



**HAL**  
open science

# Caractérisation des agglutinines du pommier : une approche biotechnologique pour la création d'une résistance durable au feu bactérien

Antoine Bodelot

► **To cite this version:**

Antoine Bodelot. Caractérisation des agglutinines du pommier : une approche biotechnologique pour la création d'une résistance durable au feu bactérien. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2023. Français. NNT : 2023NSARI084 . tel-04624933

**HAL Id: tel-04624933**

**<https://theses.hal.science/tel-04624933>**

Submitted on 25 Jun 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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'INSTITUT NATIONAL D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR POUR L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET L'ENVIRONNEMENT

ECOLE DOCTORALE N° 642  
*Ecole doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement*  
Spécialité : « Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire »

Par

**Antoine BODELOT**

**« Caractérisation des agglutinines du pommier : une approche biotechnologique pour la création d'une résistance durable au feu bactérien »**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 05/12/2023  
Unité de recherche : UMR 1345 – IRHS, 42 rue Georges Morel 49070 Beaucouzé  
Thèse N° : 2023-23 I-84

## Rapporteurs avant soutenance :

Annabelle DEJARDIN Chargée de Recherche, INRAE  
Stephane GENIN Directeur de Recherche, CNRS

## Composition du Jury :

Président :	Sylvain LA CAMERA	Professeur, Université de Poitiers
Examineurs :	Alia DELLAGI	Professeure, AgroParisTech
	Bruno JALOUX	Maître de Conférence, Institut Agro Rennes-Angers
Dir. de thèse :	Marie-Noëlle BRISSET	Directrice de Recherche INRAE
Co-encadrant.es:	Alexandre DEGRAVE	Maître de Conférence, Institut Agro Rennes-Angers
	Emilie VERGNE	Ingénieure de Recherche INRAE

## Remerciements

Même s'il reste encore la soutenance à passer pour valider ces trois années de travail, il est temps de remercier les personnes que j'ai croisé depuis le début de ma thèse, voire même depuis le stage de fin d'études.

Tout d'abord, je voudrais remercier Annabelle Déjardin et Stéphane Genin d'avoir accepté d'être rapportrice et rapporteur de ma thèse, ainsi qu'Alia Dellagi, Bruno Jaloux et Sylvain La Caméra d'avoir accepté d'être mes examinateurs et examinatrice. Je voudrais aussi remercier Marianne Mazier et Elisabeth Jamet pour avoir accepté de faire partie de mon CSI. Vos différents conseils et votre point de vue extérieur sur le sujet ont permis de faire avancer les différents travaux de la thèse et de le recentrer.

Je voudrais ensuite remercier chaleureusement mes trois encadrants de thèse, Marie-Noëlle Brisset, Alexandre Degrave et Emilie Vergne pour leur aide et leur soutien au cours de ces trois années. Merci beaucoup Marie-Noëlle pour ta rigueur et tous tes conseils pour les présentations et la rédaction, qui m'ont fait gagner beaucoup de temps (merci pour la fonction « Aligner » de Power Point) et fait gagner en rigueur. Tous ces conseils me serviront sans aucun doute dans la suite. Alexandre, discuter science (et pas uniquement celle qui touche au végétal) a été un réel plaisir. Même si les Western n'ont jamais été ma spécialité, ta sérénité et ta bonne humeur et ton soutien m'ont beaucoup aidé. Merci aussi de m'avoir donné la possibilité de donner quelques cours. Emilie, tu m'as presque tout appris sur le clonage, merci beaucoup. Ta patience et ta bienveillance ont été des grands atouts au cours de ces trois années, même dans les moments de moins bien. Désolé de t'avoir tant fait souffrir pendant la relecture. Merci infiniment à tous les trois.

Une bonne partie des résultats de cette thèse n'existerait pas sans l'aide de Nicolas Dousset (aka « Gaufrette ») et Elisa Ravon (désolé Elisa, je ne t'ai pas trouvé de surnom). Un merci infini à tous les deux pour toute l'aide que vous m'avez fourni, que ce soit pour le repiquage, les acclimatations et les notations en serre. Nicolas, ça y est tu es enfin débarrassé de moi, j'espère juste ne pas être la cause de l'apparition de tes cheveux gris. J'espère que je n'en suis pas (trop) la cause. Elisa, je pense que cette sortie en voiture automatique pour aller chercher des ventilateurs restera gravée très longtemps dans ma mémoire. Bonne continuation à tous les deux et encore merci mille fois.

Je voudrais aussi remercier l'équipe ResPom dans son ensemble, pour la bonne ambiance dans l'équipe au cours de ces trois années, que ce soit au labo ou pendant les pots ou les pique-niques. Merci beaucoup Christelle pour ta gentillesse, ta bonne humeur permanente et ton aide pendant les TP. Merci aussi à Brice, Matthieu, Anthony et Raphael pour vos choix de musiques parfois douteux, votre bonne humeur et vos précieux conseils. TERENCE, pour les quelques sorties en terrasse et bon courage pour la fin de ta thèse. Axelle, c'est toi qui reprends le flambeau des agglutinines maintenant. Les petites pauses avec Romane l'aprem ou les sorties fléchettes vont me manquer. Enfin merci à Erwan, mon maître de stage de M2 qui m'a tout appris sur les agglutinines et qui a fini de me convaincre de faire une thèse.

Merci également à toutes les personnes du bâtiment B croisés dans les couloirs du labo ou dans la salle de pause. Merci Christophe, non pas pour avoir été une victime collatérale de votre jeu de « Qui fera le plus peur à l'autre avec Nicolas » mais pour ta gentillesse au cours de ces trois ans. Merci aussi à Maryline pour ta bonne humeur et ta gentillesse permanente. Merci Bernard pour tes blagues, tes imitations, tes cafés et ton gâteau pomme noix qui vont beaucoup me manquer. Merci également à Jean-Marc et Rémi pour les repas partagés ensemble le midi, à parler rugby ou sport en général.

Un grand merci également aux différents thésards croisés dans ou en dehors de l'INRAe. Merci à Loup pour les cafés partagés, parfois dans le froid dans un nuage de fumée, à faire des reviews sur la qualité de certains films vraiment pas ouf ou à calculer l'argent qu'on gagnerait si on se faisait payer tous nos congés en fin de thèse. Pierre, Roussette et Roulette, un duo meilleur pour trouver un nom d'équipe que pour jouer au baby-foot, c'était un réel plaisir de discuter le midi sur mon retard dans la lecture des 'Courier Inter', des conseils de restaurants à Angers ou des derniers films vus aux 400 coups. On s'est côtoyé moins longtemps mais merci aussi à Andréa ma binôme de repas le jour où personne ne travaille. Bon courage à tous les trois pour la suite de vos thèses.

Un grand merci aussi à tous les membres des « soirées vins » (Patricia, Sylvain, David, Marie-Charlotte, Xabi, Caroline, Pierre, Julie, Camille, Aurélien et Romane) pour toutes ces bonnes soirées passés ensemble autour de dégustations de vins ou à boire des bières et jouer au Molky au Héron Carré. Quelques mentions spéciales, d'abord à toi Patricia, j'ai bien appris que le bon rhum vient de la Réunion et merci aussi de m'avoir fait découvrir ta grande passion : le vin. Merci aussi à toi aussi Julie pour ta gentillesse, ton soutien et pour l'ensemble des conseils, que ce soit pendant ou pour l'après thèse (et désolé d'avoir dit tant de mal sur la Vendée).

Merci aussi aux trois membres du « bureau des thésards », Xabi, Marie-Charlotte et Romane. Xabi et Marie-Charlotte, je n'oublierai pas le premier jour de mon arrivée où j'ai appris qu'il valait mieux verrouiller mon ordinateur quand je n'étais pas dans mon bureau. Merci beaucoup à tous les deux pour votre accueil dans ce bureau, les petits dej à 7h30 le matin pour bien commencer la journée, et pour tous les autres bons moments passés dans le bureau mais aussi en dehors (cuire les tomates avant de les mettre dans un cake, ça évite de n'en manger que la croûte) ainsi que pour votre soutien sans failles. Romane, tes goûts musicaux parfois douteux (enfin surtout une certaine playlist) ont mis une certaine ambiance dans le bureau. Merci aussi pour les soirées fléchettes et les (3) après-midi courses. A tous les trois, merci beaucoup et plein de bonnes choses pour la suite.

Mais ces trois années de thèse, ce n'est pas seulement du temps passé à l'IRHS (quoi que). Je voulais remercier toutes les personnes que j'ai croisé sur Angers, Laurine, Antoine, Fanny, Maxime, Séverine, Thomas, Antonin. Bien que je n'ai peut-être participé qu'à 20% des sorties, ça a toujours été un plaisir de partager ces moments à vos côtés.

Merci également à Clara, Maxence, Manon, Laurine (citée une deuxième fois, c'est plus que certains auteurs dans la biblio), Maxence, Chloé, Margot et Eva pour tous ces week-ends passés à Nantes, Paris, Dijon, Vaires sur Marne, Palaiseau ou encore dans le fin fond de la Bretagne (désolé Chloé, j'ai oublié les noms des villages) ainsi que pour les vacances passés avec vous, à tous ces bons moments passés ensemble et à tous ceux qui viendront ensuite. Merci aussi à toi Adrien pour les diverses invitations aux BBCuves (et donc de faire partie de l'élite maintenant) et par tes crochets par Angers pour venir boire un café à l'INRAe. Merci à tous pour votre soutien sans failles au cours de ces trois années.

Enfin pour terminer, je voudrais aussi remercier mes parents, tant par leur tentative d'essayer de comprendre mon sujet de thèse que par leur soutien, qui n'a pas commencé au début de la thèse mais bien avant cela. Merci de m'avoir permis de faire tout ce que j'ai fait, c'est en partie grâce à vous aussi que j'en suis arrivé là. Merci aussi à ma sœur Agathe pour le soutien, qui date bien avant de ces trois années et d'avoir essayé de comprendre la bio végétale comme j'ai essayé comprendre comment fonctionne un moteur, sans succès pour tous les deux je pense.

## Glossaire

5FC : 5-fluorocytosine	IFT : Indice de Fréquence de Traitement
5FU : 5-fluorouracile	IRHS : Institut de Recherches en Horticulture et Semences
ABA : Agaricus Bisporus Agglutinin	LecRLK : Receptor-Like Kinase à domaine Lectine
AIB : Acide indolybutyrique	LPS : Lypopolysaccharides
ADN : Acide desoxyribonucléique	LRR : Leucine Rich Repeat
ADNc : ADN cytoplasmique	LysM : Lysin Motif
ADNg : ADN génomique	MdAGGs : <i>Malus domestica</i> agglutinins
ANA : Acide acétique de naphthalène	MdDiAGGs : <i>Malus domestica</i> di-agglutinins
aNHEJ : alternative Non Homologous End Joining	MS : Murashige and Skoog
ASM : Acibenzolar-S-méthyl	NBT : New Breeding Technics
ARNm : ARN messenger	NHEJ : Non Homologous End Joining
ARNt : Acide ribonucléique totaux	OE : OverExpressing
AUDPC : Area Under Disease Progression Curve	OGM : Organisme Génétiquement Modifié
BAP : Benzyl adénine	PA : pPPO16::MdAGG10
BSA : Bovin Serum Albumin	PAT : pPPO16::MdAGG10::TermRubisco
CE : Commission Européenne	PAM : Protospacer Adjacent Motif
CFBP : Collection Française de Bactéries Phytopathogènes	PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
CFU : Colony Forming Unit	PM : Membrane Péritrophique
cNHEJ : classical Non Homologous End Joining	PTGS : Post Transcriptional Gene Silencing
COV : Composé Organique Volatile	PTI : Plant Triggered Immunity
Cq : Cycle de quantification	PR : Pathogenesis-Related
CRA : Chitinase-Related Agglutinins	PVDF : Polyvinylidène difluoride
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat	PVPP : Polyvinylpyrrolidone
crRNA : CRISPR RNA	qPFD : Puce à faible densité quantitative
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern	QTL : Quantitative Trait Loci
DFO : Desferrioxamine	RH : Recombinaison Homologue
dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphates	ROS : Reactive Oxygen Species
Dp : <i>Dysaphis plantaginea</i>	RT : Rétrotranscription
DSB : Double Strand Break	SDN : Site-Directed Nucleases
DTT : Dithiothréitol	SDP : Stimulateur de Défense des Plantes
Ea : <i>Erwinia amylovora</i>	SDS : Sodium dodecyl sulfate
<i>Ea ams</i> : Ea 6089 (Souche dépourvue d'EPS)	SNP : Single Nucleotide Polymorphism
<i>Ea WT</i> : Ea CFBP 1430	SSN : Sequence Specific Nuclease
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique	SSR : Simple Sequence Repeat
EPS : Exopolysaccharides	T3SS : Système de sécrétion de type III
ETI : Effector-Triggered Immunity	TALEN : Transcription Activator-Like Nuclease
ETS : Effector-Triggered Susceptibility	TDZ : Thidiazuron
EUL : Euonymus Europeus Lectin	TE : Tris – EDTA
FAO : Food and Alimentation Organization	Tm : Température d'hybridation
GalNac : N-acétylgalactosamine	UE : Union Européenne
GlcNac : N-acétylglucosamine	UMR : Unité Mixte de Recherche
GNA : Galanthus Nivalis Agglutinin	ZFN : Zinc-Finger Nuclease
gRNA : guide RNA	
HR : Hypersensitive Response	

## Table des matières

<b><u>Remerciements</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>Glossaire</u></b> .....	<b>4</b>
<b><u>Table des matières</u></b> .....	<b>5</b>
<b><u>Introduction générale</u></b> .....	<b>9</b>
<b>1. Généralités sur le pommier et ses bioagresseurs</b> .....	<b>10</b>
1.1. Origine et culture du pommier.....	10
1.2. Une culture soumise à différents bioagresseurs.....	11
1.2.1. <i>Dysaphis plantaginea</i> .....	12
1.2.2. <i>Erwinia amylovora</i> .....	14
1.3. Mécanismes de défenses du pommier contre le puceron cendré et le feu bactérien et moyens de lutte associés.....	20
1.3.1. Mécanisme de défense des plantes contre les bioagresseurs.....	20
1.3.2. Aménagement du verger et mécanismes de défenses du pommier contre le puceron cendré.....	22
1.3.3. Mécanismes de défenses du pommier contre le feu bactérien.....	23
<b>2. Généralité sur les lectines</b> .....	<b>26</b>
2.1. Historique et définition des lectines.....	26
2.2. Classification des lectines végétales.....	26
2.2.1. Classification selon leur nombre de sites de fixation.....	26
2.2.2. Classification selon leur séquence nucléotidique.....	27
2.2.3. Classification selon leur localisation et leur caractère inductible.....	31
2.3. Rôle des lectines chez les plantes.....	32
2.3.1. Protéines de stockage.....	32
2.3.2. Senseurs de l'extérieur, communicants de l'intérieur.....	32
2.3.3. Mise en place de symbioses racinaires.....	34
2.3.4. Interaction directe avec les bioagresseurs.....	34
2.4. Présentation de la famille des agglutinines du pommier.....	36
<b>3. Création variétale et nouveaux outils associés</b> .....	<b>40</b>
3.1. Historique de la création variétale et méthodes utilisées.....	40
3.2. Le développement de nouvelles méthodes de sélection : les New Breeding Techniques (NBT).....	42
3.2.1. Effets indésirables potentiels et législation encadrant l'utilisation des NBT.....	44
3.2.2. Système d'édition du génome CRISPR/Cas9.....	45
3.3. Technique de la cisgénèse / intragénèse.....	48

**4. Problématique et objectifs de la thèse.....51**

**Chapitre 1 : Caractérisation fonctionnelle des agglutinines dans différents pathosystèmes**

**1. Analyse par perte de fonction à l'aide de lignées de pommiers transgéniques éditées par CRISPR/Cas9 : preuve fonctionnelle *in planta* de l'implication des agglutinines dans la résistance au feu bactérien et au puceron cendré.....53**

1.1. Obtention et génotypage partiel des lignées.....53

1.1.1. Obtention des lignées de pommiers éditées pour les *MdAGGs*.....53

1.1.2. Génotypage partiel des lignées éditées.....55

1.2. Caractérisation moléculaire et phénotypique et des lignées Crispr vis-à-vis du feu bactérien.....60

1.2.1. Croissance des plantes en serre.....60

1.2.2. Caractérisation quantitative des éditions des séquences des *MdAGGs* et phénotypage des lignées Crispr vis-à-vis du feu bactérien.....60

1.3. Caractérisation phénotypique des lignées Crispr vis-à-vis du puceron cendré.....71

1.4. Discussion.....73

**2. Analyse par gain de fonction à l'aide de lignées surexpresses : la surexpression de la lectine MdAGG10 de pommier, ne confère pas de résistance à deux bactéries pathogènes et au puceron cendré.....77**

2.1. Caractérisation de MdAGG10 *in vitro* et *in planta* pour son implication dans la résistance à certaines bactéries pathogènes.....77

2.1.1. La surexpression de la lectine *MdAGG10* de pommier, à large spectre d'agglutination, ne confère pas de résistance au feu bactérien ou à la pourriture bactérienne.....77

2.1.2. Profil d'expression de gènes de défenses chez les lignées OE.....90

2.2. Caractérisation phénotypique des lignées OE vis-à-vis du puceron cendré.....91

2.3. Discussion.....92

**Chapitre 2 : Tentative de création d'une résistance durable du pommier contre le feu bactérien via la technique de l'intragénèse.....94**

**1. Obtention des constructions et lignées.....95**

1.1. Choix des éléments de la cassette intragénique à associer à la séquence codante de MdAGG10...95

1.2. Obtention des constructions PA et PAT.....95

1.3. Obtention des lignées contenant la construction PA ou la construction PAT.....96

**2. Caractérisation des lignées transgéniques PA au stade vitroplant.....97**

2.1. Vérification préliminaire de l'expression des MdAGGs et de la résistance au feu bactérien conférée par un traitement à l'ASM chez des vitroplants de 'Gala'.....98

2.2. Expression de <i>MdAGG10</i> et accumulation de la protéine dans les tissus des lignées PA suite à l'infection par <i>Ea</i> .....	99
2.3. Caractérisation phénotypique au stade vitroplant des lignées PA suite à l'infection par <i>Ea</i> .....	102
2.3.1. Phénotypage des lignées PA après l'infection d' <i>Ea</i> .....	102
2.3.2. Délai d'apparition du premier symptôme de la maladie.....	104
2.3.3. Effet d'un traitement à l'ASM sur le phénotype des lignées PA après une infection d' <i>Ea</i> .....	106
<b>3. Les lignées PA semblent ralentir la progression de la maladie, sans la stopper.....</b>	<b>107</b>
<b><u>Discussion générale</u>.....</b>	<b>113</b>
<b><u>Matériel et Méthodes</u>.....</b>	<b>119</b>
<b>1. Conditions de culture du matériel végétal.....</b>	<b>119</b>
1.1. Culture et multiplication <i>in vitro</i> du pommier.....	119
1.2. Induction, expression racinaire du pommier et croissance en serre.....	119
1.3. Culture de semis d' <i>A. thaliana</i> .....	120
<b>2. Traitement à l'ASM.....</b>	<b>120</b>
<b>3. Souches bactériennes, culture et inoculation.....</b>	<b>120</b>
3.1. Préparation des inocula d' <i>Ea</i> et expérimentations associées.....	121
3.2. Préparation des inocula de <i>Ralstonia solanacearum</i> et expérimentations associées.....	122
<b>4. Elevage et infestation de <i>Dysaphis plantaginea</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>5. Obtention des vecteurs de transformation génétique.....</b>	<b>122</b>
5.1. Obtention de la construction surexpresseur p35s:: <i>MdAGG10</i> .....	122
5.2. Obtention de la construction CRISPR/Cas9 permettant la mutagenèse dirigée des <i>MdAGGs</i> .....	123
5.3. Obtention de la construction intragénique inductible par <i>Ea</i> pPPO16:: <i>MdAGG10</i> ::TermRubisco.....	126
5.3.1. Construction de la cassette inductible par <i>Ea</i> pPPO16:: <i>MdAGG10</i> .....	126
5.3.2. Construction de la cassette intragénique pPPO16:: <i>MdAGG10</i> ::TermRubisco (PAT).....	128
5.4. Transformation des bactéries compétentes et stockage.....	131
<b>6. Obtention des lignées transgéniques.....</b>	<b>132</b>
6.1. Transformation du pommier.....	132
6.2. Etape de recombinaison.....	133
6.3. Transformation d' <i>A. thaliana</i> .....	135
6.4. Génotypage des lignées transgéniques.....	135
6.4.1. Vérification de l'insertion du T-DNA.....	135
6.4.2. Analyse des éditions des séquences codantes des <i>MdAGGs</i> .....	135

<b>7. Méthode de phénotypage des bioagresseurs.....</b>	<b>136</b>
<b>8. Echantillonnage pour les analyses moléculaires et biochimiques.....</b>	<b>138</b>
<b>9. Analyses des acides nucléiques.....</b>	<b>139</b>
9.1. Extraction d'ADNg.....	139
9.2. Extraction d'ARNt.....	139
9.3. Retrotranscription (RT).....	139
9.4. PCR.....	139
9.5. Migration sur gel des amplicons de PCR et des produits de digestions enzymatiques.....	140
9.6. PCR quantitative (qPCR).....	140
<b>10. Analyses protéiques.....</b>	<b>141</b>
10.1. Extraction protéique.....	141
10.2. Dosage protéique et migration SDS-page.....	142
10.3. Transfert et immunodetection.....	142
<b>11. Analyse des données statistiques.....</b>	<b>143</b>
<b><u>Annexes</u> .....</b>	<b>144</b>
<b><u>Bibliographie</u> .....</b>	<b>159</b>

## INTRODUCTION GENERALE

Le développement et l'utilisation massive des produits phytosanitaires ainsi que la création de nouvelles variétés plus productives sont deux leviers qui ont permis une augmentation rapide des rendements agricoles après la seconde guerre mondiale. Cependant l'usage massif des pesticides ainsi qu'une utilisation abusive de la monoculture sans rotations ont sélectionné des bioagresseurs résistants aux nouvelles variétés et / ou aux produits phytosanitaires. De plus, l'utilisation de ces derniers est de plus en plus remise en question du fait de la toxicité d'une partie d'entre eux contre la faune, la flore et de leur dangerosité pour l'applicateur et le consommateur.

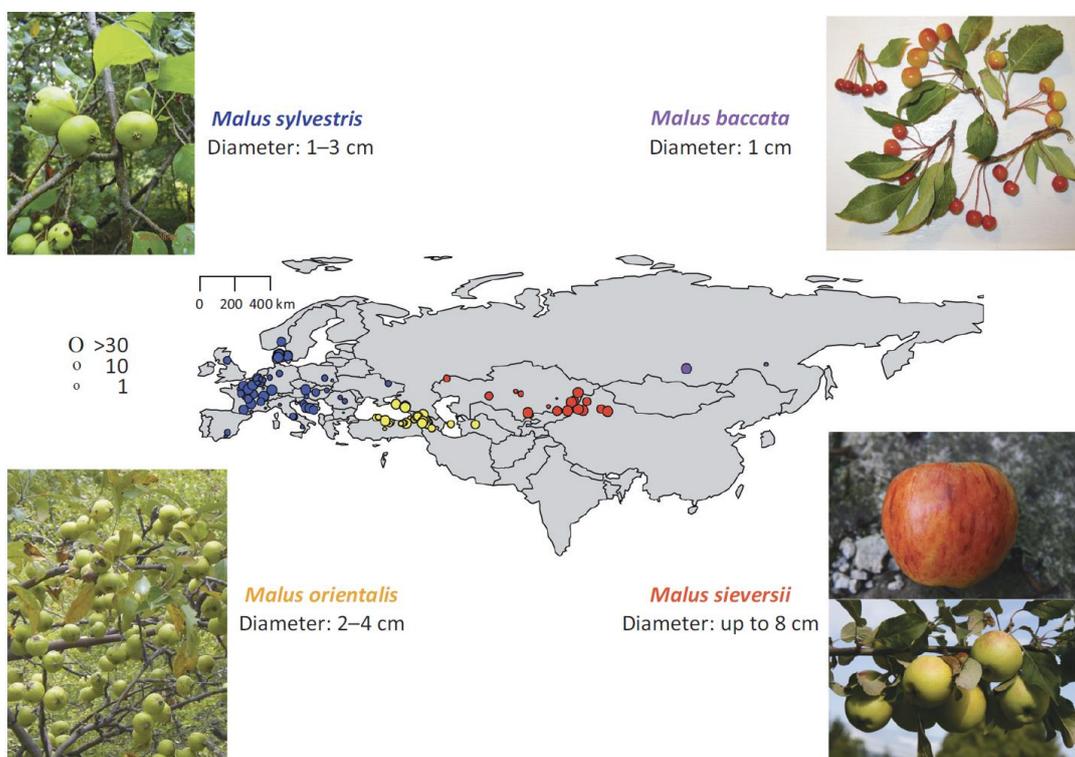
Pour remédier à cela, l'Union européenne (UE), a présenté la directive 2009/128/CE promettant une utilisation raisonnée des pesticides de synthèse tout en assurant la durabilité du système agricole. Cette directive a entraîné la tenue du Grenelle de l'Environnement en 2007 en France, ainsi que le vote en 2008 du plan Ecophyto, qui prévoyait une diminution de 50% de l'utilisation des produits phytosanitaires d'ici 2018. Malgré beaucoup de moyens mis en place, les objectifs n'ont pas été atteints et un second plan, le plan Ecophyto II+, a été voté en 2015 et vise à réduire l'utilisation de produits phytosanitaires de 25% en 2020 et 50% d'ici 2025. Un des leviers utilisés pour rentrer dans ces objectifs est de trouver des alternatives à ces produits dont un ensemble est regroupé sous l'appellation « biocontrôle ». Ces solutions de biocontrôle sont destinées à protéger les plantes contre les bioagresseurs et les adventices, en misant sur les mécanismes naturels et les interactions entre espèces. On trouve sous cette appellation l'utilisation de substances naturelles d'origine animale ou végétale, de phéromones permettant d'attirer ou repousser certains bioagresseurs, de microorganismes comme des bactéries ou des champignons, ainsi que de macroorganismes prédateurs naturels des bioagresseurs, comme la coccinelle, prédatrice du puceron (Ministère de l'Agriculture - <https://agriculture.gouv.fr/> -). On y trouve également certains stimulateurs de défenses des plantes (SDP), qui sont des substances ou des microorganismes non pathogènes qui une fois appliqués sur les plantes, leurs confèrent une plus grande résistance à différents stress biotiques (Bestim - <https://rmt-bestim.org/> -). L'équipe ResPom (UMR 1345 IRHS) dans laquelle j'ai effectué ma thèse, travaille sur les résistances induites et génétiques du pommier. Des études menées dans l'équipe montrent que l'application de l'acibenzolar-S-méthyl (ASM), un SDP analogue fonctionnel de l'acide salicylique, sur des semis de pommier, induit la résistance du pommier à différents stress biotiques, ainsi que l'expression de nombreux gènes impliqués dans la résistance (Warneys et al, 2018). Parmi ces gènes, on trouve les agglutinines (*MdAGGs*), une famille codant des protéines appartenant aux lectines et qui sont associées à la résistance contre le feu bactérien induite par l'ASM (Chavonet et al, 2022). Avant d'entrer plus en détail dans la description de cette famille de protéines, je vais d'abord commencer par présenter le pommier et deux de ses bioagresseurs principaux, *Erwinia amylovora*, responsable du feu bactérien et le puceron cendré, *Dysaphis plantaginea*. Je ferai ensuite un rapide historique de la création variétale et introduirai des nouvelles techniques récemment développées et sensées la révolutionner à plusieurs égards, en

particulier concernant les espèces pérennes auto-incompatibles et à croissance lente telle que le pommier. En effet, la création de nouvelles variétés résistantes aux bioagresseurs *via* l'utilisation de techniques de créations variétales conventionnelles est longue et porte souvent sur la sélection de résistances dites « qualitatives ». Les gènes correspondants sont plus facilement contournés par les bioagresseurs, entraînant une perte de la résistance parfois même avant la commercialisation de la nouvelle variété. Au contraire, des gènes tels que les agglutinines peuvent être de bons candidats pour le développement de ces nouvelles techniques. De plus, le parlement européen devrait débattre à propos d'un texte de loi déposé en 2023 permettant l'utilisation de certaines de ces techniques pour créer des nouvelles variétés, alors que jusqu'ici, les variétés issues de ces techniques étaient considérées comme des OGMs.

## 1. Généralités sur le pommier et ses bioagresseurs

### 1.1. Origine et culture du pommier

Le pommier (*Malus domestica*) est une plante pérenne appartenant à la famille des *Rosaceae*. Originaire d'Asie centrale, le pommier a été importé en Europe le long, entre autres, de la route de la soie, permettant des hybridations avec des espèces sauvages de pommiers locaux comme *M. baccata* en Sibérie, *M. orientalis* dans le Caucase et *M. sylvestris* en Europe (Cornille et al, 2014, **Figure 1**). Ces hybridations avec des pommiers sauvages ont été favorisées par l'auto-incompatibilité du pommier et ont permis l'apparition de milliers de variétés différentes.

