicot, P. C. (2010). Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology*, *59*(5), 891–899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02320.x>
- Lecompte, F., Abro, M. A., & Nicot, P. C. (2013). Can plant sugars mediate the effect of nitrogen fertilization on lettuce susceptibility to two necrotrophic pathogens: *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*? *Plant and Soil*, *369*(1–2), 387–401. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1577-9>
- Lecompte, François, Nicot, P. C., Ripoll, J., Abro, M. A., Raimbault, A. K., Lopez-Lauri, F., & Bertin, N. (2017). Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Annals of Botany*, *119*(5), 931–943. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw240>
- Léger, O., Garcia, F., Khafif, M., Carrere, S., Fournier, N. L., Duclos, A., Tournat, V., Badel, E., Didelon, M., Ru, A. Le, & Raffaele, S. (2022). Pathogen - derived mechanical cues potentiate the spatio - temporal implementation of plant defense. *BMC Biology*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01495-w>

- Leggett, H. C., Buckling, A., Long, G. H., & Boots, M. (2013). Generalism and the evolution of parasite virulence. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(10), 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.07.002>
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S. E., & Metraux, J. P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*, 112(1), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.027>
- Leisen, T., Bietz, F., Werner, J., Wegner, A., Schaffrath, U., Scheuring, D., Willmund, F., Mosbach, A., Scalliet, G., & Hahn, M. (2020). CRISPR/Cas with ribonucleoprotein complexes and transiently selected telomere vectors allows highly efficient marker-free and multiple genome editing in *Botrytis cinerea*. In *PLoS Pathogens* (Vol. 16, Issue 8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008326>
- Leisen, T., Werner, J., Pattar, P., Safari, N., Ymeri, E., Sommer, F., Schroda, M., Suárez, I., Collado, I. G., Scheuring, D., & Hahn, M. (2022). Multiple knockout mutants reveal a high redundancy of phytotoxic compounds contributing to necrotrophic pathogenesis of *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathogens*, 18(3), e1010367. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010367>
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D., & Delledonne, M. (2009). NO signals in the haze. Nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.012>
- Lemaître, T., Gaufichon, L., Boutet-Mercey, S., Christ, A., & Masclaux-Daubresse, C. (2008). Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassilewskija accession. *Plant and Cell Physiology*, 49(7), 1056–1065. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn081>
- Lemonnier, P., Gaillard, C., Veillet, F., Verbeke, J., Lemoine, R., Coutos-Thévenot, P., & La Camera, S. (2014). Expression of *Arabidopsis* sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology*, 85(4), 473–484. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0198-5>
- Lengyel, S., Rasclé, C., Poussereau, N., Bruel, C., Sella, L., Choquer, M., & Favaron, F. (2022). Snf1 Kinase Differentially Regulates *Botrytis cinerea* Pathogenicity according to the Plant Host. *Microorganisms*, 10(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020444>
- Leon-Reyes, A., Spoel, S. H., De Lange, E. S., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., Millenaar, F. F., Welschen, R. A. M., Ritsema, T., & Pieterse, C. M. J. (2009). Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling1[W][OA]. *Plant Physiology*, 149(4), 1797–1809. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133926>
- Leroch, M., Kleber, A., Silva, E., Coenen, T., Koppenhöfer, D., Shmaryahu, A., Valenzuela, P. D. T., & Hahn, M. (2013). Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination reveals upregulation of infection-related genes during the prepenetration stage. *Eukaryotic Cell*, 12(4), 614–626. <https://doi.org/10.1128/EC.00295-12>
- Less, H., Angelovici, R., Tzin, V., & Galili, G. (2011). Coordinated gene networks regulating *Arabidopsis* plant metabolism in response to various stresses and nutritional cues. *Plant Cell*, 23(4), 1264–1271. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082867>
- Li, B. C., Zhang, C., Chai, Q. X., Han, Y. Y., Wang, X. Y., Liu, M. X., Feng, H., & Xu, Z. Q. (2014). Plasmalemma localisation of DOUBLE HYBRID PROLINE-RICH PROTEIN 1 and its function in systemic acquired resistance of *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, 41(7), 768–779. <https://doi.org/10.1071/FP13314>
- Li, B., Wang, W., Zong, Y., Qin, G., & Tian, S. (2012). Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*, 11(8), 4249–4260. <https://doi.org/10.1021/pr300365f>