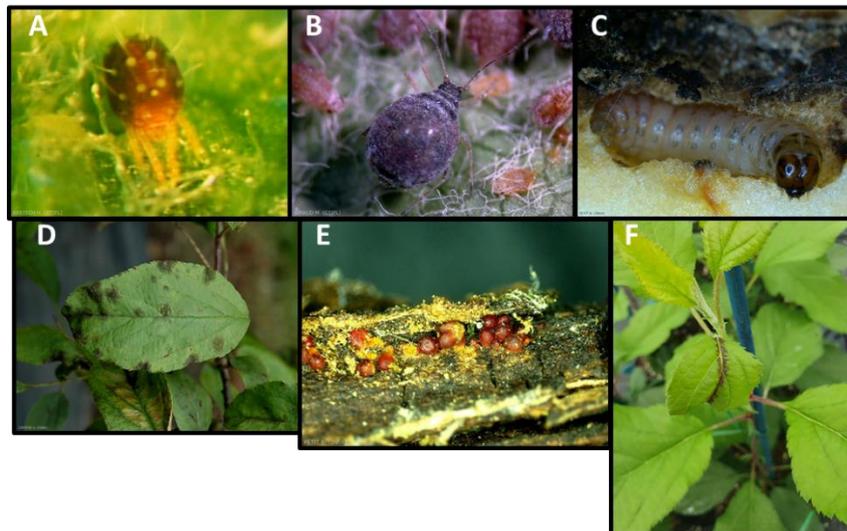


**Figure 1 : Distribution géographique des différentes pommes sauvages ayant participé à l'évolution de *M. domestica*** (Cornille et al, 2014)

Connue pour ses notes sucrées et acidulées, ses qualités nutritives intéressantes ainsi qu'une conservation simple et longue, la pomme est consommée dans des desserts, comme fruit de table, ou dans des boissons, et est maintenant cultivée jusque dans des zones tropicales (Morgan et Richards 2003). En 2019, la France a produit 1,735 millions de tonnes de pommes, faisant d'elle le 3<sup>ème</sup> pays producteur en Europe, derrière la Pologne et l'Italie (FAOSTAT - <https://www.fao.org/faostat/en/>). Le travail de sélection du pommier porte actuellement sur les qualités organoleptiques du fruit (taille, couleur, goût), sa productivité, son adaptation aux pratiques culturales ainsi que sur sa résistance aux différents stress biotiques et abiotiques auxquels il est soumis (Luo et al, 2020 ; Teh et al, 2021).

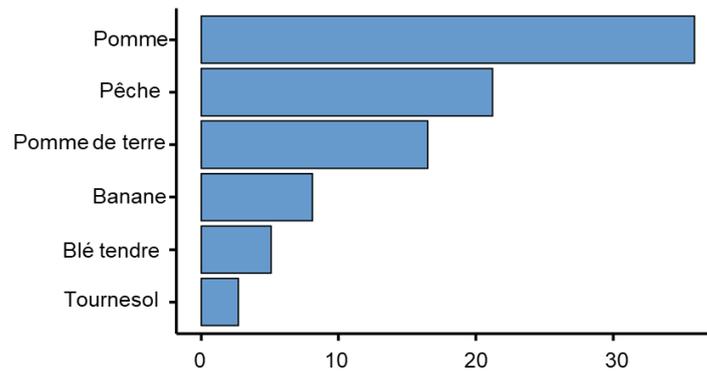
## 1.2. Une culture soumise à différents bioagresseurs

Le pommier est soumis aux attaques d'un large spectre de bioagresseurs comme des acariens (*Panonychus ulmi*), des insectes piqueurs suceurs (*Dysaphis plantaginea*), des insectes phytophages ou fructivores (*Cydia pomonella*), des champignons s'attaquant aux feuilles ou au fruit comme *Venturia inaequalis* ou encore à l'écorce des arbres comme *Neonectria ditissima*, mais aussi des bactéries (*Erwinia amylovora*) (Ephytia - <http://ephytia.inra.fr/> - **Figure 2**).



**Figure 2 : Exemples de bioagresseurs du pommier :** (A) l'acarien *Panonychus ulmi*, (B) le puceron cendré *Dysaphis plantaginea*, (C) la chenille du carpocapse (*Cydia pomonella*), (D) l'ascomycète responsable de la tavelure du pommier *Venturia inaequalis*, (E) le champignon *Neonectria ditissima* responsable du chancre européen et (F) la bactérie *Erwinia amylovora*, responsable du feu bactérien. Toutes les images proviennent du site internet d'Ephytia (<http://ephytia.inra.fr/>) hormis l'image F qui est une image personnelle.

Cette grande diversité de bioagresseurs, fait que le pommier est la culture avec l'indice de fréquence de traitement (IFT) le plus important en France métropolitaine (**Figure 3**).



**Figure 3 : Valeur des IFTs de différentes cultures en France.** Les valeurs de l'IFT de la pomme, de la pêche, et de la banane proviennent d'Agreste 2018, les valeurs de l'IFT du blé tendre, du tournesol et de la pomme de terre proviennent d'Agreste 2017.

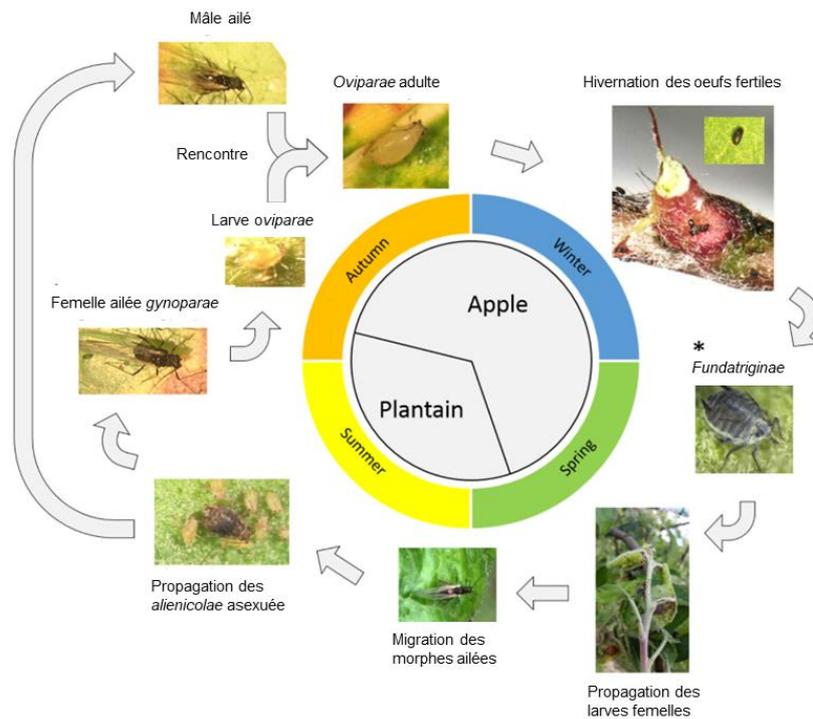
Par la suite, nous allons nous intéresser plus en détails à deux bioagresseurs du pommier pour lesquels l'application d'ASM confère une résistance, le puceron cendré *Dysaphis plantaginea* (*Dp*) et l'agent causal du feu bactérien, *Ea*.

### 1.2.1. *Dysaphis plantaginea*

#### 1.2.1.1. Infestation de l'hôte, symptômes et cycle de reproduction

*Dp* est un hémiptère hétéroécique, c'est-à-dire qu'il a besoin de deux hôtes différents au cours de son cycle de vie : le plantain (*Plantago lanceolata*) et le pommier (*Malus domestica*) (Blommers et al, 2004). Au début du printemps, les œufs présents sur le pommier éclosent pour donner des larves femelles non ailées, les *Fundatrigenae*. Celles-ci se reproduisent par reproduction asexuée entraînant une forte augmentation de la population en peu de temps et se nourrissent en piquant la face inférieure des feuilles, provoquant l'enroulement de ces dernières (**Figure 4**). On compte en moyenne entre 5 et 7 générations de *Fundatrigenae* d'une durée de 10 jours sur une période de deux à trois mois (Baker et Turner, 1916). En plus de l'enroulement des feuilles, les branches infestées donneront moins de fruits, voire pas de fleurs le printemps suivant (Blommers et al, 2004). Les attaques de pucerons cendrés sur les pommiers peuvent aussi entraîner une déformation des fruits, impliquant de grandes pertes économiques pour les producteurs (Wilkaniec, 1993 ; Blommers et al, 2004).

Au début de l'été, les premières formes ailées du puceron cendré apparaissent, migrent sur le plantain et se multiplient à nouveau par reproduction asexuée en donnant des femelles aptères appelées les *Alienicolae*. Avec l'allongement des nuits au début de l'automne, émergent alors des *gynoparae*, c'est-à-dire des individus ailés effectuant le vol retour vers le pommier où ils produiront les *Oviparae*. Ces dernières correspondent aux femelles pucerons ailées (**Figure 4**). Trois à quatre semaines après l'apparition des *gynoparae*, les pucerons ailés mâles migrent du plantain vers le pommier pour s'accoupler avec les *Oviparae*. Les femelles fécondées pondent des œufs, qui passeront l'hiver sur les parties ligneuses du pommier (Blommers et al, 2004).



**Figure 4 : Cycle de reproduction de *Dysaphis plantaginea* (Warneys et al, 2018)**

Les pucerons ailés ne migrent pas sur des plantes choisies au hasard. Différentes étapes de vérifications de l'hôte sont réalisées par le puceron pour s'assurer que la plante choisie lui permettra de se développer et de se reproduire. Les pucerons peuvent reconnaître des composés organiques volatiles (COV) spécifiques ou non d'une famille de plantes hôtes leur indiquant la présence d'une plante à proximité. Certains COVs émis par les plantes d'une même espèce permettent également aux pucerons de discriminer des plantes leur permettant une meilleure multiplication (Webster, 2012). Une fois le puceron ailé présent sur une feuille, il vérifie l'absence de cire sur la cuticule ou de résidus de trichomes, facteurs limitant son développement (voir partie 1.3.2. de l'introduction pour plus de détails – Powell et al, 2006). La couleur de la feuille est également déterminante pour l'établissement du puceron sur une plante hôte. En effet, certaines espèces de pucerons sont attirées par les longueurs d'ondes correspondant à la couleur verte mais repoussées par les longueurs d'ondes correspondant à la couleur bleue voire au spectre UV (Döring et Chittka, 2007). Le puceron peut également faire de courts prélèvements avec son stylet dans l'épiderme ou le mésophylle des feuilles pour vérifier la présence de certains composés et discriminer les plantes afin de choisir celle qui lui permettra le meilleur développement (Powell et al, 2006).

#### 1.2.1.2. Facteurs de virulence du puceron cendré

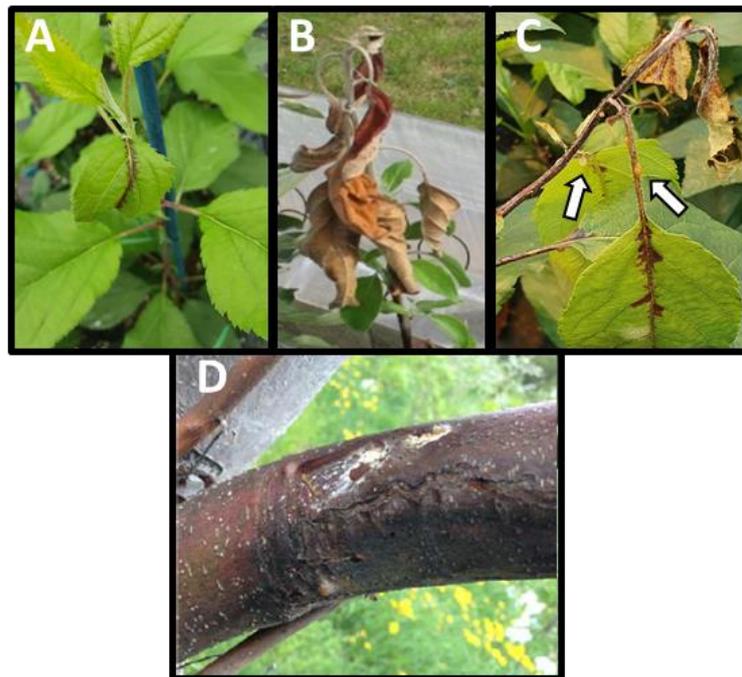
Le pouvoir pathogène du puceron provient majoritairement de ses pièces buccales, qui sont ses outils de nutrition. Les pièces buccales des pucerons possèdent des adaptations morphologiques et anatomiques qui permettent d'éviter la détection de la piqûre par la plante (Brault et al, 2010). Les pièces

buccales sont composées en majorité d'un faisceau de stylets, comprenant deux stylets mandibulaires externes qui entourent deux stylets maxillaires internes. L'ensemble forme alors un canal salivaire qui permet au puceron d'y injecter différentes salives ayant des rôles différents (Brault et al, 2010 ; Nalam et al, 2019) : une première salive dite gélifiante forme une gaine qui facilite les mouvements du stylet lors des prélèvements du puceron et protège ce dernier des défenses mises en place par la plante. Une modification de la structure de cette gaine peut avoir des effets néfastes sur la survie et la fécondité du puceron. En effet, une étude a montré que la mutation des gènes *SHP* codant les protéines formant la structure de la gaine a entraîné une baisse de la croissance et de la fertilité d'*Acyrtosiphon pisum* et de *Sitobion avenae* (Abdellatef et al, 2015 ; Will et Vilcinskis, 2015). Dans un second temps, le puceron produit une salive dite « liquide » qui permet de réorienter les fonctions des cellules infectées à son avantage. La salive « liquide » est composée de différentes familles d'enzymes assurant la lyse de certaines molécules pour permettre une meilleure absorption de la sève (Miles, 2007).

### 1.2.2. *Erwinia amylovora*

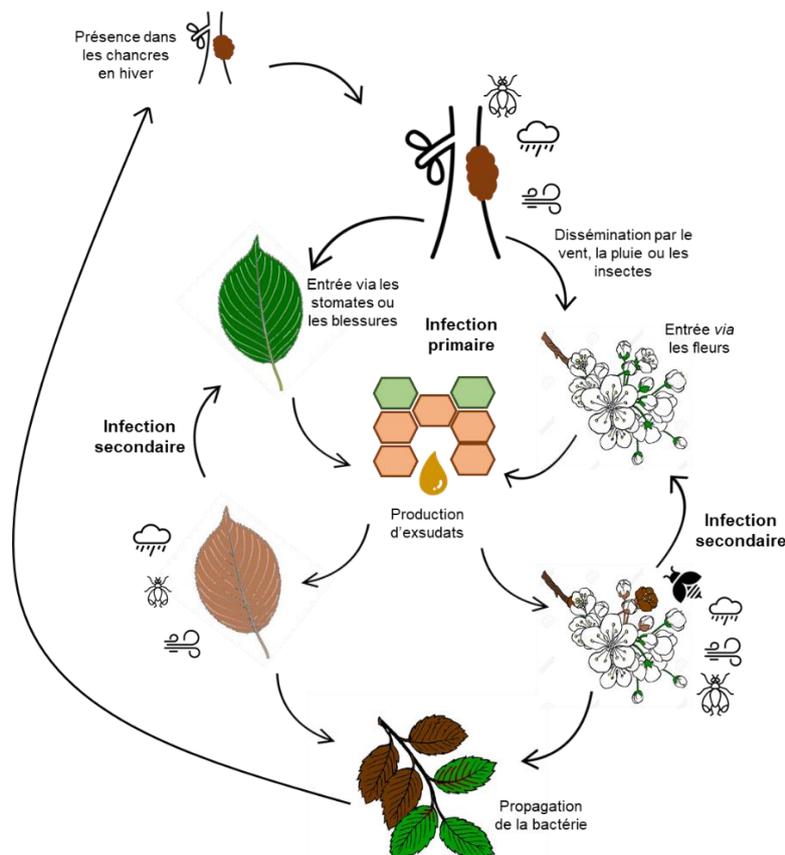
#### 1.2.2.1. Infection et colonisation de l'hôte

*Ea* est une bactérie Gram négative appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* affectant la plupart des membres de la famille des *Rosaceae*, dont *M. domestica*. Cette maladie se caractérise par l'apparition de nécroses sur les fleurs et feuilles infectées, un recourbement en crosse des pousses et l'apparition d'exsudats bactériens, mélange de bactéries et d'exopolysaccharides (EPS) sur les organes infectés (**Figure 5**).



**Figure 5 : Symptômes typiques sur un pommier d'une infection par du feu bactérien. (A)** Nécrose le long de la nervure d'une feuille infectée. **(B)** Recourbement en crosse d'une tige à l'aspect «brûlée». **(C)** Les flèches blanches pointent une ooze. **(D)** Chancres visibles sur les branches d'un arbre infecté.

L'hiver, la bactérie est en dormance dans des chancres formés au cours des épisodes d'infections précédents (**Figure 6** - Zeng et al, 2021). Au printemps, la bactérie se multiplie et sort des chancres en formant des exsudats qui sont disséminés par le vent, la pluie ou par des insectes. L'entrée de la bactérie au sein de la plante se fait principalement *via* les fleurs mais *Ea* peut également entrer *via* les stomates ou par les blessures occasionnées par la pluie ou le vent sur les feuilles, les branches ou le tronc (Thomson, 2000). *Ea* se multiplie sur les stigmates avant d'entrer dans l'hypanthe de la fleur *via* les nectaires (Bayot et Ries, 1986). Une fois à l'intérieur de l'arbre, la bactérie se multiplie dans l'apoplasme, et se déplace de proche en proche en provoquant la mort des cellules avoisinantes, donnant les nécroses visibles sur les organes infectés (Kharadi et al, 2021). Les cellules attaquées libèrent leur contenu cytoplasmique qui est utilisé par la bactérie pour se multiplier. Ce mode d'action classe *Ea* dans la catégorie des bactéries nécrogènes. Dans le même temps, des exsudats se forment et sont émis par les ouvertures naturelles. Ces exsudats sont la source d'un inoculum secondaire qui permet la dissémination d'*Ea* d'arbres en arbres (Thomson, 2000 - **Figure 6**). *Ea* peut survivre jusqu'à 14 jours sur l'abdomen d'insectes pollinisateurs comme *Apis mellifera* et ces dernières peuvent transmettre la maladie jusqu'à 10 jours après avoir été exposées (Choi et al, 2022). La propagation de la bactérie peut se faire dans l'arbre entier, entraînant la mort de ce dernier (Thomson, 2000).

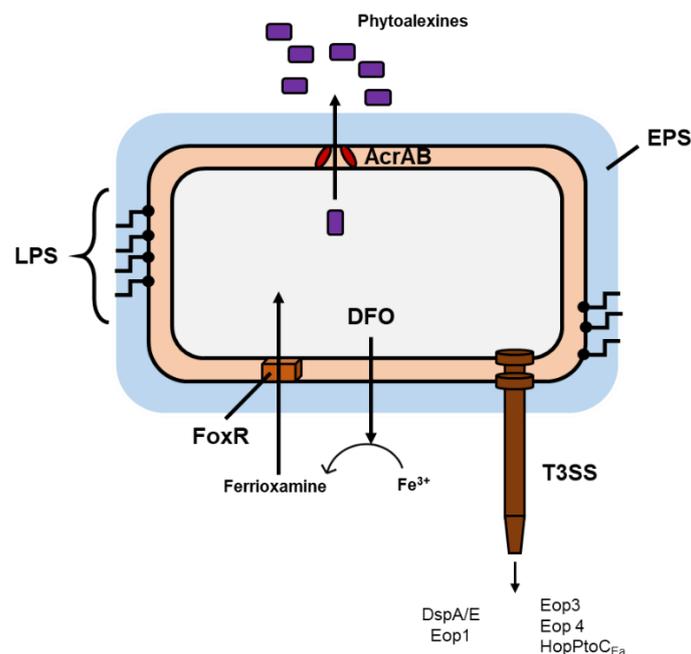


**Figure 6 : Cycle de reproduction et d'infection par *Ea* chez le pommier.** Lorsque les conditions sont favorables au printemps, la bactérie entre par les ouvertures naturelles de la plante, produit des exsudats et ressort par les ouvertures sous formes d'oozes. Ces oozes sont ensuite transmis à d'autres arbres *via* des insectes, la pluie ou le vent. La propagation de la bactérie dans l'arbre peut à terme aboutir à la mort de ce dernier.

1.2.2.2. Facteurs de virulence d'*Ea*

Le pouvoir pathogène d'*Ea* est déterminé par deux principaux facteurs de virulence : son système de sécrétion de type III (T3SS) ainsi que l'EPS présent sur la surface de la bactérie (Vrancken et al, 2013).

Le T3SS est un complexe transmembranaire présent chez la majorité des bactéries Gram négatives et qui injecte dans les cellules de son hôte des effecteurs de virulence qui vont modifier les fonctions cellulaires et les exploiter afin de se multiplier (Büttner et He, 2009). Chez *Ea*, le T3SS est majoritairement composé de protéines Hrp codées par des gènes *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) et de protéines Hrc codées par des gènes *hrc* (hrp-conserved) (Vrancken et al, 2013 – **Figure 7**). Les 34 gènes codant les composants du système T3SS ainsi que les protéines sécrétées par ce système sont rassemblées dans un cluster appelé *hrp/dsp* (Oh et Beer, 2005).



**Figure 7 : Schéma représentant les différents facteurs de virulence d'*Ea*.** LPS sont les lypopolysaccharides, EPS sont les exopolysaccharides, T3SS est le système de sécrétion de type III, DFO sont les desferrioxamines cycliques, FoxR est un récepteur absorbant la ferrioxamine, AcrAB est une pompe à efflux expulsant les phytoalexines.

La régulation de ce cluster se fait à plusieurs niveaux : HrpL est une protéine régulant l'expression des autres gènes du cluster *hrp* (Wei et Beer, 1995). L'expression de HrpL est contrôlée par d'autres protéines appelées HrpS et un complexe de deux autres protéines HrpX et HrpY (Wei et al, 2000). L'expression de l'ensemble de ces régulateurs est contrôlée par l'environnement extérieur, acide et pauvre en nutriments (Wei et al, 1992). En plus d'être un régulateur du cluster *hrp*, HrpL régule également négativement l'expression du système flagellaire de la bactérie (Cesbron et al, 2006).

Parmi les protéines sécrétées par le T3SS d'*Ea*, on trouve :

- 5 effecteurs de virulence : DspA/E, Eop1, Eop3, Eop4 et HopPtoC<sub>Ea</sub>.

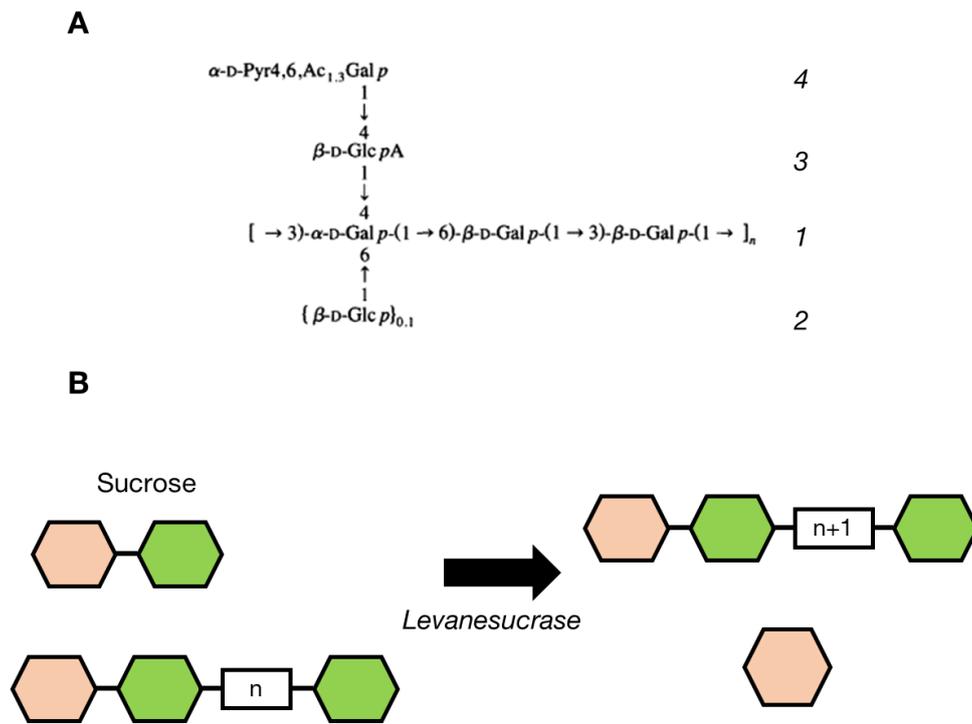
DspA/E est le principal effecteur de virulence d'*Ea* et est membre de la super famille des effecteurs AvrE. Le gène codant l'effecteur DspA/E se situe dans la région *hrp* du génome d'*Ea* (Oh et Beer, 2005). Chez le pommier, DspA/E inhibe la réponse de la voie de l'acide salicylique en empêchant le dépôt de callose (DebRoy et al, 2004). L'absence de DspA/E aboutit à une absence de symptômes et de multiplication bactérienne (Bogdanove et al, 1998). Chez d'autres agents pathogènes, on trouve également des homologues à DspA/E. Chez *P. syringae*, AvrE1 (qui possède 23% d'homologie de séquence avec DspA/E) inhibe aussi la réponse de la voie de l'acide salicylique en empêchant le dépôt de callose et en empêchant le transport de vésicules. En interagissant avec HopM1, cet effecteur permet l'imprégnation d'eau dans les membranes et favorise ainsi la multiplication bactérienne dans les organes infectés (Degrave et al, 2015 ; Xin et al, 2015). Permettant la propagation de la bactérie au sein des variétés de pommiers cultivées, cet effecteur peut être un effecteur d'avirulence lorsqu'*Ea* infecte certaines variétés de pommiers ornementaux ou de pommiers sauvages (Peil et al, 2021, voir plus loin, dans la partie 1.3.3.).

- 2 harpines, HrpN et HrpW. HrpN participe à la translocation de DspA/E dans les cellules infectées (Bocsanczy et al, 2008). Le rôle de HrpW lors des infections du pommier n'est pas encore bien connue (Bourreau et al, 2011).
- 3 protéines de structure, HrpA, TraF et FlgL, (Nissinen et al, 2007).

Le second effecteur principal de virulence d'*Ea* est l'EPS. L'EPS est un élément essentiel à la pathogénicité d'*Ea* et la quantité d'EPS produit est corrélée à son degré de virulence (Ayers et al, 1979). On peut distinguer deux composants pour l'EPS d'*Ea*, l'amylovorane et le levane (Kharadi et al, 2021). L'amylovorane, le composant majoritaire de l'EPS, est un polysaccharide dont la sous-unité élémentaire est la répétition d'un  $\beta$ 1-3 tri-galactoside ramifié par un glucose en  $\beta$ 1-6 et à un acide glucuronique suivi d'un pyruvate galactose en  $\beta$ 1-4 du premier galactoside (**Figure 8** - Nimtz et al, 1996). Sa synthèse est contrôlée par un opéron de 12 gènes, appelé *ams* (Bugert et Geider, 1995). En présence de sucrose extracellulaire, *Ea* synthétise la levanesucrase qui clive le disaccharide en glucose et fructose. Le fructose résiduel est associé à la molécule de sucrose flanquée des autres molécules de fructose clivé au préalable par la levanesucrase, formant le levane (**Figure 8** - Geider, 2006). Les souches déficientes dans la synthèse de levanesucrase perdent de leur virulence mais réussissent tout de même à infecter les tissus (Geier et Geider, 1993), au contraire des souches ne pouvant pas synthétiser d'amylovorane qui sont capables de provoquer la mort cellulaire à l'endroit où elles ont été infiltrées mais qui perdent leur capacité de progression systémique (Steinberger et Beer, 1988 ; Bernhard et al, 1993 ; Bogs et al, 1998). L'amylovorane est donc un composé indispensable à la progression de la bactérie.

Chez *Ea*, l'EPS est présent sous deux formes : une portion capsulée, attachée à la membrane externe de la bactérie et une portion dite « libre » qui se trouve en périphérie de la bactérie (Geider, 2000 – **Figure 7**). Il est démontré que l'EPS d'*Ea* est impliqué dans la formation de biofilm permettant aux bactéries

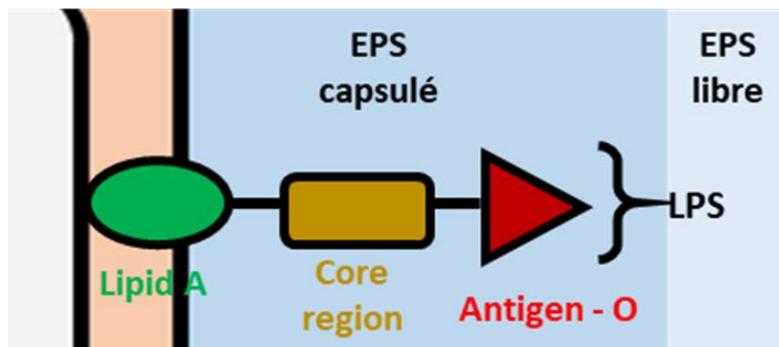
de communiquer avec d'autres organismes ou de se protéger contre les menaces extérieures (Sutherland, 2001 ; Koczan et al, 2009).