- Li, J., Brader, G., & 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*(2), 319–331. <https://doi.org/10.1105/tpc.016980>
- Li, Z., Liu, H., Ding, Z., Yan, J., Yu, H., Pan, R., Hu, J., Guan, Y., & Hua, J. (2020). Low temperature enhances plant immunity via salicylic acid pathway genes that are repressed by ethylene. *Plant Physiology*, *182*(1), 626–639. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01130>
- Liebminger, E., Veit, C., Pabst, M., Batoux, M., Zipfel, C., Altmann, F., Mach, L., & Strasser, R. (2011).  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 are responsible for the formation of paucimannosidic N-glycans in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(12), 10793–10802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178020>
- Lionetti, V., Fabri, E., De Caroli, M., Hansen, A. R., Willats, W. G. T., Piro, G., & Bellincampi, D. (2017). Three pectin methylesterase inhibitors protect cell wall integrity for *Arabidopsis* immunity to *Botrytis*. *Plant Physiology*, *173*(3), 1844–1863. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01185>
- Liu, G., Ji, Y., Bhuiyan, N. H., Pilot, G., Selvaraj, G., Zou, J., & Wei, Y. (2010). Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *22*(11), 3845–3863. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079392>
- Liu, H., Wang, X., Zhang, H., Yang, Y., Ge, X., & Song, F. (2008). A rice serine carboxypeptidase-like gene OsBISCPL1 is involved in regulation of defense responses against biotic and oxidative stress. *Gene*, *420*(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.05.006>
- Liu, N., Ren, W., Li, F., Chen, C., & Ma, Z. (2019). Involvement of the cysteine protease BcAtg4 in development and virulence of *Botrytis cinerea*. *Current Genetics*, *65*(1), 293–300. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0882-0>
- Liu, X., Xie, J., Fu, Y., Jiang, D., Chen, T., & Cheng, J. (2020). The Subtilisin-Like Protease Bcser2 Affects the Sclerotial Formation, Conidiation and Virulence of *Botrytis cinerea*. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020603>
- Liu, Yanpei, Mauve, C., Lamothe-Sibold, M., Guérard, F., Glab, N., Hodges, M., & Jossier, M. (2019). Photorespiratory serine hydroxymethyltransferase 1 activity impacts abiotic stress tolerance and stomatal closure. *Plant Cell and Environment*, *42*(9), 2567–2583. <https://doi.org/10.1111/pce.13595>
- Liu, Ying, & Von Wirén, N. (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, *68*(10), 2581–2592. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx086>
- Llorens, E., Scalschi, L., González-Hernández, A. I., Camañes, G., García-Agustín, P., & Vicedo, B. (2021). 1-Methyltryptophan Treatment Increases Defense-Related Proteins in the Apoplast of Tomato Plants. *Journal of Proteome Research*, *20*(1), 433–443. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00498>
- Lloyd, A. J., William Allwood, J., Winder, C. L., Dunn, W. B., Heald, J. K., Cristescu, S. M., Sivakumaran, A., Harren, F. J. M., Mulema, J., Denby, K., Goodacre, R., Smith, A. R., & Mur, L. A. J. (2011). Metabolomic approaches reveal that cell wall modifications play a major role in ethylene-mediated resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, *67*(5), 852–868. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04639.x>
- Locato, V., & De Gara, L. (2018). Programmed cell death in plants: An overview. *Methods in Molecular Biology*, *1743*, 1–8. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7668-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7668-3_1)
- Long, D. H., Lee, F. N., & TeBeest, D. O. (2000). Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. *Plant Disease*, *84*(4), 403–409. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.403>
- López-Berges, M. S., Rispaïl, N., Prados-Rosales, R. C., & di Pietro, A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein

- kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell*, 22(7), 2459–2475. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075937>
- López-Cruz, J., Óscar, C. S., Emma, F. C., Pilar, G. A., & Carmen, G. B. (2017). Absence of Cu–Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Molecular Plant Pathology*, 18(1), 16–31. <https://doi.org/10.1111/mpp.12370>
- López-Pérez, M., Ballester, A. R., & González-Candelas, L. (2015). Identification and functional analysis of *Penicillium digitatum* genes putatively involved in virulence towards citrus fruit. *Molecular Plant Pathology*, 16(3), 262–275. <https://doi.org/10.1111/mpp.12179>
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15(1), 165–178. <https://doi.org/10.1105/tpc.007468>
- Lorrai, R., Francocci, F., Gully, K., Martens, H. J., De Lorenzo, G., Nawrath, C., & Ferrari, S. (2021). Impaired Cuticle Functionality and Robust Resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* Plants With Altered Homogalacturonan Integrity Are Dependent on the Class III Peroxidase AtPRX71. *Frontiers in Plant Science*, 12(August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.696955>
- Malabarba, J., Meents, A. K., Reichelt, M., Scholz, S. S., Peiter, E., Rachowka, J., Konopka-Postupolska, D., Wilkins, K. A., Davies, J. M., Oelmüller, R., & Mithöfer, A. (2021). ANNEXIN1 mediates calcium-dependent systemic defense in *Arabidopsis* plants upon herbivory and wounding. *New Phytologist*, 231(1), 243–254. <https://doi.org/10.1111/nph.17277>
- Mann, K. S., Chisholm, J., & Hélène, S. (2019). *Strawberry Mottle Virus* ( Family *Secoviridae* , Order *Picornavirales* ) Encodes a Novel Glutamic Protease To Process. 93(5), 1–21.
- Marino, D., Ariz, I., Lasa, B., Santamaría, E., Fernández-Irigoyen, J., González-Murua, C., & Aparicio Tejo, P. M. (2016). Quantitative proteomics reveals the importance of nitrogen source to control glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *Journal of Experimental Botany*, 67(11), 3313–3323. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw147>
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., & Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105(7), 1141–1157. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq028>
- Mashiguchi, K., Asami, T., & Suzuki, Y. (2009). Genome-wide identification, structure and expression studies, and mutant collection of 22 early nodulin-like protein genes in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(11), 2452–2459. <https://doi.org/10.1271/bbb.90407>
- Mercier, A., Simon, A., Lapalu, N., Giraud, T., Bardin, M., Walker, A. S., Viaud, M., & Gladieux, P. (2021). Population Genomics Reveals Molecular Determinants of Specialization to Tomato in the Polyphagous Fungal Pathogen *Botrytis cinerea* in France. *Phytopathology*, 111(12), 2355–2366. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0302-FI>
- Mesarich, C. H., Ökmen, B., Rovenich, H., Griffiths, S. A., Wang, C., Jashni, M. K., Mihajlovski, A., Collemare, J., Hunziker, L., Deng, C. H., Van Der Burgt, A., Beenen, H. G., Templeton, M. D., Bradshaw, R. E., & De Wit, P. J. G. M. (2018). Specific hypersensitive response-associated recognition of new apoplastic effectors from *Cladosporium fulvum* in wild tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(1), 145–162. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-17-0114-FI>
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240–16265.

- <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
- Misas-Villamil, J. C., & van der Hoorn, R. AL. (2008). Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.007>
- Mishler-Elmore, J. W., Zhou, Y., Sukul, A., Oblak, M., Tan, L., Faik, A., & Held, M. A. (2021). Extensins: Self-Assembly, Crosslinking, and the Role of Peroxidases. *Frontiers in Plant Science*, 12(May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.664738>
- Movahedi, S., & Heale, J. B. (1990). The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36(4), 303–324. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(90\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0885-5765(90)90061-2)
- Muckenschnabel, I., Goodman, B. A., Williamson, B., Lyon, G. D., & Deighton, N. (2002). Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: Changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *Journal of Experimental Botany*, 53(367), 207–214. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.367.207>
- Mur, L. A. J., Simpson, C., Kumari, A., Gupta, A. K., & Gupta, K. J. (2017). Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of Botany*, 119(5), 703–709. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw179>
- Murao, S., Qda, Kō., & Matsushita, Y. (1972). New acid proteases from *scytalidium lignicolum* M-133. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(9), 1647–1650. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860454>
- Myers, O. D., Sumner, S. J., Li, S., Barnes, S., & Du, X. (2017). One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Analytical Chemistry*, 89(17), 8696–8703. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00947>
- Nafisi, M., Stranne, M., Zhang, L., Van Kan, J. A. L., & Sakuragi, Y. (2014). The endo-arabinanase BcAra1 is a novel host-specific virulence factor of the necrotic fungal phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(8), 781–792. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-14-0036-R>
- Naoumkina, M., Farag, M. A., Sumner, L. W., Tang, Y., Liu, C. J., & Dixon, R. A. (2007). Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 17909–17915. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708697104>
- Nawrath, C. (1999). Salicylic Acid Induction–Deficient Mutants of *Arabidopsis* Express. *Society*, 11(August), 1393–1404.
- Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R. B., Geldner, N., Reina-Pinto, J. J., & Kunst, L. (2013). Apoplastic Diffusion Barriers in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, 11, e0167. <https://doi.org/10.1199/tab.0167>
- Nicot, P., Bardin, M., Debruyne, F., Duffaud, M., Lecompte, F., Neu, L., & Pascal, M. (2013). Effect of nitrogen fertilisation of strawberry plants on the efficacy of defence-stimulating biocontrol products against *Botrytis cinerea*. *IOBC-WPRS Bulletin*, 88(January), 39–42.
- Niture, S. K. (2008). Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*, 63(1), 1–19. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0018-y>
- Niu, Y., Figueroa, P., & Browse, J. (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 2143–2154. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq408>
- Noctor, G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment*, 29(3), 409–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01476.x>

- Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., & Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology*, 4(SEP), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00248>
- O'Donoghue, A. J., Mahon, C. S., Goetz, D. H., O'Malley, J. M., Gallagher, D. M., Zhou, M., Murray, P. G., Craik, C. S., & Tuohy, M. G. (2008). Inhibition of a secreted glutamic peptidase prevents growth of the fungus *Talaromyces emersonii*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29186–29195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802366200>
- O'Leary, B. M., Neale, H. C., Geilfus, C. M., Jackson, R. W., Arnold, D. L., & Preston, G. M. (2016). Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* Pv. *phaseolicola*. *Plant Cell and Environment*, 39(10), 2172–2184. <https://doi.org/10.1111/pce.12770>
- O'Leary, B. M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H. N., & Preston, G. M. (2014). The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example. *Journal of Visualized Experiments*, 94, 1–8. <https://doi.org/10.3791/52113>
- Oh, Y., Robertson, S. L., Parker, J., Muddiman, D. C., & Dean, R. A. (2017). Comparative proteomic analysis between nitrogen supplemented and starved conditions in *Magnaporthe oryzae*. *Proteome Science*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0128-y>
- Ohnuma, T., Numata, T., Osawa, T., Mizuhara, M., Lampela, O., Juffer, A. H., Skriver, K., & Fukamizo, T. (2011). A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: Gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*, 234(1), 123–137. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1390-3>
- Oliva, M., Hatan, E., Kumar, V., Galsurker, O., Nisim-Levi, A., Ovadia, R., Galili, G., Lewinsohn, E., Elad, Y., Alkan, N., & Oren-Shamir, M. (2020). Increased phenylalanine levels in plant leaves reduces susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Plant Science*, 290(September 2019), 110289. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110289>
- Oliver Fiehn. (2017). Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling. In *Curr Protoc Mol Biol.* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>.Metabolomics
- Olivieri, F., Eugenia Zanetti, M., Oliva, C. R., Covarrubias, A. A., & Casalongué, C. A. (2002). Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 108(1), 63–72. <https://doi.org/10.1023/A:1013920929965>
- Onaga, G., Wydra, K. D., Koopmann, B., Séré, Y., & Von Tiedemann, A. (2017). Elevated temperature increases in planta expression levels of virulence related genes in *Magnaporthe oryzae* and compromises resistance in *Oryza sativa* cv. Nipponbare. *Functional Plant Biology*, 44(3), 358–371. <https://doi.org/10.1071/FP16151>
- Pacheco, J. M., Ranocha, P., Kasulin, L., Fusari, C. M., Servi, L., Aptekmann, A. A., Gabarain, V. B., Peralta, J. M., Borassi, C., Marzol, E., Rodríguez-García, D. R., del Carmen Rondón Guerrero, Y., Sardoy, M. C., Ferrero, L., Botto, J. F., Meneses, C., Ariel, F., Nadra, A. D., Petrillo, E., ... Estevez, J. M. (2022). Apoplastic class III peroxidases PRX62 and PRX69 promote *Arabidopsis* root hair growth at low temperature. *Nature Communications*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28833-4>
- Paerl, H. W. (2009). Controlling eutrophication along the freshwater-Marine continuum: Dual nutrient (N and P) reductions are essential. *Estuaries and Coasts*, 32(4), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9158-8>
- Pandey, A. K., Jain, P., Podila, G. K., Tudzynski, B., & Davis, M. R. (2009). Cold induced *Botrytis cinerea* enolase (BcEnol-1) functions as a transcriptional regulator and is controlled by cAMP. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(2), 135–146.