**Figure 8 : Représentation des différents constituants de l'amylovorane et du levane. (A)** L'amylovorane est composé d'une répétition de  $\beta$ 1-3 tri-galactoside (1) associé à un glucose en  $\beta$ 1-6 (2) et à un acide glucuronique (3) lui-même associé à un pyruvate galactose en  $\beta$ 1-4 (4) (Nimtz et al, 1996). **(B)** Action de la levanesucrase pour former le levane à partir d'une molécule de saccharose. Les hexagones roses représentent des molécules de glucose et les hexagones verts représentent des molécules de fructose.

On trouve également d'autres facteurs de virulence chez *Ea*. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des glycolipides, composants principaux des membranes externes des bactéries Gram négatives (Alexander et Rietschel, 2001 - **Figure 7**). La composition des LPS bactériens varient selon les espèces mais leur structure est relativement conservée (Alexander et Rietschel, 2001 ; Lerouge et Vanderleyden, 2002). On peut les diviser en trois parties : une première partie phospholipidique intégrée à la membrane d'*Ea* appelée Lipid A, reliant une seconde région centrale nommée la « core » région (Alexander et Rietschel, 2001). La « core » région des LPS peut être divisée en une partie interne composée d'unités d'acide 2-keto-3-deoxyoctulosonique (Kdo), essentielles à la structure des LPS, et d'une partie externe plus variable selon les LPS, composés d'hexoses comme le glucose, le galactose ou le N-acetylglucosamine (**Figure 9** - Holst et al, 1996 ; Alexander et Rietschel, 2001). Enfin la partie la plus périphérique des LPS bactériens est un antigène-O composé d'une chaîne de polysaccharides (Alexander et Rietschel, 2001). Une mutation dans le gène *waaL*, participant à la synthèse des LPS chez *Ea* entraîne une baisse de virulence de la bactérie (Berry et al, 2009). Dans la même étude, les

bactéries portant cette même mutation résistent moins bien au peroxyde d'hydrogène, une molécule produite par le pommier lors du stress oxydatif, un mécanisme de défense mis en place pour se défendre contre *Ea* après la reconnaissance de cette dernière (Venisse et al, 2001).



**Figure 9 : Représentation schématique des lipopolysaccharides (LPS) et des exopolysaccharides (EPS) chez *Ea*.** La core région du LPS est relié au lipide A transmembranaire et à l'antigène O.

Des effecteurs d'agressivité sont également impliqués dans la pathogénicité d'*Ea*. En particulier, l'acquisition de fer est indispensable pour la croissance et la multiplication des bactéries (Dellagi et al, 1998) et dans des conditions pauvres en fer, *Ea* peut synthétiser des sidérophores de type hydroxamate. Ces sidérophores sont caractérisés par des desferrioxamines cycliques (DFO), qui s'associent aux ions  $Fe^{3+}$  pour former un complexe, la ferrioxamine, qui est ensuite absorbée par la bactérie *via* un récepteur de 70 kDa, FoxR (Kachadourian et al, 1996 – **Figure 7**). Les mutants ne pouvant pas synthétiser de DFOs ou FoxR sont moins agressifs que les souches sauvages, mais induisent tout de même des symptômes sur semis de pommier. En plus d'être un système d'acquisition du fer, les DFOs participent aussi à la protection de la bactérie contre le burst oxydatif, en inhibant la synthèse du radical hydroxyle  $OH^\bullet$ , intervenant dans le burst oxydatif ciblant la bactérie suite à l'action de HrpN (Dellagi et al, 1998). Afin de se protéger de certaines enzymes libérées par son hôte, *Ea* peut également produire des protéases comme PrtA, une protéine contenant du zinc qui est synthétisée *via* le système de sécrétion de type I d'*Ea* (**Figure 7**). L'absence de cette protéase réduit la vitesse de prolifération de la bactérie dans son hôte (Zhang et al, 1999). A l'instar de la libération dans l'espace extracellulaire de protéases, *Ea* peut aussi grâce à la pompe à efflux AcrAB, expulser des phytoalexines produites par le pommier (voir partie 1.3.3. de l'introduction) pour se défendre contre la réaction de la plante à l'infection (**Figure 7** - Burse et al, 2004).

### 1.3. Mécanismes de défenses du pommier contre le puceron cendré et le feu bactérien et moyens de lutte associés

Avant d'entrer dans les détails des mécanismes de défenses du pommier contre *Ea* et *Dp*, je voulais faire un bref rappel sur l'immunité végétale en général, afin d'explicitier les mécanismes qui seront évoqués dans les parties propres aux deux bioagresseurs du pommier.

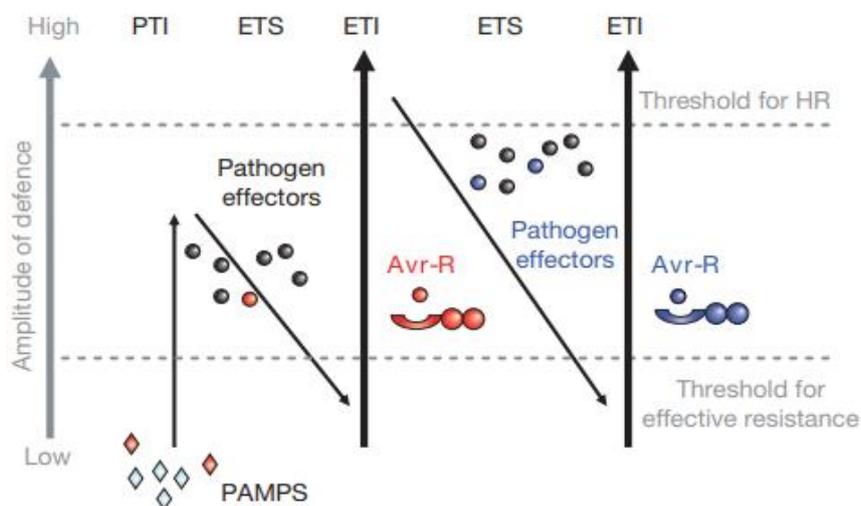
#### 1.3.1. Mécanismes de défenses des plantes contre les bioagresseurs

Lors de l'attaque d'une plante par un bioagresseur, les deux protagonistes mettent en place un dialogue où la plante va répondre aux attaques du bioagresseur en mettant en place des mécanismes de défense et où le bioagresseur va répondre à ces potentielles défenses. Dans le cas où la plante réussit à mettre en place une résistance efficace contre l'ensemble des isolats d'un bioagresseur, sans l'apparition de symptômes, on parle d'une résistance non hôte (Mysore et Ryu, 2004).

A l'inverse, on parle de résistance hôte lorsque certains membres d'une espèce végétale sensible à un bioagresseur arrivent à mettre en place une résistance efficace contre certains isolats de ce bioagresseur. Au sein de la résistance hôte, on distingue les relations compatibles (plante avec un phénotype associé à une résistance partielle) des relations incompatibles (plantes avec un phénotype associé à une résistance dite complète) (Mysore et Ruy, 2004).

Lors de la résistance hôte, le premier niveau de défense est constitué d'une barrière physique telle que la cuticule des feuilles épaisse ou la paroi (Serrano et al, 2014). On peut également trouver des composés anti-microbiens préformés prêt à interagir avec les bioagresseurs : les phytoanticipines (Pedras et Yaya, 2015). Si le bioagresseur réussit à contourner ce premier niveau de défense, les défenses mis en place par la plante peuvent être résumées par le modèle en zig-zag de Jones et Dangl (2006 – **Figure 10**). La Pattern-Triggered Immunity (PTI) se met en place soit par la reconnaissance de certains composés génériques du bioagresseur regroupés sous le nom de PAMPs (pour Pathogen-Associated Molecular Pattern), soit par la reconnaissance de produits végétaux issus de la dégradation causée par le bioagresseur, regroupés sous le nom de Damage-Associated Molecular Pattern (DAMPs) (Jones et Dangl, 2006 - **Figure 10**). Les PAMPs sont des composés que l'on retrouve en général chez tous les bioagresseurs des plantes, mais qui sont absents chez les plantes, comme les LPS bactériens, composants essentiels des bactéries Gram négatives ou la chitine, composant de la paroi des champignons (Silipo et al, 2010 ; Elieh Ali Komi et al, 2018). Les DAMPs sont majoritairement des composants de la matrice extracellulaires ou des polypeptides produits en réponse à des destructions physiques dues à l'attaque du bioagresseur (Choi et Klessig, 2016). La PTI peut être suffisante pour conférer une résistance à la plante mais elle peut également être contournée par ce dernier, qui peut être insensible aux composés de défenses produits, ou parce qu'il possède ou acquiert avec le temps des effecteurs qui lui permettent de la contourner (Jones et Dangl, 2006). On parle alors d'Effector-Triggered Susceptibility (ETS).

Dans certains cas, la plante possède un autre niveau de défense, appelée ETI (Effector-Triggered Immunity – **Figure 10**). L’ETI consiste en la reconnaissance entre le produit d’un gène de la plante dit de résistance (et responsable d’une résistance « qualitative » abordée en introduction générale), et le produit d’un gène du bioagresseur dit d’avirulence (Flor, 1971). Parmi les gènes de résistance, la majorité code pour des récepteurs NBS-LRR (DeYoung et Innes, 2006). Cette relation appelée « gène pour gène » déclenche une réponse immunitaire rapide et intense, appelée réaction hypersensible (HR), entraînant la mort programmée de la cellule infectée ainsi que des quelques cellules alentours, pour éviter toute propagation du bioagresseur. Le déclenchement d’une HR correspond à la relation incompatible décrite ci-dessus. Comme avec la PTI, le bioagresseur peut posséder ou acquérir avec le temps des effecteurs entraînant le contournement de l’ETI (Jones et Dangl, 2006 – **Figure 10**).



**Figure 10 : Modèle en zig-zag présenté par Jones et Dangl (2006) pour résumer les interactions entre un bioagresseur et la plante lors de la mise en place des défenses.** Après la reconnaissance des PAMPS, la plante se défend en mettant en place la PTI. Ces mécanismes de défenses quantitatifs peuvent être contournés par le bioagresseur du fait de l’acquisition de nouveaux effecteurs, rendant la plante à nouveau susceptible (ETS). Dans certains cas, avec la reconnaissance d’une protéine d’avirulence (Avr) du bioagresseur par un gène R de résistance de la plante, cette dernière peut se défendre avec la mise en place de l’ETI. L’ETI peut dans certains cas être contournée par le bioagresseur du fait de l’acquisition de nouveaux effecteurs. Schéma de Jones et Dangl, (2006).

En absence de HR, la plante met en place une défense dite quantitative, avec le déclenchement de plusieurs voies de signalisation *via* la synthèse de phytohormones, comme l’acide salicylique, l’éthylène ou l’acide jasmonique (Checker et al, 2018) grâce à la reconnaissance de DAMPs, de PAMPs ou d’effecteurs d’avirulence, comme décrit plus haut. Ces voies de signalisation permettent de transmettre aux cellules voisines, voire à l’ensemble de la plante, des signaux traduisant l’attaque par le bioagresseur et ainsi la nécessité de synthétiser certains composés de défenses pour contrer l’infection (Glazebrook, 2005) comme les espèces réactives de l’oxygène (ROS), des pathogenesis-related (PR) protéines ou des

métabolites secondaires comme les phytoalexines, les terpénoïdes ou les phénylpropanoïdes (Linthorst et Van Loon, 1991 ; Lamb et Dixon, 1997 ; Zaynab et al, 2018). Les gènes impliqués dans la défense quantitative peuvent être multiples et ne sont toujours pas localisés avec précisions sur le génome. On ne connaît parfois pas les gènes impliqués dans cette défense mais plutôt la (ou les) zone(s) génomique(s) expliquant cette résistance. On appelle ces zones les Quantitative Trait Loci (ou QTL). Un QTL explique rarement l'ensemble de la résistance observée contre un individu, mais seulement une partie (Roux et al, 2014).

### **1.3.2. Aménagement du verger et mécanismes de défenses du pommier contre le puceron cendré**

La majorité des variétés de pommiers cultivés sont sensibles ou au mieux tolérantes aux infestations de puceron cendré (Alhmedi et al, 2022). Le moyen principal de lutte contre *Dp* reste le recours aux traitements insecticides avant la floraison pour tuer les œufs, suivi d'un autre traitement après la floraison ou au début de l'été pour éliminer les individus émergents. Des traitements supplémentaires pendant l'automne avec du pirimicarb ou de la pyrethrin, en association avec la kaolin, permettent également de réduire la pression. La kaolin est une poudre d'argile blanche, utilisée initialement pour protéger les fruits contre les UVs (Wyss et Daniel, 2004 ; Cross et al, 2007). Cependant, l'usage intensif de certains de ces insecticides peut impacter des insectes non ravageurs des cultures (Wyss et Daniel, 2004), ou entraîner des résistances chez les pucerons (Delorme et al, 1997). La réglementation sur la réduction voire l'interdiction (néonicotinoïdes) du recours aux insecticides, dont ceux contre le puceron cendré (Plans Ecophyto successifs), contraint les arboriculteurs et les chercheurs à trouver des alternatives.

Des études menées en conditions semi-contrôlées montrent que l'application de phosphanate de potassium, déjà utilisé dans la lutte contre *Phytophthora* ou contre le mildiou chez la vigne ou les Crucifères, permet aussi d'avoir un effet biocide sur *Dp* mais à un niveau inférieur à celui d'un insecticide classique (Gaucher et al, 2022b). L'application d'ASM en conditions contrôlées confère quant à elle une résistance à la variété sensible 'Golden Delicious' vis-à-vis de *Dp*, en réduisant le nombre de nymphes passant à l'âge adulte (Warneys et al, 2018). Le traitement à l'ASM induit l'expression de plusieurs gènes dont 3 gènes produisant des COVs, parmi lesquels on retrouve l'(E,E)- $\alpha$ -farnesene, un COV à effet répulsif sur les *gynopares*. Les auteurs de cette étude ont également émis l'hypothèse que les MdAGGs, la famille de protéines mentionnée au tout début de l'introduction et induite également par l'ASM, pourraient être impliquées dans la résistance contre *Dp* avançant comme argument l'implication de certaines lectines dans la résistance contre les pucerons dans d'autres études (voir plus loin, partie 2.3.4.).

La plantation de bandes fleuries entre les rangs du verger, ou de haies autour du verger, permettent par ailleurs d'accueillir des ennemis naturels du puceron cendré et sont donc également des solutions

étudiées (Cahenzli et al, 2019). La défoliation automnale est encore une solution envisagée pour réduire la pression du puceron cendré dans les vergers. En effet, la défoliation permet de réduire le vol retour des *gynopares* vers le pommier et d'y pondre leurs œufs (Hoehn et al, 2003). Cependant, cette technique n'est réellement efficace que pour les variétés de pommiers précoces. Par exemple, la récolte de la variété 'Pink Lady', considérée comme une variété tardive, commençant vers la fin du mois d'octobre, une défoliation fin septembre pour cette variété n'est donc pas possible même si elle est ultrasensible à *Dp* (Alhmedi et al, 2022).

La création ou la culture de variétés résistantes aux pucerons peut également être une alternative, même si celle-ci est longue et coûteuse. Une étude publiée par Alston et Briggs (1970) a identifié un QTL de résistance au puceron cendré chez *Malus robusta*, entraînant une HR lors du nourrissage. Des travaux menés par Qubbaj et al, (2005), ont montré que la variété 'Florina' était tolérante, voire résistante. En comparant l'expression de son génome avec celui de la variété sensible 'Topaz', ils ont montré que 21 gènes chez 'Florina' étaient surexprimés suite à l'infestation par le puceron cendré. Parmi eux, on trouve des gènes codant des protéines impliquées dans la transduction des voies de défense : un ADP-ribosylation factor et une phosphatase permettant la libération d'inositol. Chez la même variété, Dall'Agata et al (2018) ont identifié 4 gènes présents dans la région *Dp\_fl* du groupe de liaison LG8. Ces 4 gènes codent : 1) un récepteur appartenant à la famille des phosphoribosyle transférase, qui participe à la communication entre cellules ; 2) une protéine intracellulaire à domaine PB1, qui interagit avec d'autres protéines pour déclencher des voies de signalisations intercellulaires ; 3) une protéase impliquée dans le réseau des voies de sécrétions *via* l'appareil de Golgi, chez *A. thaliana*, une protéine ayant une structure similaire participe à la résistance à des stress biotiques et abiotiques ; 4) une protéine à domaine phosphoinositide, participant à la libération d'inositol. Après l'alignement de la séquence du gène identifié chez Qubbaj et al (2005) et chez Dall'Agata et al (2018), les deux gènes codant une protéine à domaine phosphoinositide ne sont pas les mêmes.

### 1.3.3. Mécanismes de défenses du pommier contre le feu bactérien

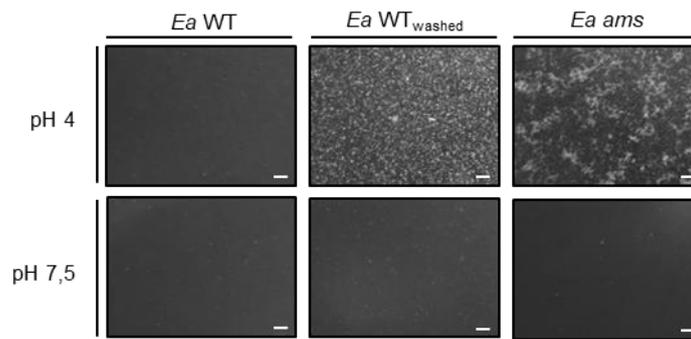
La majorité des variétés de pommiers cultivées dans le monde sont sensibles au feu bactérien (<http://www.wapa-association.org/>) et il n'existe aucun moyen de lutte efficace contre cette maladie. Des coupes de branches infectées avec un nettoyage des outils de taille peuvent néanmoins limiter la propagation de la maladie au sein d'un verger lorsque celui-ci est touché. Certains pays comme les Etats-Unis utilisent en préventif un antibiotique, la streptomycine pour lutter contre la maladie, mais son utilisation entraîne l'apparition rapide de résistance (Jones et Schnabel, 2000) et l'utilisation d'antibiotiques sur des cultures est par ailleurs interdite en Europe (Emeriewen et al, 2019). L'utilisation de bactériophages, des virus se multipliant à l'intérieur de bactéries puis libérant des virions infectant d'autres bactéries (Klumpp et al, 2023) est également testée pour lutter contre le feu bactérien. Malgré

des résultats *in vitro* plutôt convaincants, les essais *in planta* en serre ou en vergers sont plus contrastés à cause de la dose du cocktail et du moment de l'application des bactériophages, limitant encore l'utilisation de ces microorganismes (Gayder et al, 2023).

Plusieurs QTLs de résistance au feu bactérien ont par ailleurs été décrits dans la littérature, mais souvent chez des espèces sauvages. Ainsi, un QTL chez le cultivar 'Evereste', dont un des parents est un *Malus* sauvage, expliquant jusqu'à 70% de la résistance au feu bactérien, a été décrit par Durel et al, (2009). Des études approfondies menées par Parravicini et al, (2011) ont montré qu'au sein de ce QTL, on trouvait un gène codant pour une protéine NBS-LRR et plusieurs gènes codant pour des serine/threonine kinases, deux types de protéines participant à la reconnaissance de la présence d'agents pathogènes entraînant le déclenchement de la HR (Kruijt et al, 2005). Un autre QTL découvert chez *Malus robusta* par Peil et al, (2007), peut expliquer jusqu'à 80% de la résistance au feu bactérien. Des études complémentaires ont montré que la résistance au feu bactérien associée à ce QTL est due en partie à un gène codant une protéine NBS-LRR qui lorsqu'elle s'associe avec l'effecteur de virulence DspA/E (anciennement AvrRpt<sub>2EA</sub>) d'*Ea* (qui est considéré dans cet interaction comme un effecteur d'avirulence), déclenche une HR (Fahrentrapp et al, 2013 ; Brogini et al, 2014). Un QTL expliquant 40% de la résistance à *Ea* chez la variété 'Fiesta' a également été décrit par Calenge et al, (2005). L'insertion chez la variété sensible 'Pinovar' du gène *MAL0045*, présent au sein du QTL *Mfu10* de *Malus fusca*, confère à cette variété une résistance au feu bactérien (Emeriewen et al, 2021). Ce gène code pour une protéine receptor-like kinase contenant un domaine lectine, un domaine catalytique serine/threonine kinase et un domaine récepteur associé aux kinases interleukine-1 (Emeriewen et al, 2018). La majorité des QTL décrits jusqu'ici semblent donc être expliqués par des gènes de résistance reconnaissant la présence de l'agent pathogène, cependant ces gènes sont souvent déjà contournés par la bactérie. En effet le QTL décrit par Peil et al, (2007) chez *Malus robusta* est contournée par certaines souches d'*Ea* ayant une délétion dans la séquence de l'effecteur AvrRpt<sub>2EA</sub> (Vogt et al, 2013). De même, le QTL *Mfu10* est contourné en partie par une souche canadienne virulente E2002A (Emeriewen et al, 2015). Du fait de ces contournements fréquents, il apparaît important pour améliorer la résistance, notamment au feu bactérien, de s'intéresser à d'autres types de gènes que des gènes de résistance, tels que des gènes de défenses.

Après la détection de l'attaque par *Ea*, le pommier peut déclencher des voies de défenses fortes et durables dans l'ensemble de la plante. Dugé de Bernonville et al, (2012) a démontré que l'infection par *Ea* induit l'expression de gènes de défenses dans la voie de signalisation de l'acide salicylique chez le cultivar résistant 'Evereste' et chez la variété sensible 'MM106'. D'autres études ont montré que certaines PR protéines étaient accumulées dans les tissus 24 à 48 heures après l'infection par *Ea*, comme *PR2*, *PR5* et *PR8* chez la variété sensible 'Gala' (Bonasera et al, 2006). Deux autres exemples montrent qu'après un traitement à l'ASM, certaines protéines PR sont aussi induites par rapport à un témoin traité à l'eau. Acimovic et al, (2015) a ainsi montré que l'injection d'ASM dans des troncs de pommiers de la variété 'Jonathan' induit l'expression de *PR1*, *PR2* et *PR8*. L'application d'ASM sur des semis de

pommier de la variété ‘Golden Delicious’ induit quant à elle l’expression et l’accumulation des protéines *PR2* et *PR10* (Chavonet et al, 2022). Dans ces deux cas, l’application d’ASM est associée à une résistance partielle des variétés au feu bactérien. En plus d’accumuler *PR2* et *PR10*, l’ASM permet l’expression et l’accumulation d’une autre famille de protéines, les MdAGGs. Chavonet et al, (2022) a montré qu’il existait une relation entre la présence de ces protéines et la résistance au feu bactérien de semis de pommiers traités à l’ASM. Dans la même étude, des expérimentations *in vitro* ont mis en évidence que la protéine MdAGG10 purifiée mise au contact de souches d’*Ea* dépourvues d’EPS et placée dans des conditions acides s’avère agglutiner les cellules bactériennes (**Figure 11**). Un facteur appelé « maline », agglutinant les souches d’*Ea* dépourvues d’EPS, avait également été identifié chez *Malus sylvestris X ranetka* et chez la variété ‘Red Delicious’ par Romeiro et al, (1981a ; b). Cette maline se liait spécifiquement aux LPS bactériens, suggérant un rôle protecteur de l’EPS. En effet, l’EPS recouvrant les LPS bactériens, sa présence empêche la maline de pouvoir se fixer aux LPS. Chavonet et al, (2022) suggère que cette maline découverte par Romeiro et al, (1981a ; b) était en réalité les MdAGGs.



**Figure 11 : Observations au microscope de l’interaction entre la souche CFBP1430 d’*Erwinia amylovora* (*Ea* WT), la même souche sans exopolysaccharides (EPS) libre (*Ea* WT<sub>washed</sub>) et la souche d’*E. amylovora* CFBP6089 ne pouvant pas synthétiser d’EPS (*Ea* *ams*) dans des conditions acides (pH 4) ou légèrement basique (pH 7,5) avec MdAGG10. L’échelle correspond à 200  $\mu$ m (Chavonet et al, 2022).**

Les gènes dépendant de la voie de signalisation de l’acide jasmonique sont eux réprimés par *Ea*, chez la variété sensible ‘MM106’, mais pas chez la variété résistante ‘Evereste’. Cependant, un traitement au méthyl-jasmonate confère à ‘MM106’ une résistance au feu bactérien (Dugé de Bernonville et al, 2012). Cette voie de signalisation semble donc être impliquée dans la défense contre le feu bactérien puisque induite chez certaines variétés résistantes et à l’inverse réprimée par *Ea* chez certaines variétés sensibles. La résistance de certaines variétés à *Ea* semble aussi faire intervenir des métabolites secondaires. Les pommiers possèdent des dihydrochalcones stockées dans leurs vacuoles (Dugé de Bernonville et al, 2010). Parmi eux, on trouve la phloridzine, qui peut être déglucosylée pour donner la phlorétine, qui peut ensuite être oxydée pour donner des composants à activité antimicrobienne. Des études ont montré que le cultivar résistant ‘Evereste’ a une capacité supérieure au cultivar sensible ‘MM106’, d’oxyder la

phlorétine en composés antimicrobiens (Gaucher et al, 2013). Des phytoalexines ont également été détectées dans la zone de tige intermédiaire entre parties saines et infectées de la variété 'Holsteiner Cox' suite à l'infection par *Ea* (Chizzali et al, 2012a ; b).

Des études récentes chez le pommier ont ainsi montré que les agglutinines, induites suite à l'application d'ASM, étaient associées à une résistance plus élevée à la fois au puceron cendré (Warneys et al, 2018) et au feu bactérien (Chavonet et al, 2022). Avant d'entrer plus en détails dans la description des agglutinines, je vais faire dans la partie suivante une présentation générale de cette grande famille de protéines que sont les lectines, auxquelles appartiennent les agglutinines, ainsi que de leurs divers rôles chez les plantes.

## 2. Généralités sur les lectines

### 2.1. Historique et définition des lectines

Depuis la découverte de la première lectine en 1888, la définition de cette famille a évolué. Les lectines sont des protéines pouvant se fixer de manière réversible et spécifique à des carbohydrates, grâce à, au moins un domaine non catalytique (Peumans et Van Damme, 1995). La première lectine à avoir été caractérisée est la ricine, une protéine aux propriétés hémagglutinantes (Stillmark, 1888). Les recherches ont d'abord été concentrées sur les propriétés agglutinantes des lectines en immunologie, jusqu'à ce que Goldstein définisse en 1980 les lectines comme « des protéines ou des glycoprotéines d'origines non immunogène se fixant à des carbohydrates et qui agglutinent des cellules ou les font précipiter ». Depuis cette définition, des lectines ont été découvertes dans l'ensemble du monde vivant, y compris chez l'Homme (Peumans et Van Damme, 1995). Aujourd'hui, des lectines ont démontré leur intérêt chez l'Homme dans la lutte contre certaines tumeurs, en réduisant leur croissance ou en réduisant l'inflammation causée par des blessures ou des microbes (Tsaneva et Van Damme, 2020). Dans la suite le focus sera fait sur les lectines du monde végétal. Il existe plusieurs moyens de classer les lectines, selon leur expression et leur localisation dans la cellule, selon la séquence de leur domaine lectine ou encore selon les caractéristiques de leurs sites de fixations.