- <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0397-3>
- Park, B. S., Yao, T., Seo, J. S., Wong, E. C. C., Mitsuda, N., Huang, C. H., & Chua, N. H. (2018). Arabidopsis NITROGEN LIMITATION ADAPTATION regulates ORE1 homeostasis during senescence induced by nitrogen deficiency. *Nature Plants*, *4*(11), 898–903. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0269-8>
- Paterlini, A., Sechet, J., Immel, F., Grison, M. S., Pilard, S., Pelloux, J., Mouille, G., Bayer, E. M., & Voxeur, A. (2022). Enzymatic fingerprinting reveals specific xyloglucan and pectin signatures in the cell wall purified with primary plasmodesmata. *Frontiers in Plant Science*, *13*(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1020506>
- Patterson, K., Cakmak, T., Cooper, A., Lager, I., Rasmusson, A. G., & Escobar, M. A. (2010). Distinct Signaling Pathways and Transcriptome Response Signatures Differentiate Ammonium- and Nitrate-supplied Plants. *Plant Cell and Environment*, *33*(9), 1486–1501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02158.x>
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniwi, J., Alvarez, E., & Foyer, C. H. (2005). Ascorbic Acid Deficiency Activates Cell Death and Disease Resistance Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *139*(November), 1291–1303. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067686.et>
- Petutschnig, E. K., Stolze, M., Lipka, U., Kopischke, M., Horlacher, J., Valerius, O., Rozhon, W., Gust, A. A., Kemmerling, B., Poppenberger, B., Braus, G. H., Nürnberger, T., & Lipka, V. (2014). A novel Arabidopsis CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) mutant with enhanced pathogen-induced cell death and altered receptor processing. *New Phytologist*, *204*(4), 955–967. <https://doi.org/10.1111/nph.12920>
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., & Bednarek, P. (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, *206*(3), 948–964. <https://doi.org/10.1111/nph.13325>
- Picard, K. T., Letcher, P. M., & Powell, M. J. (2009). Rhizidium phycophilum, a new species in Chytridiales. *Mycologia*, *101*(5), 696–706. <https://doi.org/10.3852/08-194>
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*(1), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pirhonen, M., Saari-Lahti, H., Karlsson, M.-B., & Tapio Palvo, E. (1991). Identification of Pathogenicity Determinants of Erwinia carotovora subsp. carotovora by Transposon Mutagenesis. *Molecular Plant Microbes Interaction*, *4*(3), 276–283.
- Planchet, E., Gupta, K. J., Sonoda, M., & Kaiser, W. M. (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: Rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Journal*, *41*(5), 732–743. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02335.x>
- Pontiggia, D., Benedetti, M., Costantini, S., De Lorenzo, G., & Cervone, F. (2020). Dampening the DAMPs: How Plants Maintain the Homeostasis of Cell Wall Molecular Patterns and Avoid Hyper-Immunity. *Frontiers in Plant Science*, *11*(December). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.613259>
- Porquier, A., Tisserant, C., Salinas, F., Glassl, C., Wange, L., Enard, W., Hauser, A., Hahn, M., & Weiberg, A. (2021). Retrotransposons as pathogenicity factors of the plant pathogenic fungus Botrytis cinerea. *Genome Biology*, *22*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02446-4>
- Poussereau, N., Creton, S., Billon-Grand, G., Rasclé, C., & Fevre, M. (2001). Regulation of acp1, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of Sclerotinia sclerotiorum. *Microbiology*, *147*(3), 717–726. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-3-717>

- Pyo Lee, K., Liu, K., Yu Kim, E., Medina-Puche, L., Dong, H., Duan, J., Li, M., Dogra, V., Li, Y., Lv, R., Li, Z., Lozano-Duran, R., & Kim, C. (2020). PLANT NATRIURETIC PEPTIDE A and Its Putative Receptor PNP-R2 Antagonize Salicylic Acid – Mediated Signaling and Cell Death. *The Plant Cell*, 32(July), 2237–2250. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00018>
- Qin, S., Veloso, J., Baak, M., Boogmans, B., Bosman, T., Puccetti, G., Shi-Kunne, X., Smit, S., Grant-Downton, R., Leisen, T., Hahn, M., & van Kan, J. A. L. (2022). Molecular characterization reveals no functional evidence for naturally occurring cross-kingdom RNA interference in the early stages of Botrytis cinerea–tomato interaction. *Molecular Plant Pathology*, August 2022, 3–15. <https://doi.org/10.1111/mpp.13269>
- Qin, S., Veloso, J., Baak, M., Boogmans, B., Bosman, T., Shi-, G. P. X., Sandra, K., Robert, S., Leisen, T., Hahn, M., & Kan, J. A. L. Van. (2022). *Molecular characterization reveals no functional evidence for naturally occurring cross- - kingdom RNA interference in the early stages of Botrytis cinerea – - tomato interaction.* June, 1–13. <https://doi.org/10.1111/mpp.13269>
- Quidde, T., Osbourn, A. E., & Tudzynski, P. (1998). Detoxification of  $\alpha$ -tomatine by Botrytis cinerea. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52(3), 151–165. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0142>
- Radojčić, A., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Salicylic acid: A double-edged sword for programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9(August), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01133>
- Raiola, A., Sella, L., Castiglioni, C., Balmas, V., & Favaron, F. (2008). A single amino acid substitution in highly similar endo-PGs from Fusarium verticillioides and related Fusarium species affects PGIP inhibition. *Fungal Genetics and Biology*, 45(5), 776–789. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.11.003>
- Raiola, Alessandro, Lionetti, V., Elmaghraby, I., Immerzeel, P., Mellerowicz, E. J., Salvi, G., Cervone, F., & Bellincampi, D. (2011). Pectin methylesterase is induced in Arabidopsis upon infection and is necessary for a successful colonization by necrotrophic pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(4), 432–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0157>
- Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., & Somerville, S. (2005). Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen Erysiphe cichoracearum. *Plant Physiology*, 138(2), 1027–1036. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060947>
- Rampitsch, C., Huang, M., Djuric-Cignaovic, S., Wang, X., & Fernando, U. (2019). Temporal Quantitative Changes in the Resistant and Susceptible Wheat Leaf Apoplastic Proteome During Infection by Wheat Leaf Rust (Puccinia triticina). *Frontiers in Plant Science*, 10(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01291>
- Rasclé, C., Dieryckx, C., Dupuy, J. W., Muszkieta, L., Souibgui, E., Droux, M., Bruel, C., Girard, V., & Poussereau, N. (2018). The pH regulator PacC: a host-dependent virulence factor in Botrytis cinerea. *Environmental Microbiology Reports*, 10(5), 555–568. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12663>
- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A. M., Nielsen, H. B., & Mundy, J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161(4), 1783–1794. <https://doi.org/10.1104/pp.112.210773>
- Rasul, S., Dubreuil-Maurizi, C., Lamotte, O., Koen, E., Poinssot, B., Alcaraz, G., Wendehenne, D., & Jeandroz, S. (2012). Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment*, 35(8), 1483–1499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02505.x>



- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Recorbet, G., Calabrese, S., Balliau, T., Zivy, M., Wipf, D., Boller, T., & Courty, P. E. (2021). Proteome adaptations under contrasting soil phosphate regimes of *Rhizophagus irregularis* engaged in a common mycorrhizal network. *Fungal Genetics and Biology*, 147(January), 103517. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103517>
- Ren, H., Wu, X., Lyu, Y., Zhou, H., Xie, X., Zhang, X., & Yang, H. (2017). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in *Botrytis cinerea*. *Journal of Microbiological Methods*, 142(19), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.09.006>
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., & Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, 5(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00017>
- Rolland, S., Bruel, C., Rasclé, C., Girard, V., Billon-Grand, G., & Poussereau, N. (2009). pH controls both transcription and posttranslational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Microbiology*, 155(6), 2097–2105. <https://doi.org/10.1099/mic.0.025999-0>
- Rolland, S. G., & Bruel, C. A. (2008). Sulphur and nitrogen regulation of the protease-encoding ACP1 gene in the fungus *Botrytis cinerea*: Correlation with a phospholipase D activity. *Microbiology*, 154(5), 1464–1473. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012005-0>
- Rooney, H. C. E., Van der Klooster, van der Hoorn, R. A. L., Joosten, M. H. A. J., Jones, J. D. G., & de Wit, P. J. G. M. (2005). Cladosporium Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science*, 308(5729), 1783–1786. <http://science.sciencemag.org/content/308/5729/1783.abstract>
- Rosa-Téllez, S., Anoman, A. D., Flores-Tornero, M., Toujani, W., Alseek, S., Fernie, A. R., Nebauer, S. G., Muñoz-Bertomeu, J., Segura, J., & Ros, R. (2018). Phosphoglycerate kinases are co-regulated to adjust metabolism and to optimize growth. *Plant Physiology*, 176(2), 1182–1198. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01227>
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., & Raffaele, S. (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti: Placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 427–432. <https://doi.org/10.1111/mpp.12138>
- Rubinovich, L., & Weiss, D. (2010). *The Arabidopsis cysteine-rich protein GASA4 promotes GA responses and exhibits redox activity in bacteria and in planta*. 1018–1027. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04390.x>
- Rupp, S., Weber, R. W. S., Rieger, D., Detzel, P., & Hahn, M. (2017). Spread of botrytis cinerea strains with multiple fungicide resistance in german horticulture. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075>
- Salguero-Linares, J., & Coll, N. S. (2019). Plant proteases in the control of the hypersensitive response. *Journal of Experimental Botany*, 70(7), 2087–2095. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz030>
- Sánchez-López, Á. M., Bahaji, A., De Diego, N., Baslam, M., Li, J., Muñoz, F. J., Almagro, G., García-Gómez, P., Amezttoy, K., Ricarte-Bermejo, A., Novák, O., Humplík, J. F., Spíchal, L., Doležal, K., Ciordia, S., Mena, M. C., Navajas, R., Baroja-Fernández, E., & Pozueta-Romero, J. (2016). Arabidopsis responds to *Alternaria alternata* volatiles by triggering plastid phosphoglucose isomerase-independent mechanisms. *Plant Physiology*, 172(3), 1989–2001. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00945>
- Schouten, A., Tenberge, K. B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B., &