### 2.2. Classification des lectines végétales

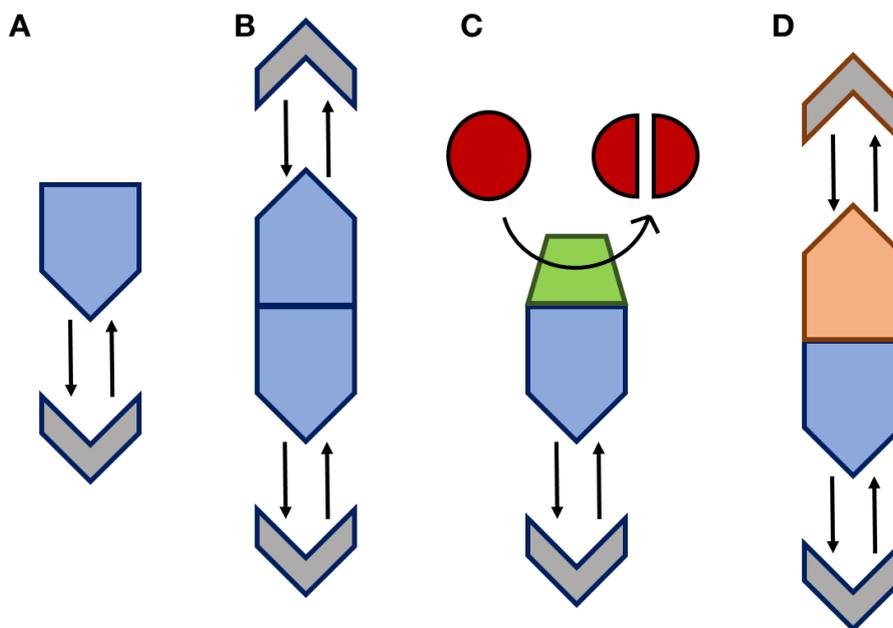
#### 2.2.1. Classification selon leur nombre de sites de fixation

Les lectines végétales peuvent être classées en 4 catégories quand on compare leur nombre de sites de fixation à des carbohydrates, et leurs spécificités (Peumans et Van Damme, 1995 ; Tsaneva et Van Damme, 2020 - **Figure 12**) :

- Les mérolectines sont des lectines qui ne possèdent qu'un seul site de fixation. Cette caractéristique les empêche donc *a priori* d'agglutiner des cellules. Cependant, certaines études

ont démontré que des mérolectines étaient en capacité d'agglutiner des cellules, comme par exemple l'hévéine (Rodriguez-Romero et al, 1991) ;

- Les hololectines sont des protéines possédant au minimum deux sites de fixation se fixant au même type de carbohydrate. Ces lectines représentent la majorité des lectines découvertes jusqu'ici (Peumans et Van Damme, 1995) ;
- Les chimérolectines sont des protéines possédant en plus d'un ou plusieurs sites de fixation à un carbohydrate, un domaine catalytique qui fonctionne indépendamment. Ces domaines peuvent être des domaines kinase ou phosphorylase par exemple (Bellande et al, 2017) C'est dans cette catégorie que sont classées les récepteurs à domaine lectine (cf. partie 2.3.2. de l'introduction) ;
- Les superlectines sont des lectines qui possèdent des sites de fixation reconnaissant des types de carbohydrates différents.



**Figure 12 : Représentation schématique des lectines selon le nombre et les spécificités de leur(s) site(s) de fixation.** (A) Une mérolectine ne possède qu'un seul site de fixation (zone bleue), se fixant de manière réversible au carbohydrate spécifique au site de fixation (zone grise). (B) Une hololectine possède deux sites de fixation, se fixant de manière réversible au même type de carbohydrate. (C) Une chimérolectine possède un site de fixation à un carbohydrate, mais également un domaine à activité catalytique (zone verte). (D) Une superlectine possède deux sites de fixation (zone bleue et zone orange), se fixant à deux types de carbohydrates différents.

### 2.2.2. Classification selon leur séquence nucléotidique

En analysant leurs séquences nucléotidiques, 12 familles de lectines végétales ont pu être identifiées à l'heure actuelle. Le nom de chaque famille est souvent donné selon l'espèce chez laquelle la protéine a été décrite pour la première fois.

La famille des Agaricus Bisporus Agglutinin (ABA) fut décrite la première fois chez l'espèce de champignon *Agaricus bisporus*. La protéine ABA possède 4 domaines protéiques identiques et deux sites de fixations, un se fixant au N-acétylglucosamine (GlcNac) et l'autre se fixant au N-acétylgalactosamine (GalNac) situés de part et d'autre de la protéine (Carrizo et al, 2005 ; Nakamura-Tsurata et al, 2006 ; Lannoo et Van Damme, 2010). Les sites de fixations des lectines analogues à ABA ont les mêmes caractéristiques qu'ABA (Peumans et al, 2007). Dépourvues de peptide signal, ces lectines sont synthétisées au niveau des ribosomes libres du cytoplasme des cellules (Van Damme et al, 2008). Ce type de lectines est très présent chez les champignons, mais on en trouve également chez les plantes primitives, comme chez *Marchantia polymorpha* (Peumans et al, 2007). Des transferts horizontaux sont suspectés être à l'origine de la présence d'ABA chez les plantes (Van Damme et al, 2008).

La première lectine appartenant à la famille des amaranthines a été décrite la première fois chez *Amaranthus caudatus* (Rinderle et al, 1989). L'amaranthine d'*A. caudatus* est une protéine de 66 kDa constituée de 2 domaines identiques avec deux sites de fixations pouvant se fixer au Gal $\beta$ 1-3GalNac (Rinderle et al, 1989). Cette famille de lectines est l'une des plus petites du royaume végétal en nombre de séquences identifiées (Dang et al, 2017). Les protéines à domaine amaranthine peuvent être des monomères, dimères ou trimères, parfois associés à d'autres domaines avec activités catalytiques, *i.e.* des chimérolectines. Les protéines à domaine amaranthine les plus fréquentes sont des lectines possédant deux domaines amaranthines, associées à un domaine à activité catalytique, comme un domaine aérollysine (Dang et al, 2017). Les amaranthines ne possèdent pas de peptide signal, elles sont donc synthétisées dans le cytoplasme (Lannoo et Van Damme, 2010).

La première lectine appartenant à la famille des chitinase-related agglutinins (CRA) a été décrite chez *Robinia pseudoaccacia*. Cette lectine possède 50% d'homologie de séquence avec les chitinases de classe V, mais elle ne possède pas d'activité chitinase (Van Damme et al, 2007a). La structure tridimensionnelle de cette protéine est homologue aux chitotriosidases humaines (Fussetti et al, 2002). Les chitotriosidases sont des enzymes capables de digérer la chitotriose, un composé à activité antioxydante (Chen et al, 2005). On trouve des chimérolectines possédant des domaines CRA avec une activité chitinases chez plusieurs Fabacées comme *Medicago truncatula* ou *Lotus japonicus* (Van Damme et al, 2008).

La première lectine possédant un domaine cyanovirine, nommé cyanovirin-N a été isolée chez la cyanobactérie *Nostoc elliposporum* (Boyd et al, 1997). La cyanovirin-N possède deux sites de liaison à des carbohydrates à l'opposé l'un de l'autre et pouvant interagir avec le mannobiose possédant une liaison  $\alpha$ -(1-2) (Bewley, 2001). Cette famille de lectines est en majorité présente chez les champignons, en particuliers les ascomycètes, chez les algues mais beaucoup moins chez les angiospermes et les gymnospermes. Les protéines de la famille des cyanovirines chez les plantes ont un peptide signal et un domaine C-terminal ajouté par rapport à la cyanovirin-N et aux autres protéines possédant un domaine cyanovirine présentes chez les bactéries et les champignons (Van Damme et al, 2008).

La famille des *Euonymus Europeus Lectin* (EUL) doit son nom à la lectine découverte chez *Euonymus europaeus* (Pacak et Kocourek, 1975). Cette lectine est un homodimère non glycosylé possédant deux sites de fixation se liant de préférence avec le Gal $\alpha$ 1-3-Gal ou le Gal $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4GlcNAc mais pouvant également se fixer à des glycosphingolipides ainsi que des entérocytes de type B (Petryniak et al, 1986 ; Teneberg et al, 2003). La majorité des lectines à domaine EUL ne possèdent pas de peptides signaux (Lannoo et Van Damme, 2010). Les protéines possédant un domaine EUL sont ubiquitaires dans le règne végétal (Fouquaert et al, 2008).

La lectine *Galanthus Nivalis Agglutinin* (GNA) a donné son nom à la famille des lectines possédant un domaine GNA. Découverte chez *Galanthus nivalis*, la GNA est un homotétramère possédant trois sites de fixation à des mannoses (Van Damme et al, 2008 ; Hester et al, 1995). Les protéines de cette famille peuvent être des mono, di ou tétramères (Van Damme et al, 2008). Les affinités avec des carbohydrates dépendent du nombre de domaines GNA dans la structure de ces protéines. Pour les protéines ne possédant qu'un seul domaine GNA, l'affinité avec le mannose est faible et plus importante avec les oligomannosides. A l'inverse, les protéines possédant 2 domaines GNA ont une plus grande affinité avec les complexes de glycanes type mannose (Van Damme et al, 2007b ; Van Damme et al, 2011). Le nombre de domaines GNA influe aussi sur le nombre de sites de fixations puisque toutes les protéines de la famille des GNA ne possèdent pas forcément trois sites de fixations (Barre et al, 1996). Les protéines de cette famille sont majoritairement des hololectines mais on trouve quelques exemples de chimérolectines chez certaines espèces de Brassicacées (Van Damme et al, 2008). Les protéines appartenant à la famille GNA sont exprimées dans la majorité du règne végétal (Fouquaert, 2008).

La première lectine avec un domaine hévéine a été caractérisée chez *Hevea brasiliensis* et est une petite protéine qui se fixe au GlcNAc ainsi qu'à la chitine (Asensio et al, 2000). Il existe une grande diversité de structures chez les protéines de cette famille, certaines ayant jusqu'à 7 domaines hévéines. On trouve dans cette famille des hololectines ainsi que des chimérolectines. Toutes les protéines avec domaine hévéine possèdent un peptide signal et sont donc synthétisées dans le réticulum endoplasmique (Van Damme et al, 2008).

La jacaline est une lectine qui a été extraite des graines d'*Artocarpus integrifolia* (Sastry et al, 1986). Les lectines de cette famille sont discriminées en groupe selon que leur unique site de fixation interagit avec du galactose ou du mannose (Van Damme et al, 2008). Cette famille de lectine est confinée à la famille des *Moraceae* et ces membres sont tous synthétisés dans le réticulum endoplasmique (Peumans et al, 2000 ; Van Damme et al, 2008). Pour les protéines se fixant au mannose, elles sont constituées de plusieurs domaines jacalines, pouvant aller jusqu'à des hexamères organisés en tandem. Le site de fixation chez les protéines homologues aux jacalines et se fixant au galactose est plus large, expliquant cette spécificité de ligand (Van Damme et al, 2008).

Les lectines des légumineuses sont la plus large famille de lectines en termes de séquences nucléotidiques trouvées. Le modèle de cette famille est la lectine Concanavalin A, extraite de *Canavalia ensiformis* (Ambrosi et al, 2005). La structure primaire, secondaire et tertiaire est assez conservée dans

l'ensemble de la famille. Cependant, il existe une grande variabilité de la structure quaternaire permettant aux lectines de légumineuses d'avoir un large spectre d'actions biologiques. Les domaines protéiques de cette famille s'associent en dimères ou en tétramères grâce à des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des ponts salins (Lagarda-Diaz et al, 2017). Ces lectines peuvent se lier à un large spectre de carbohydrates, allant des monos aux tetrasaccharides, même si elles ont une préférence moindre pour les monosaccharides (Ambrosi et al, 2005). A proximité du site de fixation, on trouve également des ions  $Ca^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ , qui sont indispensables à leur structure (Sharon et Lis, 1990).

Les lectines possédant un domaine avec un « Lysin Motif » (LysM) ont été découvertes en premier chez les bactéries mais on retrouve ce domaine chez le LysM receptor-like kinase des plantes (Carotenuto et al, 2017). Chez les plantes, les protéines possédant un domaine LysM interagissent avec des carbohydrates possédant un domaine GlcNAc sans pour autant avoir pour chacune d'elles une activité enzymatique associée à cette reconnaissance (Gust et al, 2012). Ces protéines peuvent être catégorisées en 4 sous familles, selon leur association avec des domaines kinases et leur localisation dans la cellule (Van Damme et al, 2008).

La première lectine de la famille des Nictaba provient des feuilles de *Nicotina tabacum*. Cette protéine a une forte affinité avec les trimères de GlcNAc mais pas avec les oligomères (Delporte et al, 2015). Les protéines contenant un domaine Nictaba sont trouvées chez différentes plantes comme *Arabidopsis thaliana* ou *Solanum lycopersicus* (Delporte et al, 2015).

La ricine est la première lectine à avoir été caractérisée par Stillmark en 1888. Cette protéine sert de modèle à la famille des ricines B, une des familles de lectines les plus répandues dans le monde végétal (Van Damme et al, 2008). La ricine est une chimérolectine ayant un domaine à activité enzymatique et un second domaine lectine (Barbieri et al, 1993). On trouve deux sites de fixations aux carbohydrates sur la ricine, se liant préférentiellement au galactose ou au GalNAc (Shibuya et al, 1987). Les protéines ayant des domaines de ricin-B dans leur séquence sont présentes chez les plantes mais aussi chez certains champignons et procaryotes (Van Damme et al, 2008).

Le **tableau 1** est un tableau récapitulatif des 12 familles de lectines végétales ainsi que leurs ligands préférentiels et leurs localisations chez les plantes.

Famille	Ligands préférentiels	Localisation dans la plante
ABA	GlcNac et GalNac	Cytoplasme et noyau
Amaranthine	Gal $\beta$ 1-3GalNac	Cytoplasme et noyau
CRA	Chitine	Vacuole et membrane
Cyanovirin-N	Mannobiose	Noyau
EUL	Gal $\alpha$ 1-3-Gal ou le Gal $\alpha$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4GlcNac	Cytoplasme et noyau
GNA	Oligomannosides ou N-glycans	Cytoplasme, noyau et vacuole
Hévéines	GalNac ou Chitine	Vacuole
Jacalines	Galactose ou Mannose	Cytoplasme, noyau et vacuole
Légumineuses	Diversité de saccharides allant des mono aux tetrasaccharides	Membrane, vacuole, noyau et cytoplasme
LysM	GlcNac	Membrane, vacuole, cytoplasme et noyau
Nictaba	Trimères de GlcNac	Cytoplasme et noyau
Ricines B	Galactose ou GalNac	Vacuole, noyau et cytoplasme

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des 12 familles de lectines, selon la séquence de leur domaine lectine.** ABA pour Agaricus Bisporus Agglutinin , CRA pour chitinase-related agglutinins, EUL pour Euonymus Europeus Lectin, GNA pour Galanthus Nivalis Agglutinin, GlcNac pour N-acétylglucosamine, GalNac pour N-acétylgalactosamine.

### 2.2.3. Classification selon leur localisation et leur caractère inductible

L'étude et la caractérisation des premières lectines se sont portées sur les lectines qui sont exprimées constitutivement en grande quantité et que l'on retrouve dans les organes de stockage des plantes comme les graines, les bulbes ou les rhizomes. On trouve également des lectines dans tous les autres organes végétatifs de la plante comme les racines, les tiges, les feuilles, ou encore dans les fleurs, mais en plus petites quantités (Tsaneva et Van Damme, 2020). Découvertes plus tardivement vers la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, d'autres lectines peuvent être synthétisées en grandes quantités sous l'action d'un stress. Cette opposition entre lectines constitutives et lectines inductibles est renforcée par le fait que la plupart des lectines constitutives sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique pour ensuite être envoyées dans les organes de stockage des plantes ou les vacuoles alors que les lectines inductibles, ne possédant pas de peptide signal, restent dans le compartiment nucléocytoplasmique de la cellule (Van Damme et al, 2008). C'est le cas par exemple pour 6 familles de lectines que l'on retrouve exclusivement dans le cytoplasme et / ou le noyau des cellules végétales : les lectines à domaines ABA, amaranthines, GNAs, les lectines à domaine EUL, les homologues de la jacaline, et les lectines à domaine nictaba (Lannoo et Van Damme, 2010). Le caractère inductible ou constitutif de l'expression de ces lectines est relié à leurs rôles très variés au sein de la plante.

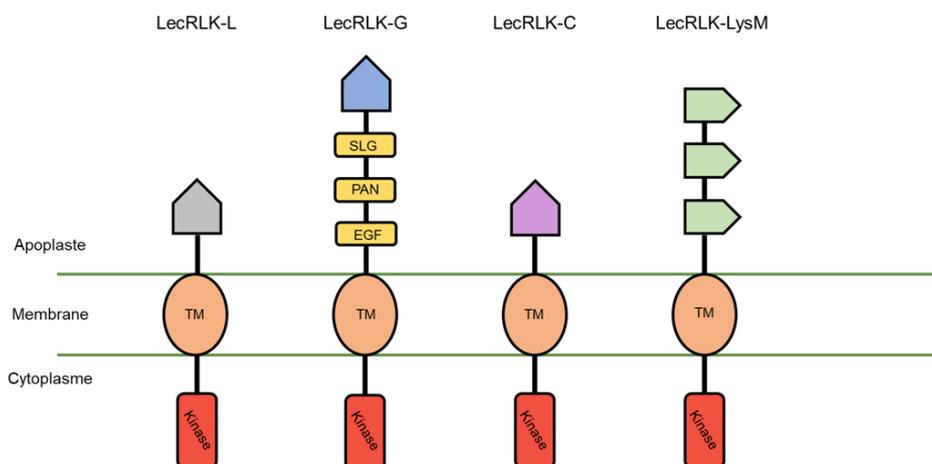
### 2.3. Rôle des lectines chez les plantes

#### 2.3.1. Protéines de stockage

On trouve des grandes quantités de lectines dans les tissus de stockage des plantes, comme les graines, les rhizomes, les bulbes, l'écorce des arbres ou les tubercules (Nsimba-Lubaki et Peumans, 1986 ; Van Damme et Peumans, 1990 ; Van Damme et al, 2008), ces quantités pouvant atteindre jusqu'à 40% des protéines totales (De Coninck et Van Damme, 2021). Ces protéines peuvent servir de stock d'acides aminés, qui seront réutilisés pour la synthèse d'autres protéines (Van Damme et al, 2008). La synthèse de ces protéines est dépendante du cycle de développement de la plante. En effet, chez *Galanthus nivalis* par exemple, la concentration des lectines est maximale au cours de la dormance puis diminue petit à petit, une fois que la plante croît et qu'elle fleurit. Après la floraison, la plante stocke de nouveaux des lectines au sein du bulbe (Van Damme et Peumans, 1990). Les écorces des arbres peuvent stocker des lectines pendant l'hiver, qui seront ensuite utilisées pendant le printemps et l'été comme source d'azote. Cependant, la cinétique de stockage et de déstockage de ces lectines dépend de chaque espèce (Wetzel et al, 1989).

#### 2.3.2. Senseurs de l'extérieur et communicants de l'intérieur

Les cellules végétales possèdent sur leur membrane des récepteurs leur permettant de percevoir les potentielles variations de l'environnement. Parmi ces récepteurs, il existe une famille nommée les receptor-like kinases (RLK) possédant un domaine lectine (LecRLK). De manière générale, ces chimérolectines sont composées d'un domaine lectine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine kinase intracellulaire (Sun et al, 2020). La famille des LecRLKs peut être divisée en quatre sous familles, selon le domaine lectine extracellulaire (**Figure 13**). Les LecRLKs de type L possèdent un domaine lectine extracellulaire appartenant au sous-groupe des lectines des légumineuses. Les LecRLKs de type G ont un domaine lectine extracellulaire ayant une affinité avec le  $\alpha$ -D mannose (Vaid et al, 2013). Le groupe des C-LecRLKs est le plus petit groupe des récepteurs LecRLKs chez les plantes (Sun et al, 2020). Son domaine lectine extracellulaire n'a pas encore été caractérisé mais on sait qu'il interagit avec des ions  $Ca^{2+}$  (Reidling et al, 2000). Enfin le dernier groupe de LecRLKs, les LecRLKs-LysM, possède un domaine lectine extracellulaire composé de 3 domaines LysM (Buendia et al, 2018). Les domaines transmembranaire et kinase cytoplasmique sont eux plus conservés au sein de la famille des LecRLKs (Sun et al, 2020). Le nombre de LecRLKs ainsi que la proportion de chaque groupe est différent selon les espèces végétales (Liu et al, 2023).



**Figure 13 : Schéma des 4 sous-groupes des Receptor-Like-Kinase (RLK) ayant un domaine extracellulaire lectine (Lec), donnant les LecRLKs.** Le domaine cytoplasmique kinase ainsi que le domaine transmembranaire (TM) sont conservés parmi les LecRLKs. Les domaines lectines se situent aux extrémités des structures présentes dans l'apoplaste, hormis pour les LecRLKs-LysM qui possèdent trois domaines lectines LysM. En plus de leur domaine lectine, la majorité des LecRLKs-G possèdent un domaine SLG (pour S-Locus glycoprotein), PAN (pour Plasminogen/apple/nematode) et un domaine EGF (pour Epidermal Growth Factor - Vaid et al, 2012 ; Vaid et al, 2013 ; Bellande et al, 2017).

Les récepteurs LecRLKs participent à la reconnaissance des DAMPs et PAMPs lors du déclenchement de la PTI. Chez *Arabidopsis thaliana*, une LecRLK de type G reconnaît le LPS de certaines *Pseudomonas* et *Xanthomonas*, en particuliers le lipide A des LPS et déclenche par la suite la PTI (Ranf et al, 2015). Les LecRLKs peuvent aussi participer aux différentes cascades d'inductions mises en place au cours de la PTI. Toujours chez *A. thaliana*, la reconnaissance de *Pseudomonas syringae* DC3000 active la transcription de LecRK-IX.2, une LecRLK de type L (Luo et al, 2017). La surexpression de cette lectine active la synthèse de ROS ainsi que l'accumulation d'acide salicylique, participant ainsi à la mise en place de la PTI. Les LecRLKs reconnaissant également ; 1) des PAMPs chez les champignons, comme les lectines AtLYK5 et AtCERK1 chez *A. thaliana*, formant un complexe reconnaissant la chitine et déclenchant la PTI (Cao et al, 2014) ; ou 2) des DAMPs provenant de l'attaque d'insectes, comme LecRK-I.8, une LecRLK de type L qui reconnaît certains composés d'œufs de *Pieris brassicae*, déclenchant la synthèse de PR-1 (Gouhier-Darimont et al, 2019). Certaines LecRLKs peuvent même déclencher une ETI avec HR lors de la reconnaissance d'une protéine d'avirulence. NbLRK1 est ainsi une LecRLK de *Nicotiana benthamiana* qui reconnaît l'élicite INF1 de *Phytophthora infestans* et déclenche de ce fait une HR (Kanzaki et al, 2008).

Les LecRLKs participent aussi à la signalisation de certains stress abiotiques comme des blessures, la sécheresse, les fortes températures ou des concentrations en sel trop importantes (Yu et al, 2018 ; Passricha et al, 2020 ; Woo et al, 2020). Enfin, les LecRLKs participent aussi à la germination de certaines graines ou à l'architecture de la plante, mais la caractérisation de leur implication dans le développement de la plante n'est pas encore résolue (Cheng et al, 2013 ; Sun et al, 2020).

Certaines lectines exprimées constitutivement et pouvant se fixer à l'ARN permettent par ailleurs le transport sur de longues distances d'ARNm *via* le phloème, comme par exemple des lectines présentes chez le melon, CmmLec17 (Gómez et al, 2004). Cette protéine transporte *via* le phloème, des ARNm non pathogènes pouvant intervenir dans la régulation du développement mais peut également transporter des ARN viraux (Pallas et Gomez, 2013).

### **2.3.3. Mise en place de symbioses racinaires**

Les plantes peuvent interagir avec des champignons et établir des relations symbiotiques permettant aux deux protagonistes des avantages partagés. Dans certains cas, des LecRLKs sont impliquées dans ces symbioses. Par exemple, la surexpression chez *A. thaliana* d'une LecRLK de type G chez les espèces du genre *Populus*, permet d'induire une symbiose avec *L. bicolor* (Labbé et al, 2019). Cette symbiose permet pour les deux membres une meilleure acquisition des nutriments et une meilleure défense face aux stress biotiques et abiotiques (Tedersoo et al, 2014). La mise en place de symbiose entre les plantes et les champignons du genre *Rhizobium* permet à la plante de s'enrichir en azote et aux champignons de récupérer certaines molécules issues de la photosynthèse. Le champignon va synthétiser des facteurs nod qui sont reconnus par la plante et permettent la mise en place de la symbiose (Perret et al, 2000). Chez certaines *Fabaceae*, la reconnaissance de ce facteur est fait par des LecRLKs à domaine LysM (Rey et al, 2013 ; Zhang et al, 2015).

### **2.3.4. Interaction directe avec les bioagresseurs**

En plus de participer à la perception de l'attaque de bioagresseurs (Bellande et al, 2017 ; Sun et al, 2020), les lectines peuvent aussi être des effecteurs finaux de la défense et avoir un impact direct sur la valeur adaptative (ou fitness) des bioagresseurs.

Différentes études ont démontré que les lectines peuvent interagir directement avec des insectes ravageurs (Vandenborre et al, 2011). Selon le mode d'attaque des insectes, la voie de signalisation impliquée est différente. En effet, si l'insecte attaque directement les parties aériennes comme les fleurs ou les feuilles, la voie de l'acide jasmonique et de l'éthylène va se mettre en place, alors que si l'insecte est un insecte piqueur suceur, c'est la voie de l'acide salicylique qui va être déclenchée (De Vos et al, 2005). Certaines lectines étant induites par l'une ou l'autre de ces phytohormones, les lectines impliquées dans les interactions avec les bioagresseurs peuvent donc être différentes selon le type d'insectes. Plusieurs études impliquant plusieurs familles de lectines ont déjà démontré leur impact direct contre des insectes ravageurs, appartenant à l'ordre des coléoptères, lépidoptères, diptères ou hémiptères (Vandenborre et al, 2011). Les modes d'action des lectines pour affecter les traits de vie des insectes sont multiples. Le tube digestif des insectes est recouvert d'une membrane péritrophique (PM), c'est-à-dire composé de chitines et de différents glycans (Hegedus et al, 2009), membrane qui est synthétisée en permanence et sert à contenir le sang pendant la digestion. Les lectines se trouvant dans les feuilles ou dans la sève circulant dans le phloème peuvent donc tout d'abord se fixer à la chitine ou

aux différents glycanes composant la PM et en modifier l'organisation, entraînant ainsi une diminution de l'appétence des insectes pour la sève ou les tissus foliaires considérés (Hopkins et Harper, 2001). Le changement de conformation du PM peut également entraîner chez certains insectes un passage des lectines dans le système circulatoire, et la présence de ces dernières dans l'hémolymphe peut avoir des conséquences systémiques comme une baisse de la fécondité chez l'insecte, jusqu'à entraîner la mort (Powell et al, 1998).

Les lectines peuvent aussi se fixer à des glycoprotéines permettant la digestion ou le transport de certains nutriments justement grâce à la présence de ces motifs de glycosylation. Certaines lectines peuvent se fixer à des  $\alpha$ -amylases se trouvant à l'intérieur du tube digestif (Macedo et al, 2007) ou à la ferritine, un transporteur du fer essentiel chez les insectes (Sadeghi et al, 2008). La fixation des lectines aux glycoprotéines dans le tube digestif des insectes entraîne la formation d'agglomérats qui empêchent l'insecte de digérer (Vandenborre et al, 2011).

Enfin, les lectines peuvent aussi interférer avec l'expression de certains gènes d'insectes. Après avoir consommé la Wheat Germ Agglutinin du blé, il a été démontré chez des larves de *Drosophila melanogaster* que l'expression de 61 gènes intervenant dans le métabolisme de la chitine, le métabolisme de l'énergie ou la synthèse d'enzymes digestives a été altérée (Li et al, 2009).

Les champignons possèdent sur leurs membranes plusieurs conjugués comprenant des carbohydrates, permettant leur interaction avec des lectines (Thevissen et al, 2003). Des études *in vitro* ont montré qu'une amaranthine provenant d'*Amaranthus viridis* avait un pouvoir antifongique permettant de réduire la croissance de plusieurs champignons comme *Fusarium oxysporum* ou *Botrytis cinerea* (Kaur et al, 2006). Chez le blé, PFT est une chimérolectine possédant deux domaines amaranthines ainsi qu'un domaine ETX/MTX2. La surexpression constitutive de cette dernière confère une résistance contre *Fusarium graminearum*. PFT reconnaît des carbohydrates sur la membrane de *F. graminearum* et le domaine ETX/MTX2 produirait des toxines qui formeraient des pores dans la membrane du champignon (Rawat et al, 2016). La surexpression de cette protéine chez *A. thaliana* lui confère une résistance à un large spectre de champignons pathogènes comme *F. graminearum*, *Colletotrichum higginsianum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, ou *Botrytis cinerea* (Singh et al, 2023).

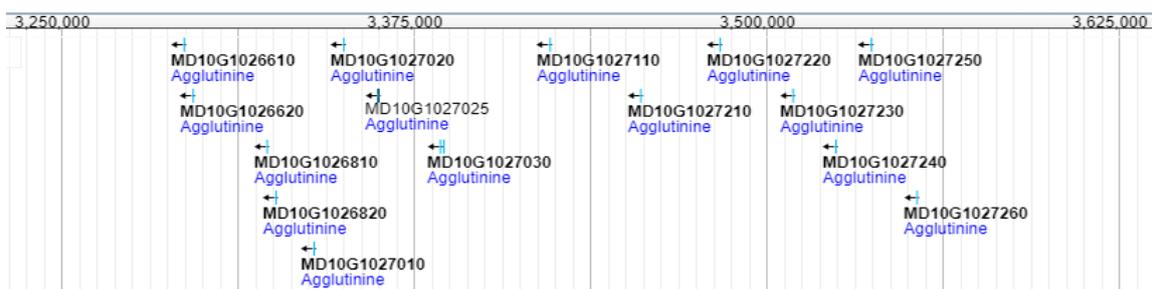
Certains virus arborent sur leurs membranes externes de nombreux dérivés glycosylés, molécules pouvant potentiellement interagir avec des lectines. Peu d'études portent sur l'interaction des lectines avec des virus des plantes. Yamaji et al, (2012) ont identifié une lectine à domaine jacaline, la JAX1, participant à la résistance au *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV), ainsi qu'à d'autres virus de la famille des potexvirus. La majorité des études portent sur les interactions entre des lectines de plantes et des virus humains, pour leurs propriétés antivirales contre le virus de l'immunodéficience humaine ou du virus responsable de l'hépatite C par exemple (Botos et al, 2002 ; Bertaux et al, 2007).