- Van Kan, J. A. L. (2002). Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 3(4), 227–238. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00114.x>
- Schouten, A., Van Baarlen, P., & Van Kan, J. A. L. (2008). Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytologist*, 177(2), 493–505. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02274.x>
- Schumacher, J. (2012). Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genetics and Biology*, 49(6), 483–497. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.03.005>
- Schumacher, J., Gautier, A., Morgant, G., Studt, L., Ducrot, P. H., Le Pêcheur, P., Azeddine, S., Fillinger, S., Leroux, P., Tudzynski, B., & Viaud, M. (2013). A Functional Bikaverin Biosynthesis Gene Cluster in Rare Strains of *Botrytis cinerea* Is Positively Controlled by VELVET. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053729>
- Scortica, A., Giovannoni, M., Scafati, V., Angelucci, F., Cervone, F., De Lorenzo, G., Benedetti, M., & Mattei, B. (2022). Berberine Bridge Enzyme-like Oligosaccharide Oxidases Act as Enzymatic Transducers Between Microbial Glycoside Hydrolases and Plant Peroxidases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 35(10), 881. <https://doi.org/10.1094/mpmi-05-22-0113-ta>
- Sénéchal, F., Wattier, C., Rustérucci, C., & Pelloux, J. (2014). Homogalacturonan-modifying enzymes: Structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany*, 65(18), 5125–5160. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru272>
- Serrano, I., Buscaill, P., Audran, C., Jauneau, A., & Rivas, S. (2016). A non canonical subtilase attenuates the transcriptional activation of defence responses in *Arabidopsis thaliana*. 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.19755>
- Shah, P., Atwood, J. A., Orlando, R., Mubarek, H. El, Podila, G. K., & Davis, M. R. (2009). Comparative proteomic analysis of botrytis cinerea secretome. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1123–1130. <https://doi.org/10.1021/pr8003002>
- Shao, D., Smith, D. L., Kabbage, M., & Roth, M. G. (2021). Effectors of Plant Necrotrophic Fungi. *Frontiers in Plant Science*, 12(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.687713>
- Shenton, M. R., Berberich, T., Kamo, M., Yamashita, T., Taira, H., & Terauchi, R. (2012). Use of intercellular washing fluid to investigate the secreted proteome of the rice-Magnaporthe interaction. *Journal of Plant Research*, 125(2), 311–316. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0473-y>
- Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y. F., Talbot, N. J., & Sharon, A. (2011). Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus botrytis cinerea from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathogens*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002185>
- Siddique, S., Wiczorek, K., Szakasits, D., Kreil, D. P., & Bohlmann, H. (2011). Plant Physiology and Biochemistry The promoter of a plant defensin gene directs specific expression in nematode-induced syncytia in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology et Biochemistry*, 49(10), 1100–1107. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.07.005>
- Smirnova, E., Marquis, V., Poirier, L., Aubert, Y., Zumsteg, J., Ménard, R., Miesch, L., & Heitz, T. (2017). Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against *Botrytis cinerea* Infection. *Molecular Plant*, 10(9), 1159–1173. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.010>
- Soltis, N. E., Atwell, S., Shi, G., Fordyce, R., Gwinner, R., Gao, D., Shafi, A., & Kliebenstein, D. J. (2019). Interactions of tomato and *Botrytis cinerea* genetic diversity: Parsing the contributions of host differentiation, domestication, and pathogen variation. *Plant Cell*,

- 31(2), 502–519. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00857>
- Soulie, M. C., Koka, S. M., Floch, K., Vancostenoble, B., Barbe, D., Daviere, A., Soubigou-Taconnat, L., Brunaud, V., Poussereau, N., Loisel, E., Devallee, A., Expert, D., & Fagard, M. (2020). Plant nitrogen supply affects the *Botrytis cinerea* infection process and modulates known and novel virulence factors. *Molecular Plant Pathology*, 21(11), 1436–1450. <https://doi.org/10.1111/mpp.12984>
- Spanu, P. D. (2012). The genomics of obligate (and nonobligate) biotrop. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 91–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173024>
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
- Sriranganadane, D., Reichard, U., Salamin, K., Fratti, M., Jousson, O., Waridel, P., Quadroni, M., Neuhaus, J. M., & Monod, M. (2011). Secreted glutamic protease rescues aspartic protease Pep deficiency in *Aspergillus fumigatus* during growth in acidic protein medium. *Microbiology*, 157(5), 1541–1550. <https://doi.org/10.1099/mic.0.048603-0>
- Srivastava, R., Liu, J., & Howell, S. H. (2008). *Proteolytic processing of a precursor protein for a growth-promoting peptide by a subtilisin serine protease in Arabidopsis. I*, 219–227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03598.x>
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S. E., Fetzer, I., Bennett, E. M., Biggs, R., Carpenter, S. R., De Vries, W., De Wit, C. A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G. M., Persson, L. M., Ramanathan, V., Reyers, B., & Sörlin, S. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*, 347(6223). <https://doi.org/10.1126/science.1259855>
- Stocchi, N., Revuelta, M. V., Castronuovo, P. A. L., Vera, D. M. A., & ten Have, A. (2018). Molecular dynamics and structure function analysis show that substrate binding and specificity are major forces in the functional diversification of Eqlisins. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2348-2>
- Stotz, H. U., Sawada, Y., Shimada, Y., Hirai, M. Y., Sasaki, E., Krischke, M., Brown, P. D., Saito, K., & Kamiya, Y. (2011). Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Journal*, 67(1), 81–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04578.x>
- Stout, M. J., Brovont, R. A., & Duffey, S. S. (1998). Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology*, 24(6), 945–963. <https://doi.org/10.1023/A:1022350100718>
- Sun, Y., Wang, M., Mur, L. A. J., Shen, Q., & Guo, S. (2020). Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21020572>
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Takagi, H., Ishiga, Y., Watanabe, S., Konishi, T., Egusa, M., Akiyoshi, N., Matsuura, T., Mori, I. C., Hirayama, T., Kaminaka, H., Shimada, H., & Sakamoto, A. (2016). Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2519–2532. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw071>
- Takahashi, K. (2013). Aspergilloglutamic Peptidase. *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2000*, 307–310. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382219-2.00074-0>
- Tan, Y., Zeng, N. K., & Xu, B. (2022). Chemical profiles and health-promoting effects of porcini mushroom (*Boletus edulis*): A narrative review. *Food Chemistry*, 390(April), 133199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133199>