La membrane externe des bactéries Gram négative, zone d'interactions entre la bactérie et les autres organismes, est composée de dérivés possédant des glycans, permettant de possibles interactions avec des lectines. Les LPS des bactéries Gram négatives sont des effecteurs reconnus qui déclenchent l'immunité. Sur la paroi des bactéries Gram positives, des peptidoglycanes peuvent aussi être reconnus par le système de défense des plantes (Silipo et al, 2010). Certaines études ont déjà démontré que l'expression de lectines est associée à une résistance contre certaines maladies bactériennes : des essais menés par Ma et al, (2013) ont ainsi montré que, lors de la surexpression *in planta* chez le blé (*Triticum aestivum*) de Ta-JA1, une lectine appartenant à la famille des jacalines, des cellules de *Pseudomonas syringae* étaient agglutinées. Chez *Arabidopsis thaliana*, un traitement avec des peptidoglycanes issus de *Staphylococcus aureus* active des voies de signalisation associées à la défense comme l'augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca<sup>2+</sup>, ou la production de phytoalexines comme la camalexine, mais également la production de LecRLKs (Gust et al, 2007).

Comme présentée succinctement en début d'introduction, puis ci-avant pour leur rôle dans la résistance à *Dp* et *Ea*, les agglutinines du pommier ont été décrites pour la première fois par Warneys et al, (2018) lors de l'étude de l'induction de gènes de défense suite à un traitement à l'ASM. Je vais maintenant décrire plus en détail cette famille de lectines.

### 2.4. Présentation de la famille des agglutinines du pommier

Les agglutinines du pommier peuvent être scindées en deux groupes : Les monoagglutinines (MdAGGs) et les di-agglutinines (MdDiAGGs). Les MdAGGs sont une famille multigénique de 17 mérolectines appartenant à la famille des amaranthines. La plupart des *MdAGGs* (*MdAGG1* à *MdAGG15*) sont regroupées dans un cluster de 250 kilobases (kb) sur le chromosome 10, dans une zone où ils sont les seuls gènes codants identifiés (**Figure 14**).



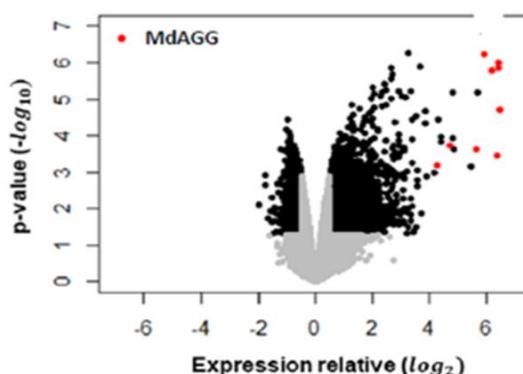
**Figure 14 :** Capture d'écran du Browser montrant le cluster de MdAGGs sur le chromosome 10. On peut noter que les seuls séquences codantes sur ce cluster de 250 kb sont celles des MdAGGs (<https://pegasus-bioinfo.angers-nantes.inrae.fr/jbrowse>). Les autres MdAGGs se situent sur le chromosome 6 (MdAGG16) et le chromosome 5 (MdAGG17 & MdAGG18 – Warneys et al, 2018).

	MdAGG17	MdAGG18	MdAGG16	MdAGG6	MdAGG8	MdAGG9	MdAGG11	MdAGG4	MdAGG2	MdAGG1	MdAGG3	MdAGG5	MdAGG10	MdAGG14	MdAGG12	MdAGG13	MdAGG15
MdAGG17		98,81	90,16	84,33	86,46	86,95	87,55	88,15	88,35	89,16	88,96	88,55	88,96	87,55	87,35	87,95	88,35
MdAGG18	98,81		89,36	83,53	85,66	86,14	86,75	87,55	88,76	88,55	88,15	88,15	88,15	87,15	86,95	87,55	87,95
MdAGG16	90,16	89,36		86,14	87,27	88,76	88,96	89,56	89,76	90,16	90,36	89,96	91,16	89,76	89,16	89,76	90,16
MdAGG6	84,33	83,53	86,14		88,69	90,36	90,56	91,16	90,96	90,76	91,37	91,16	92,57	90,76	90,76	91,77	91,37
MdAGG8	86,46	85,66	87,27	88,69		94,95	95,96	93,33	93,94	93,74	93,94	94,55	94,95	93,33	94,34	93,94	94,34
MdAGG9	86,95	86,14	88,76	90,36	94,95		98,19	95,58	95,38	94,98	95,58	96,79	96,39	95,38	95,18	95,78	96,18
MdAGG11	87,55	86,75	88,96	90,56	95,96	98,19		95,78	96,18	95,58	96,18	96,59	96,99	95,58	95,78	96,39	96,79
MdAGG4	88,15	87,55	89,56	91,16	93,33	95,58	95,78		97,79	97,39	97,59	96,79	96,79	95,38	95,58	96,18	96,18
MdAGG2	88,35	87,95	89,76	90,96	93,94	95,38	96,18	97,79		97,99	97,79	96,59	96,99	95,58	95,78	96,39	96,39
MdAGG1	89,16	88,76	90,16	90,76	93,74	94,98	95,58	97,39	97,99		98,8	96,99	96,99	95,98	95,78	96,39	96,59
MdAGG3	88,96	88,55	90,36	91,37	93,94	95,58	96,18	97,59	97,79	98,8		96,79	97,59	96,59	96,39	96,99	97,19
MdAGG5	88,55	88,15	89,96	91,16	94,55	96,79	96,59	96,79	96,59	96,99	96,79		97,19	96,18	95,98	96,59	96,99
MdAGG10	88,96	88,15	91,16	92,57	94,95	96,39	96,99	96,79	96,99	97,59	97,19		96,99	97,19	97,79	97,79	97,79
MdAGG14	87,55	87,15	89,76	90,76	93,33	95,38	95,58	95,38	95,58	95,98	96,59	96,18	96,99		97,79	98,39	98,39
MdAGG12	87,35	86,95	89,16	90,76	94,34	95,18	95,78	95,58	95,78	95,78	96,39	95,98	97,19	97,79		98,59	98,59
MdAGG13	87,95	87,55	89,76	91,77	93,94	95,78	96,39	96,18	96,39	96,39	96,99	96,59	97,79	98,39	98,59		99,2
MdAGG15	88,35	87,95	90,16	91,37	94,34	96,18	96,79	96,18	96,39	96,59	97,19	96,99	97,79	98,39	98,59	99,2	

Tableau 2 : Tableau de comparaison des similarités nucléotidique des séquences codantes des *MdAGGs*. Les valeurs sont exprimées en pourcentage

## INTRODUCTION GENERALE

Les MdAGGs possèdent un unique domaine amaranthine faisant un poids total variant entre 18,9 et 20,6 kDa. Les séquences des *MdAGGs* sont très conservées entre elles avec entre 83 et 99% d'homogénéité nucléotidique (**Tableau 2** - Warneys et al, 2018). Suite à un traitement à l'ASM, la famille des MdAGGs est la famille de gènes la plus induite (**Figure 15**) et parmi les 17 membres, *MdAGG10*, la lectine la plus proche de la séquence consensus (**Tableau 2** - Warneys et al, 2018) est l'une des *MdAGGs* les plus exprimées (**Tableau 3** – Données non publiées). Comme les autres membres de la sous famille des amaranthines, les MdAGGs ne possèdent pas de peptide signal et sont donc synthétisées dans les ribosomes libres du cytosol et restent dans le compartiment nucléocytoplasmique des cellules (Dang et al, 2017).

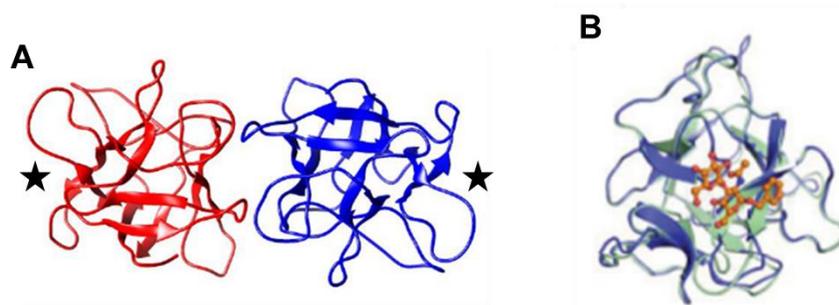


**Figure 15 :** Volcanoplote représentant l'expression des gènes 3 jours après le traitement à l'ASM de semis de 'Golden Delicious'. Chaque point représente l'expression relative d'un gène suite à l'application d'ASM par rapport à un traitement à l'eau. Les points rouges représentent les gènes codant les MdAGGs (Warneys et al, 2018).

MdAGG	Nombre de reads								Expression	
	ASM-1	ASM-2	ASM-3	Moyenne ASM	Eau-1	Eau-2	Eau-3	Moyenne Eau	Log2	p-value
MdAGG1	588	335	271	398	0	0	3	1	8,78353323	1,1777E-19
MdAGG2	251	267	260	259,33	0	0	0	0	10,5274159	6,2354E-18
MdAGG3	1741	1087	813	1213,67	1	0	0	0,33	11,8595547	3,71484E-21
MdAGG4	63	16	17	32	0	0	0	0	7,63921415	4,7811E-07
MdAGG5	26	46	28	33,33	0	0	0	0	7,54591739	3,23906E-08
MdAGG6	0	0	0	0	0	0	0	0		
MdAGG8	486	45	21	184	0	0	0	0	10,2554893	2,81264E-05
MdAGG9	194	152	80	142	0	0	0	0	9,71653693	7,58979E-14
MdAGG10	940	582	365	629	0	0	0	0	11,8817816	1,21452E-20
MdAGG11	2580	2846	1327	2251	0	2	0	0,67	11,8335882	5,24294E-27
MdAGG12	2270	1386	599	1418,33	0	2	1	1	10,6501117	9,29715E-27
MdAGG13	567	494	300	453,67	0	0	2	0,67	9,52676737	6,50029E-18
MdAGG14	2854	3227	2082	2721	0	0	2	0,67	12,0832511	1,31661E-29
MdAGG15	1477	1260	719	1152	0	0	0	0	12,7269778	2,27271E-24
MdAGG16	4718	841	1522	2360,33	0	0	0	0	13,853035	7,02165E-15
MdAGG17	170	6718	158	2348,67	0	60	0	20	6,96977025	
MdAGG18	106	475	4	195	0	8	0	2,67	6,34254658	0,007608645

**Tableau 3 :** Nombre de reads obtenues lors d'une analyse RNA-seq sur des échantillons traités à l'ASM ou à l'eau et expression des MdAGGs dans les échantillons traités à l'ASM par rapport à ceux traités à l'eau.

Des données de bio-informatiques (Warneys et al. 2018) puis des analyses biochimiques (données non publiées) ont démontré que MdAGG10 est une association de deux homodimères de domaines amaranthines, et est prédite pour se fixer au Gal-GalNAc grâce à ses deux sites de fixations situés à chaque extrémité de l'homodimère (**Figure 16**). La fixation avec le Gal-GalNAc se fait *via* la formation de 6 liaisons hydrogènes au niveau du site de fixation qui est conservé chez l'ensemble des membres de la famille des MdAGGs et qui est composé d'une arginine et de deux glutamines (Warneys et al, 2018). Cette structure en homodimère est stabilisée par la présence d'une cystéine C-terminale (présente chez toutes les MdAGGs) *via* la formation de ponts disulfures (Données non publiées).



**Figure 16 : Structure prédite de MdAGG10 et comparaison avec l'amaranthine d'*A. caudatus*.** (A) Structure prédite de MdAGG10. Chaque monomère est représenté d'une couleur différente et les sites de fixation aux carbohydrates sont représentés par les (★). (B) Superposition de la structure d'*A. caudatus* (en vert) et de MdAGG10 (en bleu). La localisation du site de fixation au ligand Gal-β1,3-GalNAc-α-O-benzyl est représenté en orange.

La famille des MdDiAGGs est une famille de 6 protéines avec deux domaines amaranthines ayant un poids variant entre 34,5 et 59,7 kDa. Au contraire des *MdAGGs*, l'expression des *MdDiAGGs* n'est pas induite par l'ASM. On observe deux types de lectines parmi les MdDiAGGs : trois membres des MdDiAGGs sont des chimérolectines car elles arborent en plus de leurs deux domaines amaranthines, un domaine aérolysine (Warneys et al, 2018). Les autres MdDiAGGs ne possèdent pas de domaine catalytique et sont donc des hololectines.

La caractérisation du rôle *in planta* des MdAGGs n'a pas encore été établie. En effet, Warneys et al (2018) ont fait l'hypothèse de l'implication des MdAGGs dans la résistance contre *Dp* sans avoir approfondi l'étude sur ce bioagresseur. Dans leur étude, Chavonet et al (2022) ont démontré que la présence de MdAGGs dans les tissus était associée à la résistance du pommier contre le feu bactérien et ont également montré l'agglutination *in vitro* de cellules d'*Ea* dépourvues d'EPS avec la protéine MdAGG10 purifiée. Les MdAGGs semblent donc interagir directement avec deux bioagresseurs du pommier différents. Le rôle des MdDiAGGs chez le pommier, lui, n'a pas encore été éludé.

La famille des MdAGGs semblent donc être de bons gènes candidats pour la création de variétés résistantes à *Ea* et *Dp*, deux bioagresseurs contre lesquels il n'existe pas beaucoup de moyens luttés.

Cependant, même si la création de nouvelles variétés a permis d'obtenir des plantes plus productives et plus résistantes, elle est pour certaines espèces compliquées et chronophages.

### **3. Création variétale et nouveaux outils associés**

#### **3.1. Historique de la création variétale et méthodes utilisées**

L'Homme a commencé à cultiver les plantes sauvages il y a environ 12 000 ans, au début de sa sédentarisation, et à les sélectionner afin d'obtenir des plantes plus productives, plus résistantes à leur environnement ou plus adaptées aux outils à sa disposition. Cette méthode de sélection se basait initialement uniquement sur le phénotype des plantes, sans prendre en compte les mécanismes génétiques associés. Une première amélioration des méthodes de la sélection variétale a lieu à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle avec la publication des lois de Mendel, permettant la compréhension de la transmission des traits dans la descendance d'une espèce. A la fin de la seconde guerre mondiale, la révolution verte a permis une augmentation rapide des rendements agricoles, grâce aux développements des intrants chimiques, des pesticides, de la sélection variétale ainsi que de l'irrigation (Patel, 2013). Parmi ces innovations, on retrouve les engrais chimiques, fabriqués à partir de pétrole, les produits phytopharmaceutiques appartenant à la famille des organochlorés comme le Dichlorodiphényltrichloroéthane ou le dieldrine, aujourd'hui interdits à cause de leur effet rémanent et néfaste pour l'environnement et la santé humaine, ainsi que la création et le déploiement de variétés naines de blé et de riz, supportant des apports plus élevés d'eau et d'azote, afin d'augmenter les rendements (Tilman, 1998 ; Food and Agriculture Organisation – FAO -, 2004 ; Habert et Chevalier, 2021). La création de nouvelles variétés plus performantes en termes de productivité et de tolérance, voire de résistance aux stress biotiques et abiotiques a été permise au début des années 1990 et 2000 grâce, en outre, au développement de marqueurs génétiques comme les marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat) ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism – Mammadov et al, 2012). Ces marqueurs, lorsqu'ils sont proches d'un gène ou d'une zone génomique d'intérêt, possèdent plusieurs rôles : 1) Ils permettent d'une part, de rendre compte de la diversité des phénotypes observée au sein d'une population et de sélectionner plus facilement des individus à utiliser pour créer une nouvelle variété. 2) Ces marqueurs permettent d'autre part, de cibler avec plus de précisions la zone génomique responsable du trait agronomique que l'on veut insérer dans la nouvelle variété.

Il existe plusieurs méthodes de création variétale dites « conventionnelles » :

- L'hybridation consiste à créer des nouvelles variétés via la recombinaison entre parents. Elle peut permettre le transfert d'un caractère présent chez un parent par ailleurs sans intérêt, dans un génotype souhaité. Par exemple, on peut essayer de transférer un gène de résistance d'une espèce sauvage dans une variété ayant des qualités organoleptiques recherchées. L'utilisation des marqueurs SNP ou SSR a permis de diminuer le délai d'obtention de nouvelles variétés. En effet, au lieu de phénotyper chaque descendant pour vérifier la présence du trait agronomique,

il suffit seulement de génotyper l'ensemble des descendants obtenus et de vérifier la présence du (ou des) marqueurs associés au trait souhaité. C'est ce qu'on appelle la sélection associée par marqueur (Dreher et al, 2009).

- La mutation aléatoire est l'utilisation d'agents mutagènes chimiques (N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine - NTG) ou lumineux (rayons X ou rayons gamma) à grande échelle (Suryadi et al, 2022). Cette méthode permet d'obtenir des plantes possédant des nouvelles caractéristiques agronomiques grâce à la mutation aléatoire d'un ou plusieurs gènes suite à ces traitements (Lee et al, 2015). Cette méthode a notamment permis d'obtenir des variétés de tournesol produisant une huile de meilleure qualité (Patil et al, 2009), des variétés de tomates résistance à la pourriture bactérienne causée par *Ralstonia solanacearum* (Peiris et al, 2008) ou une variété de lentille tolérante à la sécheresse (Lal and Tomer, 2009). Utilisée dans le monde entier, cette technique a permis d'obtenir plus de 3 000 nouvelles variétés (Lee et al, 2015). A la suite d'une décision de la cour de justice de l'UE, cette dernière a classé les plantes issues de ces techniques comme des OGM et doivent remplir les conditions de la directive 2001/18/CE de l'UE (voir plus bas), hormis « les organismes obtenus par des techniques de mutagenèse qui ont été traditionnellement utilisées pour diverses applications et dont la sécurité est avérée depuis longtemps. » (Cour de Justice de l'UE, 2018 - [ECLI:EU:C:2018:583](#)).

Cependant, ces méthodes possèdent certaines limites. La sélection intense portant sur certains traits agronomiques comme le rendement ou la résistance aux bioagresseurs a entraîné une diminution du réservoir génétique de certaines plantes cultivées (Bayer et al, 2022). En effet, la sélection d'une petite portion de gènes ayant un gain génétique dans des nouvelles variétés a permis une augmentation rapide des rendements dans les années 60 et 70. Cependant, la diffusion à l'échelle mondiale de ces variétés performantes sur le plan agronomique a entraîné une diminution de la diversité génétique dans les parcelles cultivées. Cette diminution de la diversité génétique entraîne la création de nouvelles variétés avec un gain génétique moins important. La biologie des espèces pérennes et / ou auto-incompatible est également un frein dans la création de nouvelles variétés *via* ces méthodes de sélections classiques (Schaart et al, 2016). En effet, l'auto-incompatibilité par exemple du café, de la pomme de terre ou du pommier rendent l'hybridation plus longue que pour d'autres espèces, 15 à 20 ans pour la création d'une nouvelle variété de pommiers (Fenning et Gershenzon, 2002), comparée aux 12 années pour la création d'une nouvelle variété de blé (Bockus et al, 2001) ou 8 à 10 années pour la création d'une nouvelle variété de riz (Brar et Virk, 2010). La mutation aléatoire nécessite quant à elle une large population de départ et un long travail de phénotypage, coûteux en main d'œuvre (Schaart et al, 2016), qui la rendent inabordable sur ces espèces.

En plus des limites « techniques » des méthodes de créations variétales traditionnelles, l'agriculture, comme tous les autres écosystèmes, doit faire face et s'adapter aux conséquences du réchauffement climatique. Ces changements vont avoir un impact sur les rendements, la disponibilité en eau, ainsi que

sur l'émergence de nouveaux bioagresseurs (**Figure 17** - Intergovernmental Panel for Climate Change – IPCC -, 2022). En parallèle, selon l'Organisation des Nations Unies, la population mondiale devrait atteindre les 10 milliards d'habitants d'ici 2050 alors qu'en 2022, 828 millions de personnes dans le monde souffraient déjà de la faim (FAO, 2022). L'agriculture doit donc faire face à deux enjeux majeurs : s'adapter rapidement aux conséquences du changement climatique et permettre à une population mondiale en croissance continue d'avoir accès à une quantité de nourriture suffisante et de bonne qualité.

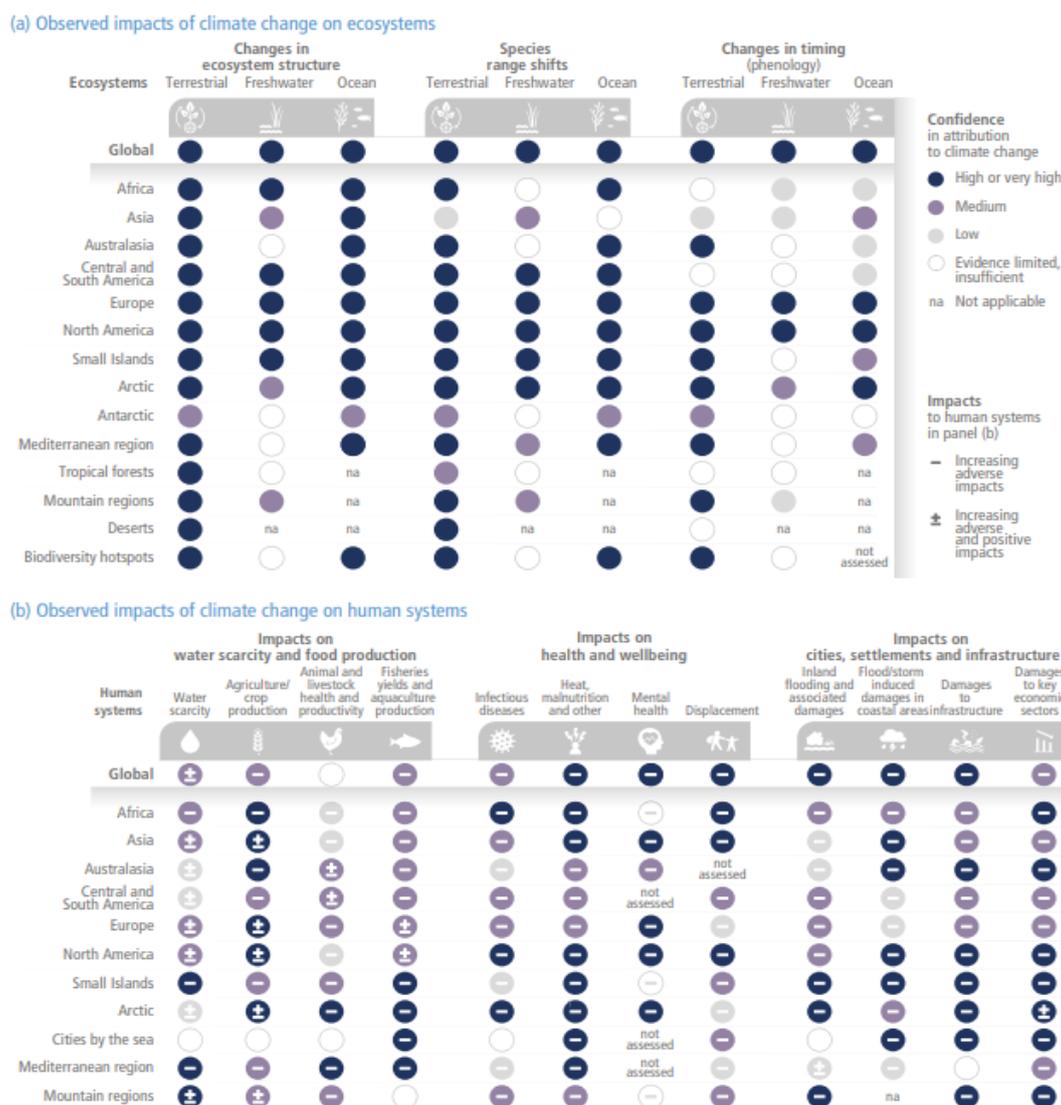


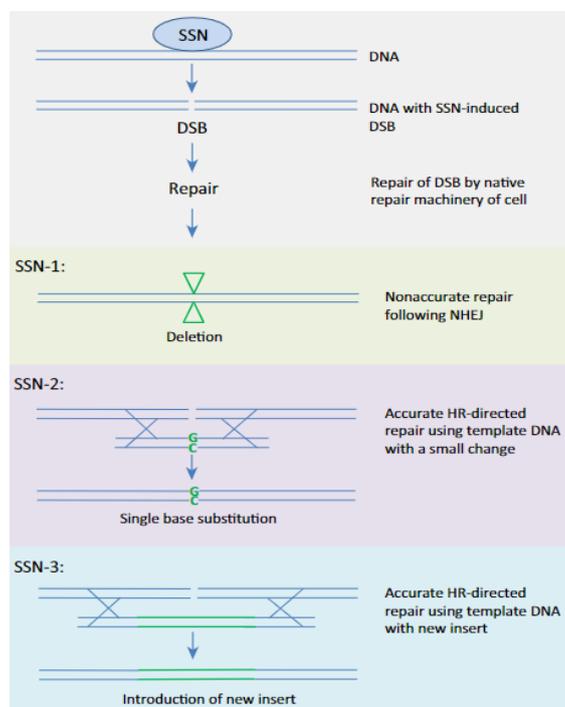
Figure 17 : Infographie récapitulant les impacts du changement climatique sur les écosystèmes (A) et sur les systèmes anthropomorphiques (B) (IPCC, 2022).

### 3.2. Le développement de nouvelles méthodes de sélection : les New Breeding Techniques (NBT)

Pour répondre à ce double enjeu, des nouvelles méthodes de sélection variétales ont été développées, permettant de réduire les délais d'obtention et parfois, d'élargir le réservoir génétique à disposition des

sélectionneurs (Lusser et al, 2011). Ces méthodes sont regroupées sous le nom de New Breeding Techniques, ou NBT. Parmi les différentes NBT, on trouve les techniques utilisant la mutagenèse dirigée, notamment grâce à des nucléases (site-directed nucleases : SDN). Il y a quatre groupes de nucléases utilisées dans l'amélioration des plantes : les transcription activator-like nucleases (TALENs), les méganucléases, les zinc-finger nucleases (ZFNs) et la Cas9 du système d'édition du génome CRISPR/Cas9. Les modifications obtenues grâce à des SDN peuvent être classées en trois catégories (**Figure 18** - Voigt, 2023), selon le mécanisme de réparation génique déclenché et la délivrance ou non d'un segment d'ADN donneur exogène :

- les modifications de type SDN-1 consistant en des substitutions de quelques paires de bases, de courtes délétions ou insertions (indels), représentent des mutations aléatoires dans une région prédéfinie du génome à la suite d'un mécanisme de réparation génique sujet aux erreurs (Non Homologous End Joining : NHEJ). Le NHEJ est présenté plus en détails dans la partie 3.2.2.2 ;
- les modifications de type SDN-2 correspondent à des mutations ponctuelles choisies, générées par recombinaison homologue (RH) entre la zone ciblée et une matrice de réparation (ADN donneur) ;
- Enfin, lorsqu'une large portion d'ADN est insérée à un endroit spécifique du génome, la modification est dite de type SDN-3.



**Figure 18 : Schéma représentant les trois types de Sequence Specific Nuclease (SSN) possibles après une double coupure du brin d'ADN (DSB) dues à des nucléases.** La SSN-1 représente une mutation aléatoire faite par le système de réparation de l'ADN. La SSN-2 représente la réparation de la double coupure en utilisant un modèle qui est différent du gène d'origine. La SSN-3 représente l'ajout d'une plus large portion d'ADN selon un modèle pré-défini à l'avance. (Schaart et al, 2016)

Parmi les NBT, on trouve également d'autres techniques comme l'intragénèse et la cisgénèse ou le greffage utilisant des portes greffes génétiquement modifiés (Seyran et Craig, 2018). Par rapport à des outils de sélection conventionnels, l'utilisation des NBT pourrait dans certains cas réduire de deux tiers le temps d'obtention d'une variété possédant un trait donné (Dhugga, 2022).