- Tavernier, V., Cadiou, S., Pageau, K., Laugé, R., Reisdorf-Cren, M., Langin, T., & Masclaux-Daubresse, C. (2007). The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in Phaseolus leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany*, *58*(12), 3351–3360. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm182>
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., & Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, *90*(1), 135–159. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- Temme, N., & Tudzynski, P. (2009). Does botrytis cinerea ignore H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress during infection? characterization of botrytis activator protein 1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*(8), 987–998. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0987>
- Ten Have, A., Breuil, W. O., Wubben, J. P., Visser, J., & Van Kan, J. A. L. (2001). Botrytis cinerea endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genetics and Biology*, *33*(2), 97–105. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1269>
- Ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., & Van Kan, J. A. L. (1998). The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required to full virulence of Botrytis cinerea. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *11*(10), 1009–1016. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1998.11.10.1009>
- Thomas, E. L., & van der Hoorn, R. A. L. (2018). Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms19020639>
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(25), 15107–15111. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15107>
- Trębicki, P., Nancarrow, N., Bosque-Pérez, N. A., Rodoni, B., Aftab, M., Freeman, A., Yen, A., & Fitzgerald, G. J. (2017). Virus incidence in wheat increases under elevated CO<sub>2</sub>: A 4-year study of yellow dwarf viruses from a free air carbon dioxide facility. *Virus Research*, *241*(January), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.06.027>
- Treu, R., & Falandysz, J. (2017). Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes—a review. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *52*(3), 148–155. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1261536>
- Troufflard, S., Mullen, W., Larson, T. R., Graham, I. A., Crozier, A., Amtmann, A., & Armengaud, P. (2010). Potassium deficiency induces the biosynthesis of oxylipins and glucosinolates in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-172>
- Tudzynski, B., Liu, S., & Kelly, J. M. (2000). Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: Isolation and characterization of the Gibberella fujikuroi and Botrytis cinerea creA genes. *FEMS Microbiology Letters*, *184*(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00012-4)
- Vaghela, B., Vashi, R., Rajput, K., & Joshi, R. (2022). Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme and Microbial Technology*, *159*(September 2021), 110055. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110055>
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., & Boccara, M. (2003). Disruption of Botrytis cinerea pectin methylesterase gene Bcpe1 reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *16*(4), 360–367. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.4.360>
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., & Zivy, M. (2011). MassChroQ: A versatile tool for mass

- spectrometry quantification. *Proteomics*, 11(17), 3572–3577. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100120>
- Van Kan, J. A. L., Van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., Dees, D. C. T., & Van Der Vlugt-Bergmans, C. J. B. (1997). Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(1), 30–38. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.1.30>
- Van Sluyter, S. C., Warnock, N. I., Schmidt, S., Anderson, P., Van Kan, J. A. L., Bacic, A., & Waters, E. J. (2013). Aspartic acid protease from *Botrytis cinerea* removes haze-forming proteins during white winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9705–9711. <https://doi.org/10.1021/jf402762k>
- Vega, A., Canessa, P., Hoppe, G., Retamal, I., Moyano, T. C., Canales, J., Gutiérrez, R. A., & Rubilar, J. (2015). Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science*, 6(NOVEMBER), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00911>
- Veloso, J., & van Kan, J. A. L. (2018). Many Shades of Grey in *Botrytis*–Host Plant Interactions. *Trends in Plant Science*, 23(7), 613–622. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.016>
- Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Nottéghem, J. L., & Morel, J. B. (2010). Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-206>
- Verly, C., Djoman, A. C. R., Rigault, M., Giraud, F., Rajjou, L., Saint-Macary, M. E., & Dellagi, A. (2020). Plant Defense Stimulator Mediated Defense Activation Is Affected by Nitrate Fertilization and Developmental Stage in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 11(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00583>
- Viefhues, A., Heller, J., Temme, N., & Tudzynski, P. (2014). Redox systems in *Botrytis cinerea*: Impact on development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(8), 858–874. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-14-0012-R>
- Vierheilig, H., Schweiger, P., & Brundrett, M. (2005). An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum*, 125(4), 393–404. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00564.x>
- Vincent, D., Rafiqi, M., & Job, D. (2020). The Multiple Facets of Plant–Fungal Interactions Revealed Through Plant and Fungal Secretomics. *Frontiers in Plant Science*, 10(January). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01626>
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Voxeur, A., Habrylo, O., Guénin, S., Miart, F., Soulié, M. C., Rihouey, C., Pau-Roblot, C., Domon, J. M., Gutierrez, L., Pelloux, J., Mouille, G., Fagard, M., Höfte, H., & Vernhettes, S. (2019). Oligogalacturonide production upon *Arabidopsis thaliana*–*Botrytis cinerea* interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(39), 19743–19752. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900317116>
- Walters, D. R. (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64(1), 97–107. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00329-7)
- Wang, B., Yeun, L. H., Xue, J. Y., Liu, Y., Ané, J. M., & Qiu, Y. L. (2010). Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist*, 186(2), 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03137.x>
- Wang, Min, Gu, Z., Wang, R., Guo, J., Ling, N., Firbank, L. G., & Guo, S. (2019). Plant Primary Metabolism Regulated by Nitrogen Contributes to Plant-Pathogen Interactions. *Plant and*