### 3.2.1. Effets indésirables potentiels et législation encadrant l'utilisation des NBT

La législation entourant l'utilisation des NBT ainsi que la commercialisation des nouvelles variétés créées grâce à ces dernières est assez complexe et souvent propre à chaque pays ou région du monde. En effet, en parallèle de leur développement, des effets potentiels non-intentionnels ont été listés et doivent être pris en compte lors de l'utilisation de ces techniques. Comme lors du déploiement de nouvelles variétés ayant un nouveau trait agronomique ou un trait agronomique amélioré, le déploiement de variétés issues de NBTs peut avoir des effets non intentionnels qu'il faut surveiller. Certains modèles essaient de simuler l'impact de l'introduction d'OGMs et de la simplification des pratiques culturales associée. Par exemple, une étude publiée par Bürger et al (2015) montre que l'introduction de maïs OGM portant le gène *PAT*, conférant une résistance aux herbicides, modifie très peu la diversité des herbes aux alentours des champs. Cependant, ces effets non intentionnels restent compliqués à mesurer avant le déploiement des nouvelles variétés, qu'elles soient issues de NBTs ou d'une sélection conventionnelle (Bauer-Panskus et al, 2020).

Dans certains pays comme les Etats-Unis, le Canada ou l'Argentine, la réglementation porte sur le produit final et non sur la méthode utilisée pour obtenir des nouvelles variétés. De ce fait, l'autorisation de culture et de vente se fait au cas par cas. En Inde et au Japon, les nouvelles variétés ne comportant pas l'ajout de gènes étrangers, au sens n'appartenant pas une espèce sexuellement compatible, ne sont pas soumises à une autorisation ni à une surveillance spécifique (Jolly et al, 2022). Dans l'UE, les nouvelles variétés issues de l'utilisation des NBT sont interdites à la culture et à la commercialisation, car considérés comme des organismes génétiquement modifiés (OGM), *via* la directive 2001/18/CE et le règlement (CE) n°1829/2003. Elles ne sont autorisées pour l'instant qu'à des fins de recherches. Cependant le 29 avril 2021, la commission européenne a publié un rapport portant sur la réévaluation de la classification de certaines NBTs et de leurs produits, considérés jusqu'alors comme étant des OGMs (Commission Européenne, 2021). Ce rapport est suivi par la publication d'une proposition de loi le 5 juillet 2023 détaillant une proposition de changement de la classification de certains NBT (Commission Européenne, 2023). En résumé, les plantes obtenues *via* l'utilisation des technologies CRISPR/Cas9 et de la cisgénèse ne seraient plus considérées comme des OGMs et seraient soumises aux mêmes règles d'autorisation de mises sur le marché que les plantes obtenues avec les outils de sélection conventionnels. Cette proposition de loi ouvre donc de nouvelles perspectives pour la création variétale dans l'UE et pour changement de certaines pratiques agricoles. Dans la suite de cet exposé,

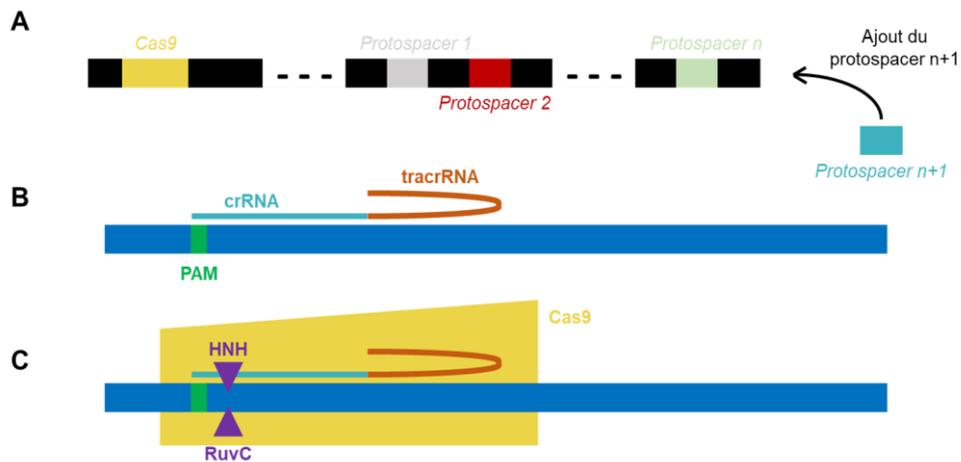
nous allons entrer plus en détails dans le fonctionnement du système CRISPR/Cas9 et de la cis/intragénèse.

### 3.2.2. Le système d'édition du génome CRISPR/Cas9

#### 3.2.2.1. Découverte et fonctionnement de l'outil CRISPR/Cas9

Le système Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) est à l'origine un système de défense développé par les bactéries et les archées, qui est une association entre une endonucléase codée par des gènes *cas*, organisés en opéron, et un éventail de séquences répétées (les CRISPR) visant le génome des cibles de ce système de défense (principalement des virus et des bactériophages - Doudna et Charpentier, 2014). Il existe plusieurs systèmes CRISPR/Cas mais dans la suite, nous allons nous intéresser à un système en particulier, le système CRISPR associé à la famille des Cas9. Ce système fonctionne en 3 phases (Jinek et al, 2012 – **Figure 19**) :

- Une phase adaptative au cours de laquelle une portion du génome ciblée par le système de défense est insérée dans l'éventail CRISPR. Cette portion insérée est appelée protospacer.
- Une phase d'expression au cours de laquelle le protospacer est transcrit et est alors appelé CRISPR RNA (crRNA). Avant de pouvoir se fixer sur le brin d'ADN cible, le crRNA forme un complexe avec un tracrRNA, un complexe qui permet de donner sa conformation au crRNA pour pouvoir être reconnu par la Cas9. L'association entre le crRNA et le tracrRNA est appelé « guide RNA » (gRNA), qui guide la Cas9 vers l'ADN cible.
- Une dernière phase nommée phase d'interférence. La *Cas9* possède deux sites à activité endonucléase : HNH et RuvC. Avant d'être activée, et donc d'effectuer une coupure double brin de l'ADN, la *Cas9* doit reconnaître un motif propre à chaque enzyme et accolé à la zone ciblée par le gRNA, appelé Protospacer Adjacent Motif (PAM, séquence NGG pour la *Cas9*). Après avoir reconnu le PAM accolé à l'ADN cible du gRNA, HNH clive le brin ciblé et RuvC clive le brin complémentaire au brin ciblé.



**Figure 19** : Schéma décrivant le fonctionnement original du système de défense adaptatif CRISPR/Cas9. (A) Phase adaptative au cours de laquelle une portion du génome cible (**protospacer n+1**) est inséré au sein de la zone CRISPR du génome bactérien. (B) Phase d'expression au cours de laquelle la **Cas9** et le **protospacer n+1** (donnant le **crRNA**) sont synthétisés. Le crRNA s'associe au tracrRNA pour former le gRNA. (C) Le gRNA s'associe avec sa zone complémentaire sur l'ADN cible. Après la reconnaissance du **PAM**, la **Cas9** grâce à ses deux sites à activité endonucléase (**HNH** et **RuvC**) coupe le double brin d'ADN, c'est la phase d'interférence. Schéma personnel.

### 3.2.2.2. Du système de défense bactérien à l'outil d'édition génomique chez les plantes

Comme dit plus haut, le système CRISPR/Cas9 était un système de défense bactérien contre les virus et des bactériophages. Dans une étude publiée en 2012, Jinek et al, ont démontré que ce système pouvait être adapté et utilisé chez d'autres organismes en ne modifiant que la séquence du crRNA. A l'inverse d'autres méthodes d'éditions du génome de l'époque, comme les TALENs ou les ZFNs, qui nécessitent une modification de l'enzyme pour chaque nouvelle édition voulue, le système d'édition CRISPR/Cas9 ne nécessite pas de telles modifications et a donc été de plus en plus utilisé par la suite pour l'étude des génomes, dont ceux des plantes (Doudna et Charpentier, 2014). Dans la suite, nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'étude et l'utilisation du CRISPR/Cas9 chez les végétaux.

Le clivage du double brin d'ADN peut avoir des conséquences néfastes pour la cellule végétale. En effet, la coupure peut enclencher le processus de mort cellulaire (Roy, 2014), ou si le double brin n'est pas réparé avant le processus de division cellulaire, entraîner une perte de l'information génétique chez les cellules « filles » (Puchta, 2004). La cellule doit donc détecter la double coupure et la réparer le plus rapidement possible. La première phase de réparation du double brin d'ADN est une étape de détection de la coupure. Cette phase consiste en une cascade d'induction permettant de regrouper sur le site de la coupure les protéines qui interviendront dans la réparation. Les deux premiers inducteurs impliqués appartiennent à la famille des phosphatidylinositol 3-like kinase. Cette famille de kinase stoppe le cycle cellulaire pour permettre la réparation mais phosphoryle également l'histone H2AX pour permettre le recrutement du système de réparation de l'ADN (Amiard et al, 2010). Une fois le signalement de la

double coupure effectué, la réparation du double brin peut avoir lieu. Chez les plantes, il existe deux systèmes de réparations principaux déjà évoqués plus haut : le NHEJ et la RH (Manova et Gruszka, 2015).

De manière globale, le système de réparation par NHEJ a pour conséquence la génération d'indels au niveau du site de la double coupure (Li et al, 2021). Ce système de réparation possède différents sous-systèmes, comme le système cNHEJ ou aNHEJ (« c » pour « classical », « a » pour « alternative » Mladenov et Iliakis, 2011 ; Schellenbauer et al, 2021). Le système cNHEJ utilise le complexe Ku70/Ku80 pour lier les deux brins coupés et les protéger de possibles dégradations. D'autres protéines entrent ensuite en jeu pour réguler l'accès au site de la coupure, puis une ligase lie les deux morceaux d'ADN coupés et enfin d'autres protéines interviennent pour restaurer les groupes hydroxyles ou phosphoryles autour du double brin (Walker et al, 2001 ; Rulten et al, 2011). Le système aNHEJ va lui ablater des petites portions de nucléotides au niveau de la double coupure jusqu'à trouver des micro-homologies de séquence entre les doubles brins d'ADN (Puchta et Fauser, 2014). Le système cNHEJ va donc relier le double brin d'ADN tel qu'il était lorsque le complexe Ku70/Ku80 est intervenu alors que le système aNHEJ va lui essayer de retrouver des micro-homologies, quitte à ajouter ou retirer des nucléotides de la séquence.

La RH intervient quant à elle seulement pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Ce système de réparation consiste à insérer au niveau du site de la double coupure, une modification apportée à l'aide d'un ADN donneur, qui possède à ses extrémités la même séquence de nucléotides se trouvant en amont et en aval du site de la double coupure et permettant ainsi la recombinaison (Li et al, 2021).

Chez les plantes, le système de réparation par NHEJ est bien plus fréquent que la RH (Puchta et Fauser, 2014) et les erreurs générées sont mises à profit pour réaliser de la mutagenèse dirigée. La réparation *via* le système RH est lui beaucoup moins source d'erreur mais son utilisation chez les plantes reste très limitée (Puchta, 2004).

### 3.2.2.3. Exemples d'utilisation de l'outil CRISPR/Cas9 chez les plantes

Le système CRISPR/Cas9 a déjà été utilisé chez plusieurs espèces végétales cultivées, afin d'améliorer différents traits agronomiques. Plusieurs études ont ainsi démontré la possibilité de rendre des plantes tolérantes à certains stress abiotiques. Chez *Solanum lycopersicum L. cv. Micro Tom*, Liu et al (2020) ont montré que des lignées éteintes par CRISPR/Cas9 pour le gène *SILBD40* impliqué dans la signalisation de la voie de l'acide jasmonique, étaient tolérantes à une absence d'eau de plusieurs jours. Des lignées de riz ayant la séquence codante du gène *ERA1* modifiée grâce au système CRISPR/Cas9 ont également présenté une meilleure tolérance à la sécheresse (Ogata et al, 2020). D'autres études utilisant le CRISPR/Cas9 et portant sur le riz ont quant à elles permises de créer des variétés tolérantes au froid, en ciblant le gène *OsAnn3* (Shen et al, 2017) ou *OsAnn5* (Shen et al, 2020).

Le système CRISPR/Cas9 a aussi été utilisé pour améliorer les rendements de certaines plantes cultivées. Une étude publiée par Xu et al (2016) montre que des lignées de riz éteintes pour quatre gènes régulant la taille et le poids du riz produisaient des grains plus nombreux et plus gros. L'édition a aussi été utilisée pour augmenter la teneur en acide oléique dans les graines de *Brassica napus*, via l'extinction du gène *FAD2*, codant une enzyme qui catalyse la désaturation de l'acide oléique (Okuzaki et al, 2018).

En plus d'être un système apparaissant comme efficace pour adapter rapidement les espèces aux conséquences du réchauffement climatique, ou en améliorer la qualité nutritive, le système CRISPR/Cas9 a aussi été utilisé pour rendre des plantes résistantes à différents stress biotiques. Par exemple des lignées de la variété de riz 'Super Basmati', ayant des gènes de susceptibilité, ciblés par les effecteurs TALEs de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, modifiés par CRISPR/Cas9, sont résistantes à cette dernière (Zafar et al, 2020). D'autres exemples sont disponibles tels que du blé rendu résistant à l'oïdium (Wang et al, 2014) en ciblant les gènes *MLO*, connus pour réprimer la résistance à l'oïdium chez d'autres plantes, du riz résistant à *Nilaparvata lugens* (Lu et al, 2018) en ciblant le gène *CYP71A1* impliqué dans la synthèse de sérotonine, une hormone favorisant l'infestation de *N. lugens* ou encore de l'*A. thaliana* résistant au Turnip Mosaic Virus (Pyott et al, 2016) en ciblant le gène paralogue de *eIF4E*, connu pour être un allèle récessif dans la résistance aux *Potyvirus*.

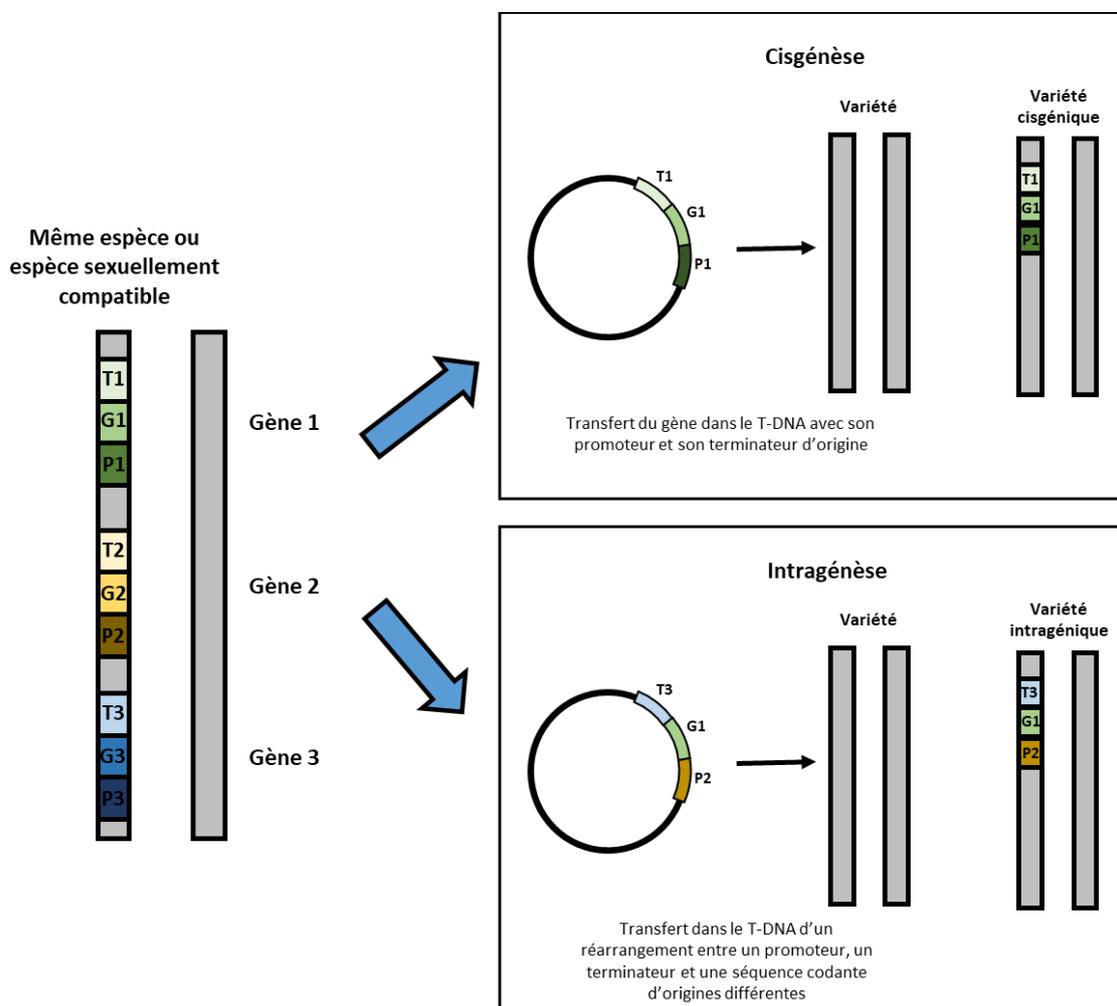
Chez le pommier, l'outil CRISPR/Cas9 a également été utilisé pour améliorer la résistance de ce dernier au feu bactérien. En effet, l'extinction chez les variétés sensibles 'Gala' et 'Golden Delicious' de *DIPM4*, un gène codant un récepteur leucine rich repeat (LRR)-like serine/théorine contenant un domaine kinase et interagissant avec l'effecteur DspA/E d'*Ea* a réduit de moitié la sévérité de la maladie (Pompili et al, 2020).

La mutagenèse dirigée rendue possible par l'outil CRISPR/Cas9 peut également être utilisée (Warneys et al. 2018) en recherches pour étudier la fonction de gènes et de familles de gènes qui, s'ils s'avèrent intéressants au niveau agronomique, pourront être utilisés dans la création de nouvelles variétés. Par exemple, des lignées éteintes via CRISPR/Cas9 pour le gène *KASI* ont permis de vérifier son implication dans la conversion du sucrose en huile chez le colza (Viridi et al, 2020). A ma connaissance, chez le pommier, hormis dans l'étude de Pompili et al (2020), ce système d'édition n'a été utilisé pour l'instant que pour mettre au point la technique et améliorer son efficacité (Charrier et al, 2019 ; Malabarba et al, 2020).

### 3.2.3. Technique de la cisgénèse / intragénèse

La cisgénèse et l'intragénèse sont des techniques permettant l'insertion chez une espèce donnée, d'une portion d'ADN appartenant à la même espèce ou à une espèce sexuellement compatible. Cette insertion ne se fait pas par reproduction sexuée mais via l'utilisation d'outils de génie génétique, comme par exemple *Agrobacterium tumefaciens* (Schaart et al, 2016). La cisgénèse est l'introduction dans un génome du promoteur, de la séquence codante et du terminateur d'un même gène (**Figure 20**).

Concernant l'intragénèse, elle autorise des réarrangements et la séquence codante d'un gène peut être associée au promoteur et au terminateur d'autres gènes, tant que ces séquences appartiennent toutes à l'espèce d'intérêt ou à une espèce sexuellement compatible (**Figure 20**).



**Figure 20 : Schéma décrivant les principes de cisgénèse et d'intragénèse.** La cisgénèse correspond au transfert de la séquence codante (G) d'un gène ainsi que de son promoteur (P) et terminateur (T) d'origine, d'un individu chez un autre individu de la même espèce ou d'une espèce sexuellement compatible. L'intragénèse correspond au transfert de la séquence codante d'un gène avec un promoteur et un terminateur qui peuvent provenir d'autres gènes, mais qui doivent appartenir à la même espèce ou à une espèce sexuellement compatible. Schéma inspiré de Limera et al, (2017).

Au contraire de la transgénèse, seule la portion d'intérêt « promoteur – séquence codante – terminateur » reste dans le génome et les autres gènes présents dans le T-DNA et utilisé pour la transformation, comme les gènes de sélection, par exemple, doivent être éliminés après utilisation. Cette élimination s'effectue en utilisant des T-DNA contenant une recombinase. La création de lignées cis/intragénétiques se fait en deux étapes : la première est commune avec l'obtention des lignées transgénétiques, c'est-à-dire transformer des plantes avec un *Agrobacterium* contenant le T-DNA portant entre autres la portion d'intérêt, et obtenir des plantes transformées, sélectionnées positivement, le plus souvent, avec un gène

de résistance à un herbicide ou à un antibiotique. La seconde étape consiste à la fois à activer la recombinaison, pour éliminer toute autre séquence que la portion d'intérêt, et à sélectionner négativement les cellules n'ayant pas réalisé cette recombinaison, *via* un gène de sélection négative généralement fusionné au gène de résistance à un antibiotique/ herbicide. Il existe différents moyens d'activer la recombinaison, par exemple par choc thermique (Wang et al, 2005), par l'utilisation d'un herbicide (Ebinuma et Komamine, 2001) ou post-traductionnellement pour modifier sa localisation dans la cellule (Schaart et al, 2004). L'explication en détail du fonctionnement de la recombinaison utilisée dans ma thèse est présentée dans la partie 6.2 du matériel et méthodes.

La cis/intragenèse a déjà permis le développement de nouvelles variétés avec des traits agronomiques améliorés. Gadaleta et al (2008) ont créé une variété de blé dur cisgénique permettant de synthétiser la gluténine, une protéine présente chez le blé tendre mais absente chez le blé dur et permettant de fabriquer plus facilement du pain. Une autre étude menée par Haesaert et al (2015) a permis de conférer une résistance à *Phytophthora infestans* à la variété de pomme de terre 'Desirée', en introduisant par cisgénèse les gènes de résistance *Rpi-sto1* et *Rpi-vnt1.1*. Plusieurs études ont par ailleurs déjà montré l'efficacité de la cisgénèse dans la création de variétés résistantes à certaines maladies du pommier, majoritairement contre la tavelure, une maladie fongique causée par *Venturia inaequalis*. L'introduction par cisgénèse du gène *Rvi6* (anciennement *HcrVf2*), présent chez l'espèce résistante *Malus floribunda*, dans la variété 'Gala' sensible à la tavelure, a permis de diminuer de 80% l'infection fongique comparé à un témoin non transformé (Vanblaere et al, 2014). Une autre étude menée par Krens et al, (2015), montre que l'insertion de *Rvi6* chez la variété 'Gala' confère une résistance à la tavelure équivalente à celle observée chez *M. floribunda*. Concernant le feu bactérien, l'insertion par cisgénèse dans le génome de la variété 'Gala Galaxy', sensible au feu bactérien, du gène *FB\_MR5* provenant de *Malus robusta*, permet de réduire la sévérité des symptômes du feu bactérien (Kost et al, 2015). Dans les différents exemples présentés, on remarque que la cisgénèse a pour l'instant été utilisée majoritairement dans des contextes d'amélioration de la résistance, et *via* l'introduction de gènes dit de résistance, susceptibles d'être contournés plus ou moins rapidement. L'utilisation de constructions intragéniques permet également d'obtenir des résultats similaires. En effet Joshi et al (2011) ont publié une étude montrant que l'introduction chez la variété 'Gala' de l'association entre le promoteur de la Rubisco, *Rvi6* et le terminateur de *Rvi6* permet d'obtenir une résistance contre la tavelure équivalente à celle observée lorsque *Rvi6* et son terminateur est associé à son promoteur natif.

Même si dans ces différents exemples, la résistance à la tavelure est équivalente, que *Rvi6* soit associé à son promoteur natif ou à un autre promoteur, l'intragenèse possède un intérêt par rapport à la cisgénèse. En effet, dans une construction intragénique, on peut choisir un ou plusieurs gènes et les exprimer au moment opportun grâce à un promoteur approprié. L'utilisation de gènes de défenses, moins susceptibles d'être contournés par les bioagresseurs sont de bons candidats pour les constructions intragéniques car leur expression est souvent moins rapide après la détection de l'attaque d'un bioagresseur que pour un gène de résistance.

#### 4. Problématique et objectifs de la thèse

Jusqu'à présent, les études portant sur l'étude des agglutinines ont montré que l'ASM induisait leur expression et leur accumulation dans les tissus et que leur présence était associée à la résistance au feu bactérien. Des études *in vitro* ont aussi caractérisé l'interaction entre MdAGG10 et les cellules d'*Ea*, montrant que MdAGG10 pouvait interagir avec le LPS et l'EPS d'*Ea*. Cependant, la preuve fonctionnelle de l'implication *in planta* des MdAGGs dans la résistance du pommier à *Ea* n'a pas encore été établie. Pour peu qu'elle soit faite, ces gènes représenteraient des candidats intéressants comme alternative aux gènes de résistance pour améliorer cette résistance, pourquoi pas *via* des nouvelles techniques de création variétale, comme permet de l'envisager la proposition de dérégulation de certaines d'entre elles par l'UE.

Le premier objectif de ma thèse est de réaliser la preuve fonctionnelle de l'implication *in planta* des MdAGGs dans la résistance du pommier à *Ea*, en utilisant deux constructions géniques différentes ayant pour but de permettre de répondre aux questions suivantes :

- La surexpression constitutive de MdAGG10 confère-t-elle au pommier une résistance au feu bactérien ?
- L'édition des MdAGGs grâce à l'outil CRISPR/Cas9 élimine-t-elle la résistance au feu bactérien conférée par l'ASM ?

Le second objectif de ma thèse, plus appliqué, est d'essayer de faire la preuve de concept qu'il est possible de construire une résistance durable du pommier au feu bactérien, en utilisant les MdAGGs et en appliquant une stratégie intragénique.

Le premier chapitre de ma thèse sera donc consacré à la caractérisation fonctionnelle des MdAGGs *in planta* et le second chapitre sera consacré à la création et l'étude de lignées intragéniques pour la résistance au feu bactérien.



# **CHAPITRE 1 : CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES AGGLUTININES DANS DIFFERENTS PATHOSYSTEMES**

Dans ce chapitre, je vais présenter la caractérisation fonctionnelle *in planta* des agglutinines du pommier, vis-à-vis de deux de ses principaux bioagresseurs : *Ea*, l'agent causal du feu bactérien et *Dp*, le puceron cendré. Cette caractérisation fonctionnelle *in planta* a pu être faite *via* d'une part, l'utilisation de lignées transgéniques de pommier ou d'*Arabidopsis* surexprimant de manière constitutive *MdAGG10* et d'autre part, *via* l'utilisation de lignées transgéniques de pommiers modifiées au niveau des séquences codantes des *MdAGGs* grâce à l'outil d'édition du génome CRISPR/Cas9. Cette caractérisation fonctionnelle *in planta* s'est par la suite enrichie de tests d'agglutination *in vitro* d'autres bactéries. La première partie de ce chapitre porte sur l'étude des lignées éditées de pommier. La seconde partie portera sur l'analyse des lignées surexprimeuses chez le pommier et chez *Arabidopsis*, mais également sur le pouvoir d'agglutination *in vitro* de *MdAGG10*, vis-à-vis d'un large spectre de bactéries pathogènes.

## **1. Analyse par perte de fonction à l'aide de lignées de pommiers transgéniques éditées par CRISPR/Cas9 : preuve fonctionnelle *in planta* de l'implication des agglutinines dans la résistance au feu bactérien et au puceron cendré**

### **1.1. Obtention et génotypage partiels des lignées éditées**

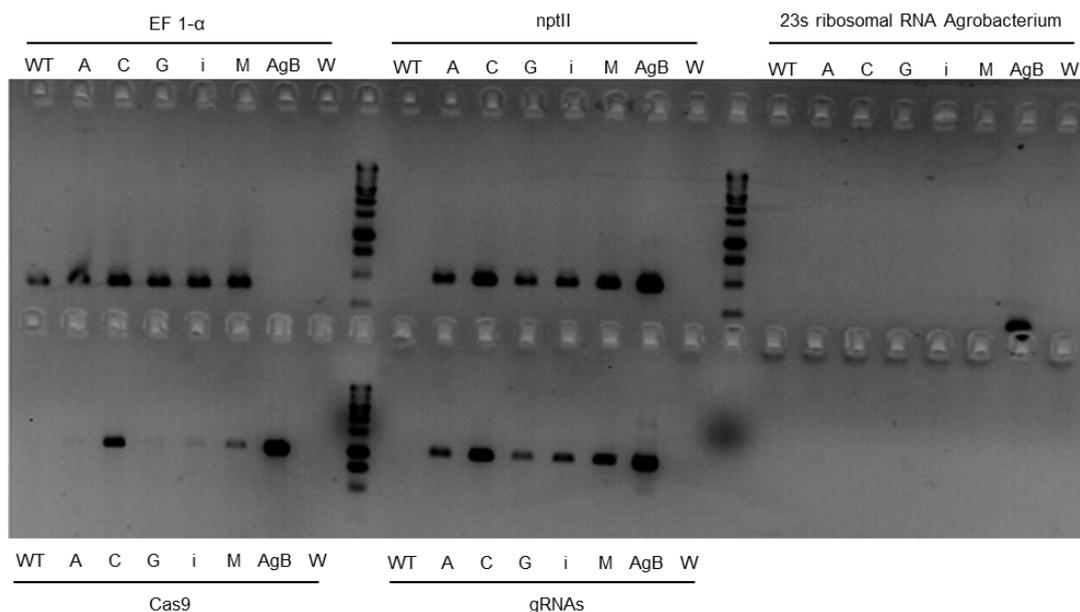
#### **1.1.1. Obtention des lignées de pommiers éditées pour les *MdAGGs***

Avant que ma thèse débute, cinq lignées éditées avaient été régénérées mais la vérification de l'insertion du T-DNA restait à faire. Dans la suite du manuscrit, ces lignées seront nommées « Crispr A », « Crispr C », « Crispr G », « Crispr i » et « Crispr M ». Ces cinq lignées avaient été obtenues à partir de l'agroinfiltration de 419 feuilles de vitroplants, soit un taux de transformation de 1,19%. Afin d'augmenter les chances d'édition, deux gRNAs avaient été choisis, l'un ciblant le brin sens, l'autre ciblant le brin antisens. Grâce à l'homogénéité de séquences des *MdAGGs*, au moins l'un des deux gRNAs devait permettre *a priori* de cibler l'ensemble des *MdAGGs* (Tableau 4).

	MdAGG1	MdAGG2	MdAGG3	MdAGG4	MdAGG5	MdAGG6	MdAGG8	MdAGG9	MdAGG10
gRNA1	1	1	1	1	1	0	3	0	0
gRNA2	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	MdAGG11	MdAGG12	MdAGG13	MdAGG14	MdAGG15	MdAGG16	MdAGG17	MdAGG18	
gRNA1	1	0	0	0	0	2	2	2	
gRNA2	0	0	1	1	0	1	1	1	

**Tableau 4 : Nombre de mésappariements entre les séquences codantes des MdAGGs et les gRNAs 1 & 2.** On considère qu'il n'y aura pas de fixation du gRNA avec le brin d'ADN cible lorsqu'il y a 3 mésappariements ou plus (événement représenté en bleu), ou que les mésappariements sont trop proches du PAM (dans les trois nucléotides suivant la séquence du PAM, événement représenté en rouge).

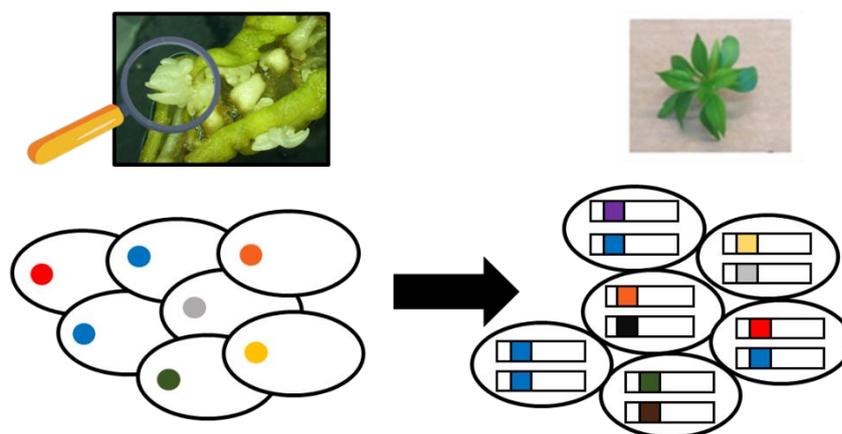
La transformation du pommier par *Agrobacterium* s'accompagne fréquemment de chimérisme : toutes les cellules participant à la régénération ne possèdent pas forcément le T-DNA, et n'expriment donc pas forcément le phénotype attendu (Flachowsky et al, 2008). Le génotypage des lignées par PCR, présenté en **figure 21**, assure la présence du T-DNA complet dans ces lignées, et l'absence de contamination par *Agrobacterium*. Par contre, il ne permet pas de dire si elles sont ou non en partie chimérique.



**Figure 21 :** PCR sur l'ADNg des 5 lignées transgéniques de pommiers ayant les séquences des MdAGGs éditées par CRISPR/Cas9. WT : témoin non transformé ; lignées A – C – G – i - M : lignées transgéniques obtenues ; AgB : ADN extrait de la souche d'*A. tumefaciens* utilisée pour la transformation ; W : témoin eau. Les séquences des couples d'amorces utilisés pour les amplifications sont dans l'**annexe 2**.

Dans le cas du CRISPR/Cas9, il faut distinguer le chimérisme classique défini ci-dessus, lié à l'insertion ou non du T-DNA, du chimérisme dit « d'édition » spécifique à l'action du système CRISPR/Cas9, et non à l'insertion du T-DNA le portant. Dans chaque cellule où le système est intégré, il agit en autonomie, donc plus ou moins rapidement et par ailleurs, les réparations réalisées par la machinerie cellulaire suite à son action vont fréquemment être différentes : deux cellules voisines vont ainsi

majoritairement avoir des éditions différentes. L'organogénèse de la future plante régénérée se faisant à partir de plusieurs cellules, il en résulte que des cellules aux éditions différentes peuvent participer à la régénération de la future plante, créant ainsi une chimère d'édition plus ou moins complexe. Cette complexité sera d'autant plus grande que, la plante transformée possède encore des allèles sauvages de son gène ciblé lors de la régénération. En effet, la *Cas9* fonctionnant jusqu'à ce qu'elle ne trouve plus de séquences à éditer (d'allèles sauvages), chaque allèle sauvage restant pourra alors être la source d'une édition originale (**Figure 22**). Dans notre cas, le système CRISPR/Cas9 ciblant plusieurs gènes, le chimérisme d'édition n'en est que démultiplié. Il en résulte qu'il n'est pas possible d'avoir un génotypage précis des lignées, à moins d'envisager un séquençage complet (au moins d'un chromosome), ce qui était financièrement exclu. Nous avons donc réalisé un génotypage partiel, explicité ci-après, pour vérifier l'édition par CRISPR/Cas9 des séquences de *MdAGGs*. Ce génotypage sera associé à de la PCR quantitative (qPCR) pour quantifier au mieux le taux d'édition. Cette dernière (dont les résultats sont présentés dans la partie 1.2) est réalisée, et donc présentée, en association avec les caractérisations phénotypiques, car comme déjà dit l'action du CRISPR/Cas9 peut se pérenniser dans le temps et ainsi modifier la valeur du taux d'édition au cours du temps.

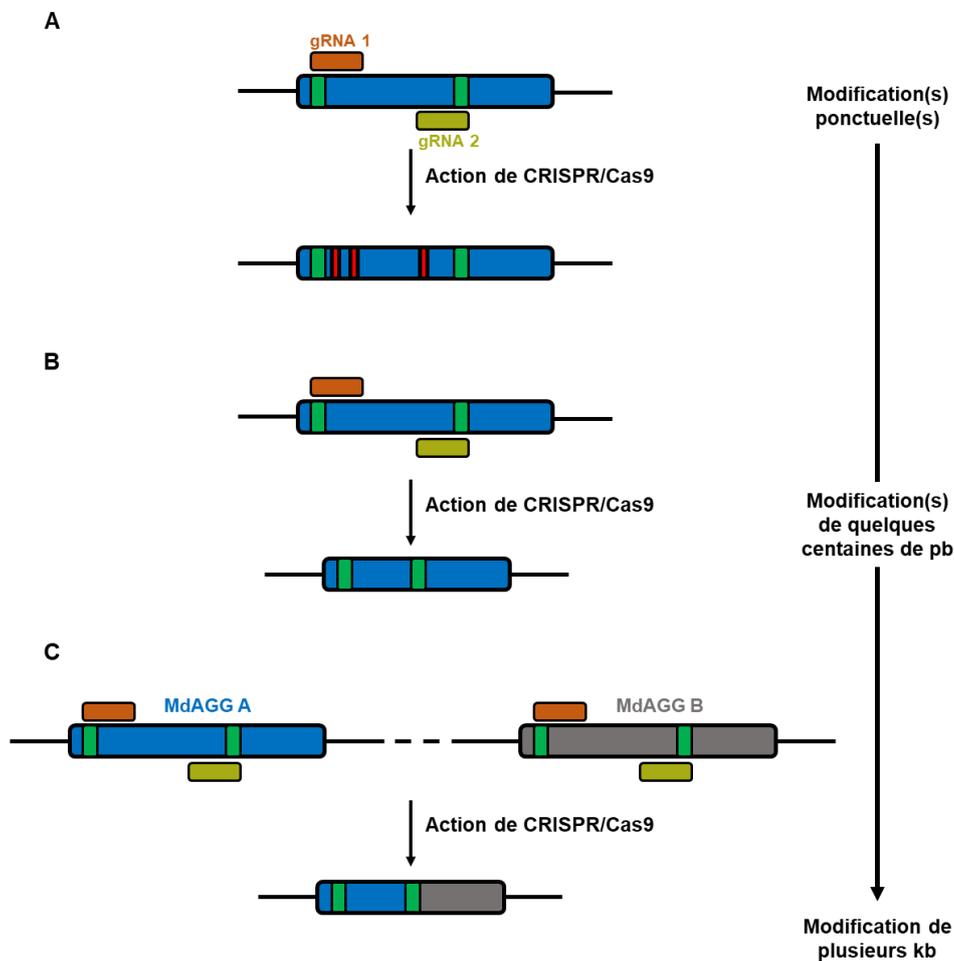


**Figure 22 : Représentation imagée du chimérisme d'édition chez les lignées Crispr.** Lors de l'organogénèse (*i.e.* la régénération du bourgeon), les quelques cellules (ovales noirs) participantes peuvent avoir des statuts d'édérations de séquences différents (représentés par les points de couleur différente), entraînant un chimérisme d'édition dans chaque plante régénérée. Si pour certaines des cellules participant à la régénération, il restait des allèles sauvages (**en bleu**), alors la *Cas9* continuera à les cibler dans la plante régénérée, créant d'autant plus de lignées cellulaires éditées différemment, que cette action sera tardive.

### 1.1.2. Génotypage partiel des lignées

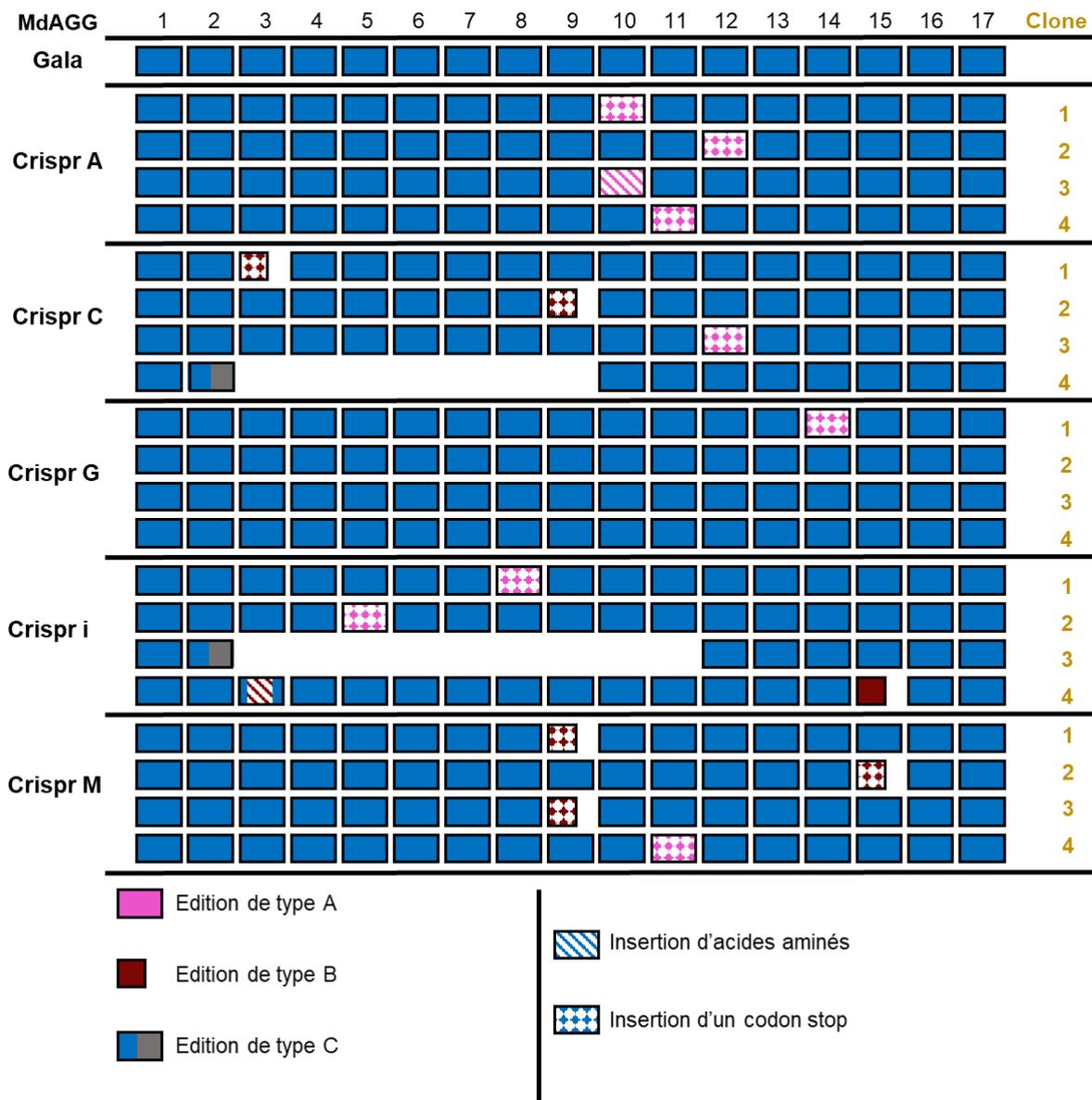
Pour vérifier l'action conjuguée de la *Cas9* et du système de réparation de l'ADN sur les gènes de *MdAGGs*, j'ai amplifié par PCR les zones ciblées par CRISPR/Cas9, je les ai clonées, puis séquencées. Comme dit plus haut pour les gRNAs, les *MdAGGs* étant de séquences très proches les unes des autres, les amorces choisies et situées de part et d'autre des zones ciblées par le CRISPR, fonctionnaient pour

toutes les agglutinines. De ce fait, le produit de chaque PCR était un mélange d'amplicons de toutes les agglutinines amplifiables dans la matrice de départ. Le clonage permettait alors d'isoler un amplicon et donc après séquençage d'obtenir une information pour un évènement d'amplification particulier. Ainsi, en choisissant d'envoyer seulement quatre clones bactériens par lignée transgénique, notre vision des éditions était forcément partielle. Néanmoins, elle nous a permis tout de même de vérifier que des éditions avaient bien eu lieu. Par ailleurs, la mesure du taux d'édition par dosage qPCR sur ADNg et ADNc (cf. ci-après et partie 1.2.) nous permettait quant à elle d'avoir une notion quantitative des événements survenus. A partir des séquençages, nous avons observé trois types d'éditions différents (**Figure 23**) :



**Figure 23 : Différentes modifications de la séquence codante des *MdAGGs* suites à l'action du CRISPR/Cas9.**

La zone en **bleu** ou **gris** représente la séquence nucléotidique d'une *MdAGG*, les zones **vertes** correspondent aux PAM, la zone **marron** correspond au premier gRNA et la zone en **kaki** au second. **(A)** représente les cas d'insertion, de délétion ou de substitution de quelques nucléotides (**en rouge**), suite à la coupure double brin de l'ADN par CRISPR/Cas9 puis sa réparation incluant des erreurs. **(B)** représente les cas de délétion intra-*MdAGG* d'une centaine de nucléotides après coupure simultanée et raboutage au niveau des 2 gRNAs. **(C)** représente les cas de délétion inter-*MdAGG* entraînant la suppression de plusieurs milliers de nucléotides après coupure simultanée et raboutage au niveau des 2 gRNAs.

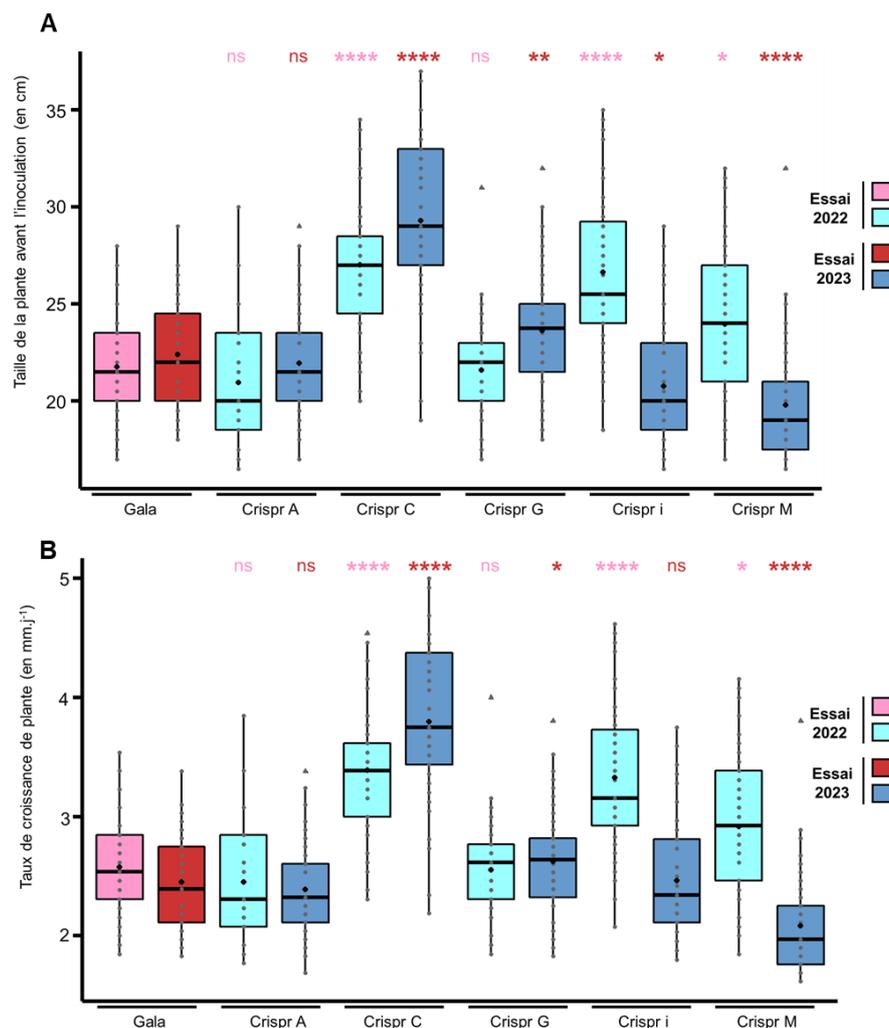


**Figure 24 : Représentation schématique des différentes éditions observées lors du génotypage partiel des 5 lignées éditées.** Pour chaque lignée, 4 clones bactériens, correspondant chacun au clonage de la séquence d'une agglutinine, ont été analysés. En bleu est représentée la séquence codante d'une *MdAGG*, en rose les éditions de type A et en marron les éditions de type B. Un rectangle bleu associé un rectangle gris signifie qu'il y a eu un rabotage entre les deux *MdAGGs* considérées, *i.e.* une édition de type C. Les zones hachurées signifient que la réparation du double brin d'ADN a occasionné un décalage du cadre de lecture de la séquence protéique correspondante. Une zone remplie avec des losanges signifie que la réparation s'est faite en générant un codon stop prématuré.

- l'insertion, la délétion (ces deux éditions sont regroupées par la suite sous le terme d'indels) ou la substitution de quelques nucléotides au niveau de l'une ou des deux séquences ciblées par les gRNAs. Ce type d'édition sera appelé par la suite « édition de type A ».
- la délétion d'une centaine de nucléotides au sein d'une même agglutinine, après coupure simultanée puis ligation entre les deux zones ciblées. Ce type d'édition sera par la suite appelé « édition de type B ».
- la délétion de milliers de nucléotides, d'un morceau entier de chromosome, après coupure simultanée puis ligation entre les deux zones ciblées, situées sur deux agglutinines différentes. Ce type d'édition sera par la suite appelé « édition de type C ».

Le détail des éditions séquencées chez les cinq lignées Crispr étudiées est récapitulé dans la **figure 24**. Pour la lignée Crispr A, sur les quatre clones étudiés, on observe à chaque fois une édition de type A avec un indel, deux fois sur la séquence codante de *MdAGG10*, une fois sur celle de *MdAGG11* et une fois sur celle de *MdAGG12*. Concernant la lignée Crispr C, une délétion de type B est observée chez deux clones, visant *MdAGG3* et *MdAGG9*. Une édition de type A est observée sur la séquence de *MdAGG12* portée par le troisième clone et sur le quatrième clone étudié, on observe une édition de type C entre le début de la séquence codante de *MdAGG3* et la fin de la séquence codante de *MdAGG9*, entraînant la suppression de 125 kb. Pour la lignée Crispr G, aucune édition n'a été observée chez trois des clones analysés. Une édition de type A sur la séquence de *MdAGG14* a par ailleurs été observée pour le dernier clone de cette lignée. Pour la lignée Crispr i, on a observé une édition de type A chez deux clones, concernant les séquences de *MdAGG8* et *MdAGG5*. Une édition de type C entraînant la délétion de 186 kb est par ailleurs observée chez le troisième clone de cette lignée, et est à l'origine du raboutage entre *MdAGG2* et *MdAGG11*. Pour le dernier clone étudié de la lignée Crispr i, nous avons observé l'insertion d'une portion de la séquence codante de *MdAGG15* au sein de la séquence codante de *MdAGG3*. Elle peut s'expliquer par une double coupure simultanée de la séquence d'ADN au niveau des zones ciblées dans *MdAGG3* et *MdAGG15*, et le système de réparation de l'ADN aurait utilisé la portion d'ADN clivée de *MdAGG15* pour réparer la double coupure simultanée qui a eu lieu au niveau de *MdAGG3*. Enfin pour la lignée Crispr M, trois clones ont montré une édition de type B chez *MdAGG9* à deux reprises, et chez *MdAGG15*. Le dernier clone de la lignée Crispr M montre une édition de type A dans la séquence codante de *MdAGG11*.

Les éditions observées sur les séquences codantes des *MdAGGs* ont des conséquences sur le cadre de lecture lors de l'étape de traduction des brins d'ARNm en protéines. Les conséquences prédites des éditions sur les séquences protéiques sont également présentées dans la **figure 24**. Lors de modifications de type A (indel ou substitution de nucléotides, hors multiple de trois adjacents), la séquence protéique résultante est complètement modifiée avec souvent l'apparition prématurée d'un codon stop. Lors de modifications de type B, soit la protéine perd « simplement » une partie de sa séquence, si le cadre de lecture a été conservé en partie 3', malgré la coupure/réparation, soit tout comme pour les modifications de type A, la partie 3' de la protéine est totalement modifiée, voire tronquée prématurément. Enfin, lors



**Figure 25 : Taille et taux de croissance des lignées Crispr et du témoin ‘Gala’ non transformé lors des deux acclimations en serre. (A)** La taille des plantes est mesurée la veille de l’inoculation par *Ea*. Chaque point gris correspond à la taille d’une plante, le losange noir correspond à la taille moyenne des plantes dans chaque modalité. **(B)** Le taux de croissance correspond à la différence de taille (en mm) de la plante entre le premier jour d’acclimatation et l’inoculation qui est ensuite divisée par la durée correspondante (en jours) de l’acclimatation. Chaque point gris correspond au taux de croissance d’une plante et le losange noir correspond au taux de croissance moyen des plantes dans chaque modalité. Pour les tests statistiques, les indications **en rose** représentent des comparaisons avec le témoin de l’essai de 2022 et les indications **en rouge** représentent des comparaisons avec le témoin de l’essai 2023. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \*\*\*\* $P < 0,0001$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

de modifications de type C, on assiste à l'élimination complète de la production de certaines agglutinines, outre la délétion d'une partie des deux *MdAGGs* raboutées (élimination de la partie 3' de la première, de la partie 5' de la seconde et modification du cadre de lecture pour la partie 3' de la seconde, généralement).

### **1.2. Caractérisation moléculaire et phénotypique et des lignées Crispr vis-à-vis du feu bactérien**

#### **1.2.1. Croissance des plantes en serre**

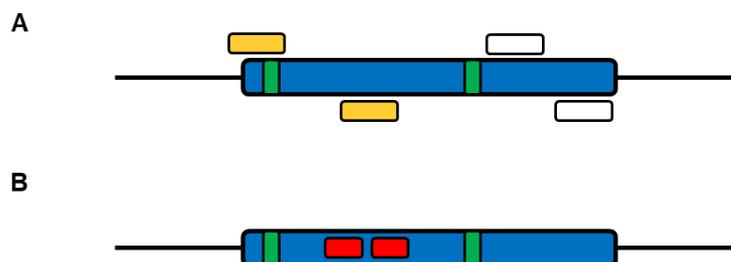
Lors de la première acclimatation en serre, nous avons remarqué une différence de croissance entre les lignées : les lignées Crispr C ; i et M avaient une vitesse de croissance plus importante que le témoin et les lignées Crispr A et G, entraînant une taille avant inoculation plus importante (**Figure 25**). Lors du second essai, pour essayer d'avoir une taille similaire entre les lignées au moment de l'inoculation, nous avons acclimaté les plantes en plusieurs fois. Malgré cela, des disparités ont persisté : les lignées C et G étaient globalement plus grandes que le témoin et les autres lignées, la lignée M étant globalement plus petite (**Figure 25**).

#### **1.2.2. Caractérisation quantitative des éditions des séquences des *MdAGGs* et phénotypage des lignées Crispr vis-à-vis du feu bactérien**

Après avoir vérifié l'édition de nos cinq lignées Crispr de manière qualitative et partielle, nous avons étudié la conséquence de ces éditions sur leur phénotype après inoculation avec *Ea*. Ce phénotypage a été effectué à deux reprises au cours de ma thèse, en 2022 et en 2023. A chaque fois, la mesure de l'édition par dosage qPCR sur l'ADNg et de l'accumulation de transcrits de *MdAGGs* suite à un traitement ou non à l'ASM ont été analysées dans les tissus coupés lors de l'inoculation (inoculation par coupure des  $\frac{2}{3}$  de la feuille – cf. partie 8 du matériel et méthodes). Comme dit précédemment, ces analyses nous renseignent sur le taux d'édition dans ces lignées à un instant donné, de manière plus quantitative que le génotypage partiel préliminaire par séquençage. Par ailleurs, l'outil CRISPR/Cas9 pouvant agir de manière progressive et continuant de fonctionner jusqu'à ce que les gRNAs n'identifient plus de zones éditables, c'est-à-dire jusqu'à ce que tout allèle sauvage, ciblé par les gRNAs, ait disparu du fait des éditions, le génome des cinq lignées Crispr a pu évoluer dans le temps. C'est pour cette raison que nous avons répété ces analyses à chaque essai phénotypique, et c'est aussi pour cela que les deux essais sont analysés séparément.

Concernant les analyses d'accumulation de transcrits, et des protéines associées, le 'Gala' traité à l'ASM sert de témoin non édité produisant fortement des transcrits de *MdAGGs* (et est résistant à la bactérie, il est appelé témoin résistant par la suite), et celui non traité à l'ASM de témoin non édité accumulant faiblement des transcrits de *MdAGGs* (et il est sensible à la bactérie, et donc appelé témoin sensible par la suite). Concernant la quantification des éditions sur ADNg, le témoin correspond au 'Gala' non

transformé. Nous avons dessiné deux couples d'amorces de qPCR permettant de quantifier la fréquence des différents types d'éditations (**Annexe 2 & Figure 26**).



**Figure 26** : Représentation schématique de la position des couples d'amorces utilisés en qPCR pour quantifier l'étendue des éditions au niveau de l'ARN et de l'ADN, ainsi que la séquence codante des anticorps anti-MdAGG utilisés pour détecter les MdAGG10 par Western Blot. La zone **bleue** correspond à la séquence codante d'une MdAGG, et les zones **en vert** correspondent aux PAM. **(A)** Position des amorces qEdC (en blanc) permettant de quantifier par qPCR les éditions de type C et **en jaune** la position des amorces qEdABC permettant de quantifier les éditions de type A ; B et C. **(B)** Position des séquences codant les peptides reconnus par les anticorps primaires utilisés (**en rouge**) pour la détection des MdAGGs par Western Blot.

Après vérification du nombre de mésappariements entre les couples d'amorces et les séquences codantes de la famille des MdAGGs (**Tableau 5**), les *MdAGG1, 6, 12, 16, 17* et *18* ne sont *a priori* pas ciblées par le couple d'amorces qEdC alors que toutes les *MdAGGs* sont ciblées par le couple d'amorces qEdABC.