- Cell Physiology*, 60(2), 329–342. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy211>
- Wang, Ming, Weiberg, A., Dellota, E., Yamane, D., & Jin, H. (2017). Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology*, 14(4), 421–428. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1291112>
- Wang, X., Chung, K. P., Lin, W., & Jiang, L. (2017). Protein secretion in plants: Conventional and unconventional pathways and new techniques. *Journal of Experimental Botany*, 69(1), 21–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx262>
- Wang, Y., Wang, Y., & Wang, Y. (2020). Apoplastic Proteases: Powerful Weapons against Pathogen Infection in Plants. *Plant Communications*, 1(4), 100085. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100085>
- Wang, Y. Y., Hecker, A. G., & Hauser, B. A. (2014). The APX4 locus regulates seed vigor and seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 239(4), 909–919. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2025-2>
- Wang, Z., Yang, L., Jander, G., Bhawal, R., Zhang, S., Liu, Z., Oakley, A., & Hua, J. (2022). AIG2A and AIG2B limit the activation of salicylic acid-regulated defenses by tryptophan-derived secondary metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1–20. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac255>
- Wei, Y., Shih, J., Li, J., & Goodwin, P. H. (2002). Two pectin lyase genes, pnl-1 and pnl-2, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. *Microbiology*, 148, 2149–2157. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00742.x>
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F. M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H. Da, & Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342(6154), 118–123. <https://doi.org/10.1126/science.1239705>
- Williamson, J. D., Jennings, D. B., Guo, W. W., Pharr, D. M., & Ehrenshaft, M. (2002). Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: Polyols - Multifunctional plant protection? *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4), 467–473. <https://doi.org/10.21273/jashs.127.4.467>
- Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., & Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*, 10(3), 127–140. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106>
- Wubben, J. P., Ten Have, A., Van Kan, J. A. L., & Visser, J. (2000). Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Current Genetics*, 37(2), 152–157. <https://doi.org/10.1007/s002940050022>
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R. A., & Lamb, C. (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO Journal*, 23(4), 980–988. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600086>
- Xiao, C., Guo, H., Tang, J., Li, J., Yao, X., & Hu, H. (2021). Expression Pattern and Functional Analyses of *Arabidopsis* Guard Cell-Enriched GDSL Lipases. *Frontiers in Plant Science*, 12(September). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748543>
- Xiao, W., Sheen, J., & Jang, J. C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, 44(4), 451–461. <https://doi.org/10.1023/A:1026501430422>
- Xu, P., Fang, S., Chen, H., & Cai, W. (2020). The brassinosteroid-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19 (XTH19) and XTH23 genes are involved in lateral root development under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 104(1), 59–75. <https://doi.org/10.1111/tpj.14905>
- Xuan, W., Beeckman, T., & Xu, G. (2017). Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling.

- Current Opinion in Plant Biology*, 39, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.010>
- Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, 44(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012>
- Yaeno, T., Matsuda, O., & Iba, K. (2004). Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant Journal*, 40(6), 931–941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02260.x>
- Yang, F., Jensen, J. D., Spliid, N. H., Svensson, B., Jacobsen, S., Jørgensen, L. N., Jørgensen, H. J. L., Collinge, D. B., & Finnie, C. (2010). Investigation of the effect of nitrogen on severity of Fusarium Head Blight in barley. *Journal of Proteomics*, 73(4), 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.10.010>
- Yu, X., Feng, B., He, P., & Shan, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 109–137. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Zarattini, M., Corso, M., Kadowaki, M. A., Monclaro, A., Magri, S., Milanese, I., Jolivet, S., de Godoy, M. O., Hermans, C., Fagard, M., & Cannella, D. (2021). LPMO-oxidized cellulose oligosaccharides evoke immunity in Arabidopsis conferring resistance towards necrotrophic fungus *B. cinerea*. *Communications Biology*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02226-7>
- Zarattini, M., Farjad, M., Launay, A., Cannella, D., Souli, M. C., Bernacchia, G., & Fagard, M. (2021). Every cloud has a silver lining: How abiotic stresses affect gene expression in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 72(4), 1020–1033. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa531>
- Zarattini, M., Launay, A., Farjad, M., Wénès, E., Taconnat, L., Boutet, S., Bernacchia, G., & Fagard, M. (2017). The bile acid deoxycholate elicits defences in Arabidopsis and reduces bacterial infection. *Molecular Plant Pathology*, 18(4), 540–554. <https://doi.org/10.1111/mpp.12416>
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018a). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124(July), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018b). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124(August), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>
- Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S., & Stacey, G. (2002). Characterization of early, chitin-induced gene expression in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9), 963–970. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.963>
- Zhang, F., Yao, J., Ke, J., Zhang, L., Lam, V. Q., Xin, X. F., Zhou, X. E., Chen, J., Brunzelle, J., Griffin, P. R., Zhou, M., Xu, H. E., Melcher, K., & He, S. Y. (2015). Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nature*, 525(7568), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature14661>
- Zhang, L., Lubbers, R. J. M., Simon, A., Stassen, J. H. M., Vargas Ribera, P. R., Viaud, M., & Van Kan, J. A. L. (2016). A novel Zn2Cys6 transcription factor BcGaaR regulates D-galacturonic acid utilization in Botrytis cinerea. *Molecular Microbiology*, 100(2), 247–262. <https://doi.org/10.1111/mmi.13314>
- Zhang, S., Li, X., Sun, Z., Shao, S., Hu, L., Ye, M., Zhou, Y., Xia, X., Yu, J., & Shi, K. (2015). Antagonism between phytohormone signalling underlies the variation in disease susceptibility of tomato plants under elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1951–1963. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru538>
- Zhang, W., Corwin, J. A., Copeland, D. H., Feusier, J., Eshbaugh, R., Cook, D. E., Atwell, S., & Kliebenstein, D. J. (2019). Plant–necrotroph co-transcriptome networks illuminate a metabolic battlefield. *ELife*, 8, 1–32. <https://doi.org/10.7554/eLife.44279>

- Zhang, Y., Zhang, Y., Qiu, D., Zeng, H., Guo, L., & Yang, X. (2015). BcGs1, a glycoprotein from *Botrytis cinerea*, elicits defence response and improves disease resistance in host plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457(4), 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.038>
- Zhou, J., Wang, M., Sun, Y., Gu, Z., Wang, R., Saydin, A., Shen, Q., & Guo, S. (2017). Nitrate increased cucumber tolerance to fusarium wilt by regulating fungal toxin production and distribution. *Toxins*, 9(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins9030100>
- Zhu, W., Ronen, M., Gur, Y., Minz-Dub, A., Masrati, G., Ben-Tal, N., Savidor, A., Sharon, I., Eizner, E., Valerius, O., Braus, G. H., Bowler, K., Bar-Peled, M., & Sharon, A. (2017). BcXYG1, a secreted xyloglucanase from *Botrytis cinerea*, triggers both cell death and plant immune responses. *Plant Physiology*, 175(1), 438–456. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00375>
- Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y. G., & Xia, Y. (2018). Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9(July), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01088>