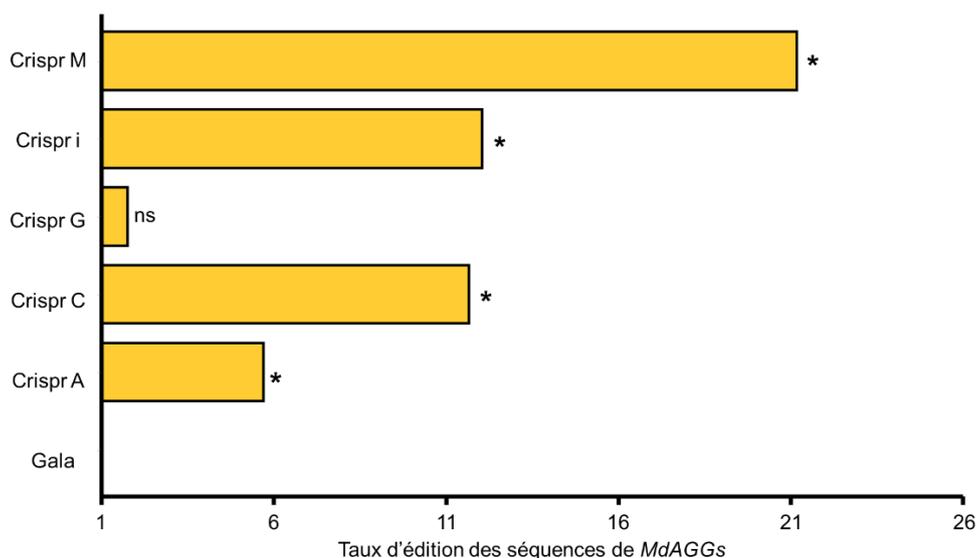
		MdAGG1	MdAGG2	MdAGG3	MdAGG4	MdAGG5	MdAGG6	MdAGG8	MdAGG9	MdAGG10
Type ABC (Amorces qEdABC)	Forward	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Reverse	1	1	2	1	0	1	0	0	0
		MdAGG11	MdAGG12	MdAGG13	MdAGG14	MdAGG15	MdAGG16	MdAGG17	MdAGG18	
	Forward	1	3	0	0	0	0	0	0	
	Reverse	0	0	0	0	1	1	1	1	
		MdAGG1	MdAGG2	MdAGG3	MdAGG4	MdAGG5	MdAGG6	MdAGG8	MdAGG9	MdAGG10
Type C (Amorces qEdC)	Forward	0	0	0	2	2	2	1	1	0
	Reverse	<b>2</b>	0	1	0	0	<b>12</b>	2	0	2
		MdAGG11	MdAGG12	MdAGG13	MdAGG14	MdAGG15	MdAGG16	MdAGG17	MdAGG18	
	Forward	1	0	0	0	0	2	3	5	
	Reverse	0	0	0	1	0	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	

**Tableau 5** : Nombre de mésappariements entre les séquences codantes des MdAGGs et les amorces utilisées pour quantifier les éditions de type A ; B et C. On considère que l'amorce ne fonctionne pas pour une *MdAGG* donnée lorsqu'il y a plus de 2 mésappariements au total ou si on trouve uniquement 2 mésappariements en fin d'amorces (côté 3' pour les amorces "forward" et côté 5' pour les amorces "reverse"). Ces évènements sont représentés **en rouge**.

Le couple qEdABC amplifie une zone débutant par les bases susceptibles d'être modifiées lors de l'action du système CRISPR/Cas9 au niveau de la zone cible du gRNA 1 (**Figure 26-A**). Les éditions

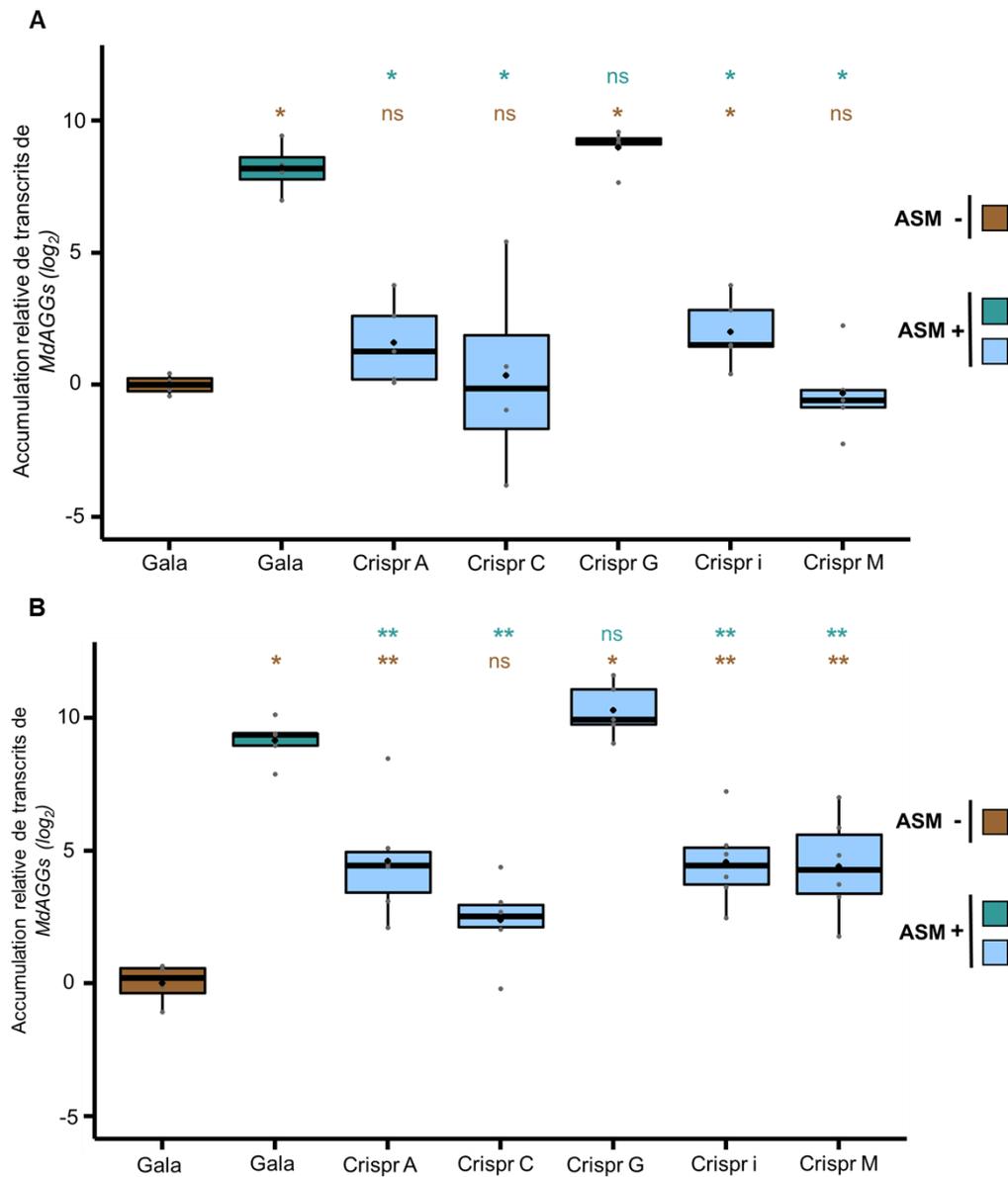
des trois types peuvent donc potentiellement modifier l'accroche du primer « sens » et empêcher l'amplification de cette zone par ce couple d'amorce. Ce dernier n'amplifie donc que les zones n'ayant pas subi d'édérations. Nous avons donc essayé de quantifier le niveau global d'édition des séquences des *MdAGGs* chez les différentes lignées Crispr en utilisant le couple qEdABC sur de l'ADNg. Nous avons par ailleurs utilisé le couple qEdABC pour mesurer l'accumulation de transcrits en réponse à l'ASM et juste avant inoculation, afin d'avoir une vision quantitative exhaustive du taux global d'agglutinines fonctionnelles exprimées dans les lignées en condition d'infection (quand une agglutinine est éditée, elle a en effet de grandes chances d'être non fonctionnelle, et le couple d'amorce ne fonctionne pas). Le couple qEdC amplifie lui une zone située en aval des zones cibles des deux gRNAs (**Figure 26-A**). Le taux d'édition imputable aux modifications de type A et B n'est donc pas mesurable par qPCR à l'aide de ce couple, car ces types d'édérations n'entraînent pas de perte de cette zone au niveau de l'ADNg, et donc de l'ADNc. Par contre, les éditions de type C seront, elles, mesurables par qPCR à l'aide de ce couple puisqu'elles entraînent des délétions d'agglutinines entières, et donc de zones d'amplification potentielles pour ce couple d'amorces. Nous avons également utilisé ce couple qEdC pour mesurer l'accumulation de transcrits en réponse à l'ASM et juste avant inoculation, afin d'avoir une vision quantitative du taux de perte d'agglutinines fonctionnelles liées aux événements de type C en conditions d'infection. La détection des *MdAGGs* par Western Blot nous permet aussi d'avoir une vue globale du niveau d'édition des *MdAGGs* (**Figure 26-B**). En effet, les séquences codant les peptides reconnus par les deux anticorps primaires utilisés pour détecter les agglutinines correspondent à des zones comprises entre les deux PAM. Cette localisation permet donc de détecter l'ensemble des éditions de type B et C et une partie des éditions de type A. En effet, les indels ont de grandes chances de modifier le cadre de lecture des transcrits, impactant alors la séquence protéique et donc la fixation des anticorps primaires ciblant les *MdAGGs*.

Lors du premier essai phénotypique en 2022, nous avons observé qu'à l'exception de la lignée Crispr G, le niveau global d'édition des séquences des *MdAGGs* était plus important que chez le témoin, ce qui signifie qu'il y a significativement moins de séquences de *MdAGGs* détectées chez toutes les lignées Crispr, hormis pour la lignée Crispr G (**Figure 27**). Le faible nombre de mesure (n=3) ne nous permet pas de discriminer statistiquement les lignées Crispr entre elles, même si on peut observer, en valeur absolue, un plus fort taux d'édition chez la lignée Crispr M par rapport aux lignées Crispr A ; C et i.



**Figure 27 : Quantification moyenne du taux d'édition des séquences des *MdAGGs* dans les différentes lignées Crispr en 2022.** Le taux d'édition correspond à  $(1/\text{Quantité d'ADN mesurée par qPCR correspondant aux séquences non éditées des } MdAGGs)$ . La valeur représentée est la moyenne mesurée chez 3 échantillons. Les données sont comparées par rapport à un 'Gala' non édité, considéré comme le témoin. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

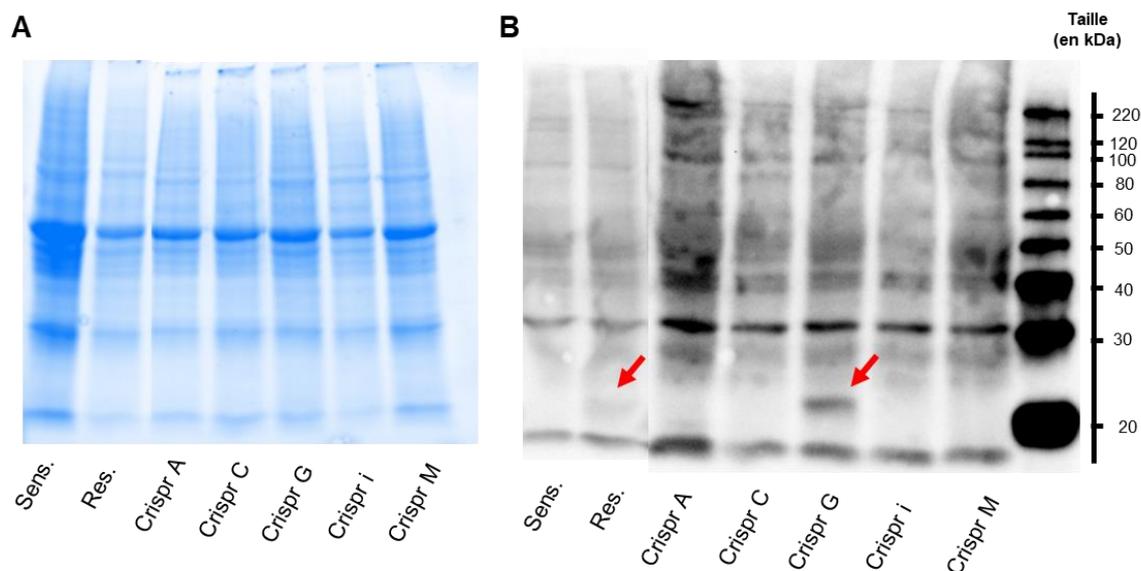
Les observations faites au niveau de l'ADNg sont transposables à ce que l'on observe chez les *MdAGGs* induites par un traitement à l'ASM. En effet, à l'exception de la lignée Crispr G, les lignées Crispr traitées à l'ASM accumulent moins de transcrits de *MdAGGs* que le témoin résistant (**Figure 28-A**). L'accumulation de transcrits de *MdAGGs* mesurée avec le couple qEdABC correspondant aux transcrits non édités, on peut en conclure qu'il n'y a presque plus aucun transcrit non édité et donc fonctionnel chez les lignées Crispr A, C & M car le niveau d'accumulation de transcrits chez ces lignées est équivalent au témoin sensible. Pour la lignée Crispr i l'accumulation de transcrits de *MdAGGs* après un traitement à l'ASM est intermédiaire entre le témoin sensible et résistant, même si proche de celle mesurée chez le témoin sensible (**Figure 28-A**). En utilisant le couple d'amorces qEdC n'amplifiant que les transcrits non édités ainsi que les transcrits ayant subi des éditions de type A & B, on peut caractériser un peu plus finement le niveau d'édition des *MdAGGs* chez les différentes lignées. Avec ce couple d'amorce, le niveau d'accumulation de transcrit après un traitement à l'ASM est toujours intermédiaire à ceux des témoins sensible et résistant pour la lignée Crispr i. Alors que l'accumulation de transcrits était équivalente au témoin sensible avec le couple qEdABC, les lignées Crispr A et M traitées à l'ASM ont une accumulation de transcrits intermédiaire entre le témoin sensible et résistant avec ce couple qEdC. Toujours avec qEdC, l'accumulation de transcrits après un traitement à l'ASM reste également équivalente au témoin sensible pour la lignée Crispr C, malgré une valeur moyenne proche des trois lignées citées précédemment (**Figure 28-B**). En comparant les résultats obtenus avec les couples qEdABC et qEdC, on peut en déduire qu'il y a plus d'éditions de type C chez la lignée Crispr A ; i & M par rapport à la lignée Crispr C parmi les *MdAGGs* qui sont détectées par ce couple d'amorces.



**Figure 28 : Accumulation relative des transcrits *MdAGGs* chez les lignées Crispr après un traitement à l'ASM lors de l'essai en serre de 2022. (A) Accumulation des transcrits *MdAGGs* dans les lignées et le témoin 'Gala' traité à l'ASM, relativement au témoin non traité en utilisant le couple d'amorces qEdABC. (B) Accumulation des transcrits *MdAGGs* dans les lignées et le témoin 'Gala' traité à l'ASM, relativement au témoin non traité en utilisant le couple d'amorces qEdC. Dans les deux graphiques, chaque point correspond à un échantillon dont la valeur correspond à la différence entre l'accumulation de transcrits de *MdAGGs* mesurée dans cet échantillon et la valeur moyenne d'accumulation de transcrits mesurée chez la lignée correspondante non traitée à l'ASM. Le losange noir représente l'accumulation moyenne. Pour les tests statistiques, les indications **en bleu** représentent des comparaisons avec le 'Gala' traité à l'ASM et les indications **en marron** des comparaisons avec le 'Gala' non traité à l'ASM. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \*\*P<0,01 ; \*P<0,05 ; ns non significatif.**

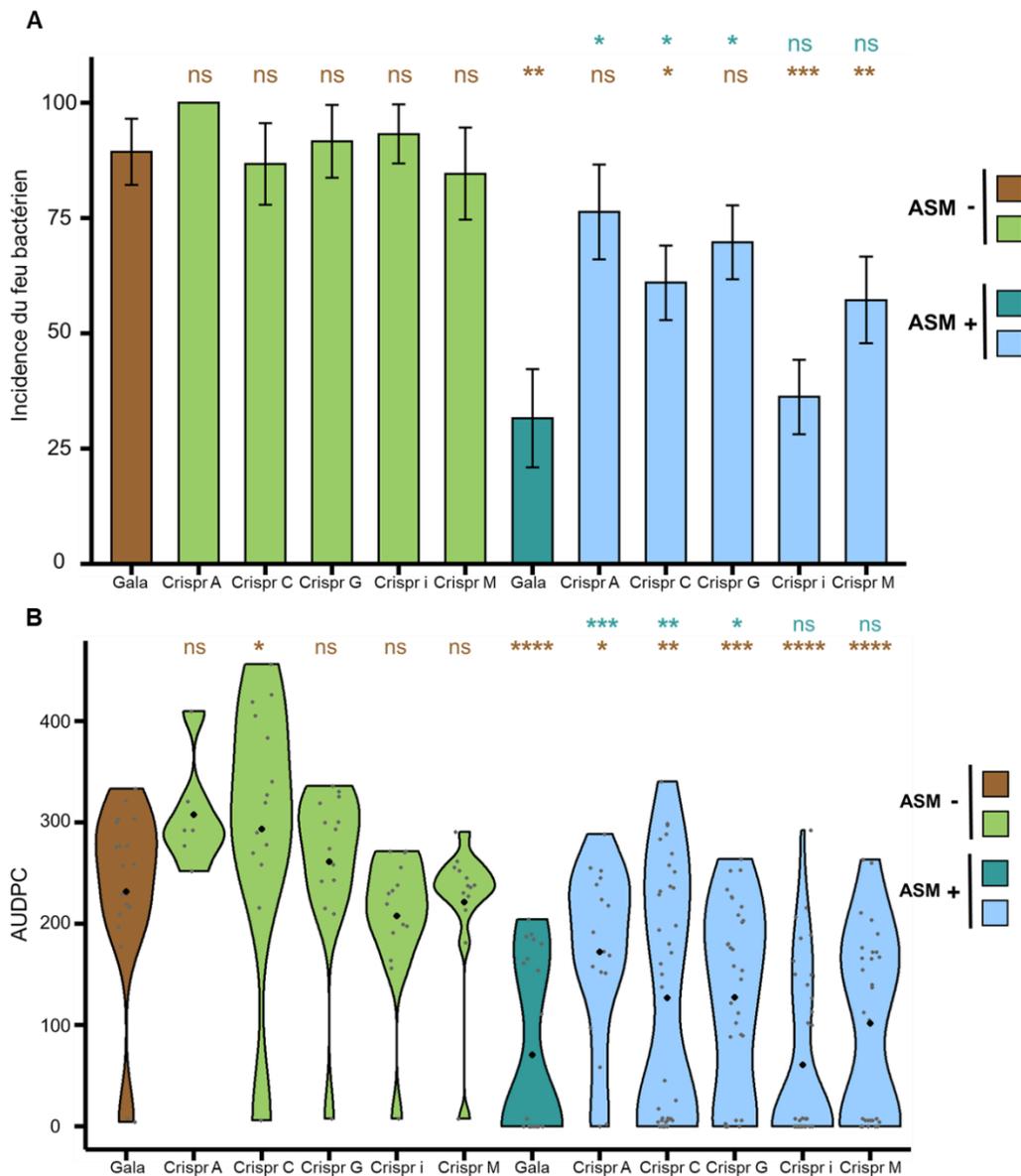
Les éditions des séquences codantes des *MdAGGs* chez les lignées Crispr A, C, i et M se confirment au niveau protéique, analyse qui rend compte cette fois-ci des trois types d'éditions. En effet, au niveau

protéique, on ne détecte des MdAGGs que chez la lignée Crispr G traitée à l'ASM, confirmant le faible taux d'édition observé (**Figure 29**).



**Figure 29 : Accumulation des protéines MdAGGs lors de l'essai en serre de 2022 chez les lignées Crispr 3 jours après un traitement à l'ASM.** Sens. (respectivement Res.) correspond au témoin sensible (respectivement résistant). (A) Membrane après transfert vérifiant l'homogénéité de la quantité de protéines présente dans chaque puit. La membrane est colorée avec un filtre rendant un aspect de coloration au bleu de Coomassie. (B) Immunodétection sur membrane des MdAGGs (↔). Il y a environ 15 µg de protéines totales par puit.

Du point de vue du comportement de ces lignées en condition d'infection par la bactérie, nous avons pu observer que pour les lignées Crispr A, C, G et M traitées à l'ASM, l'incidence de la maladie était supérieure à celle du témoin résistant, de manière significative pour les trois premières lignées. Ce n'était pas le cas pour la lignée Crispr i traitée à l'ASM. L'incidence mesurée sur les lignées Crispr A & G traitées à l'ASM est même équivalente à celle mesurée chez le témoin sensible. L'incidence du feu bactérien sur les lignées Crispr C et M est quant à elle intermédiaire entre les témoins sensible et résistant (**Figure 30-A**). Des observations similaires à celles pour l'incidence sont faites lorsqu'on s'intéresse à la sévérité du feu bactérien sur ces lignées, si cela n'est que les lignées Crispr A et G traitées à l'ASM ne sont pas aussi sévèrement touchées que le témoin sensible contrairement à ce qui avait été vu pour l'incidence (**Figure 30-B**).



**Figure 30 : Incidence et sévérité du feu bactérien chez les lignées éditées traitées ou non à l’ASM lors de l’essai en serre de 2022. (A)** Valeur moyenne de l’incidence 21 jours après inoculation, obtenue par Bootstrap. Les barres d’erreurs correspondent à l’erreur standard. Significativité du test de Student : \*\*\*P<0,001 ; \*\*P<0,01 ; \*P<0,05 ; ns non significatif. **(B)** Valeur de l’(Area Under Disease Progression Curve) AUDPC 21 jours après inoculation. Chaque point gris représente un échantillon et le losange noir correspond à l’AUDPC moyenne. Pour les tests statistiques, les indications **en bleu** représentent des comparaisons avec le ‘Gala’ traité à l’ASM et les indications **en marron** représentent des comparaisons avec le ‘Gala’ non traité à l’ASM. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \*\*\*\*P<0,0001 ; \*\*\*P<0,001 ; \*\*P<0,01 ; \*P<0,05 ; ns non significatif.

On observe donc plusieurs tendances suite à ce premier essai :

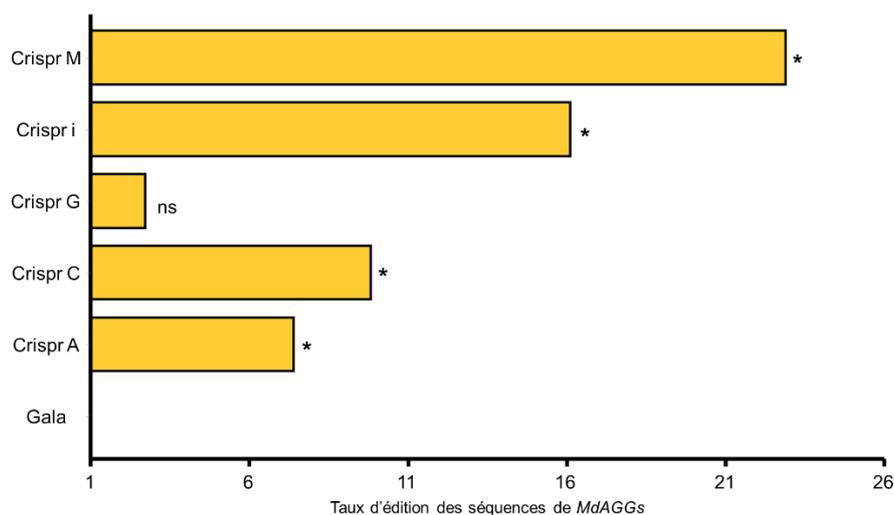
- La mesure de l’accumulation de transcrits de *MdAGGs* chez les lignées Crispr A ; C & M suggère que la majorité des séquences des *MdAGGs* transcrites suite à un traitement à l’ASM ont été éditées par CRISPR/Cas9. Ces éditions empêchent la détection de *MdAGGs* par Western

Blot et ont un impact sur le phénotype de la plante après une infection par *Ea*, puisque l'incidence et la sévérité du feu bactérien chez ces lignées traitées à l'ASM est intermédiaire par rapport à celles observées chez les témoins sensible et résistant (hormis pour l'incidence des lignées Crispr A qui est équivalente à celle observée pour le témoin sensible).

- La lignée Crispr G semble avoir subi peu d'édits. Nous observons chez cette lignée une accumulation des MdAGGs suite à un traitement à l'ASM. Cette lignée semble néanmoins peu protégée par l'ASM vis-à-vis d'*Ea*, du point de vue de l'incidence, et de manière intermédiaire du point de vue de la sévérité de la maladie.
- Comme pour les lignées Crispr A ; C & M, la lignée Crispr i ne semble posséder quasiment plus aucune séquence non éditée de *MdAGGs* transcrite suite à un traitement à l'ASM. Cependant, malgré l'absence de détection de MdAGGs par Western Blot chez cette lignée après un traitement à l'ASM, l'incidence et la sévérité du feu bactérien restent équivalentes à celles observées chez le témoin résistant.

Lors du second essai phénotypique en 2023, nous n'avons pas réitéré de génotypage qualitatif, mais nous avons refait les dosages qPCR sur ADN<sub>g</sub> et ADN<sub>c</sub> de manière à vérifier si une évolution (augmentation) du taux d'édition était observable, un an après le premier génotypage.

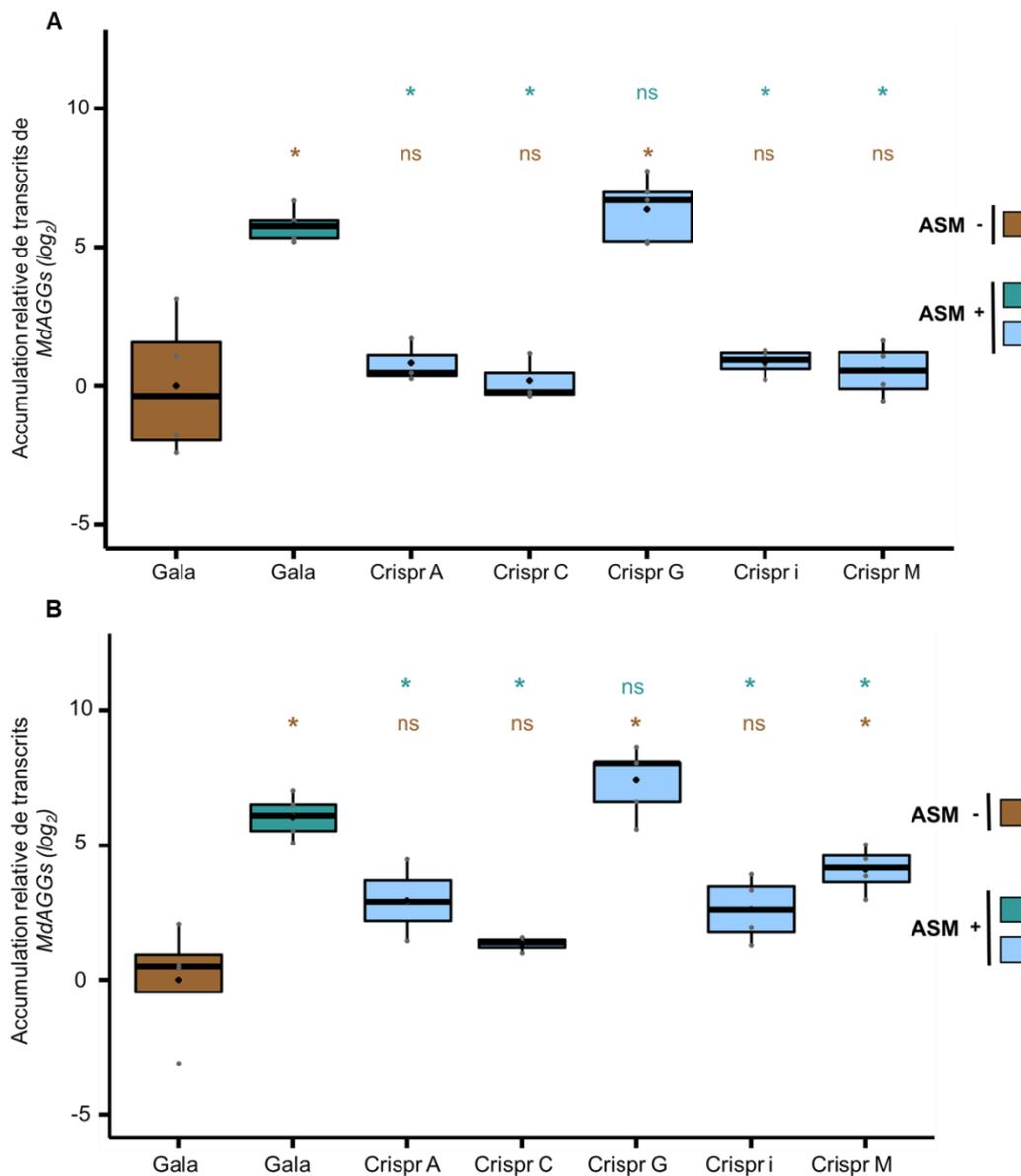
En 2023 comme en 2022, par rapport au témoin, nous avons encore mesuré moins de séquences de *MdAGGs* non éditées chez toutes les lignées Crispr, hormis chez la lignée Crispr G (**Figure 31**). Le faible nombre de mesure (n=3) ne nous permet pas de discriminer statistiquement les lignées Crispr entre elles, mêmes si on peut observer, en valeur absolue, un plus fort taux d'édits chez les lignées Crispr i & M par rapport aux lignées Crispr A & C. Ce qui était déjà le cas pour la lignée M en 2022.



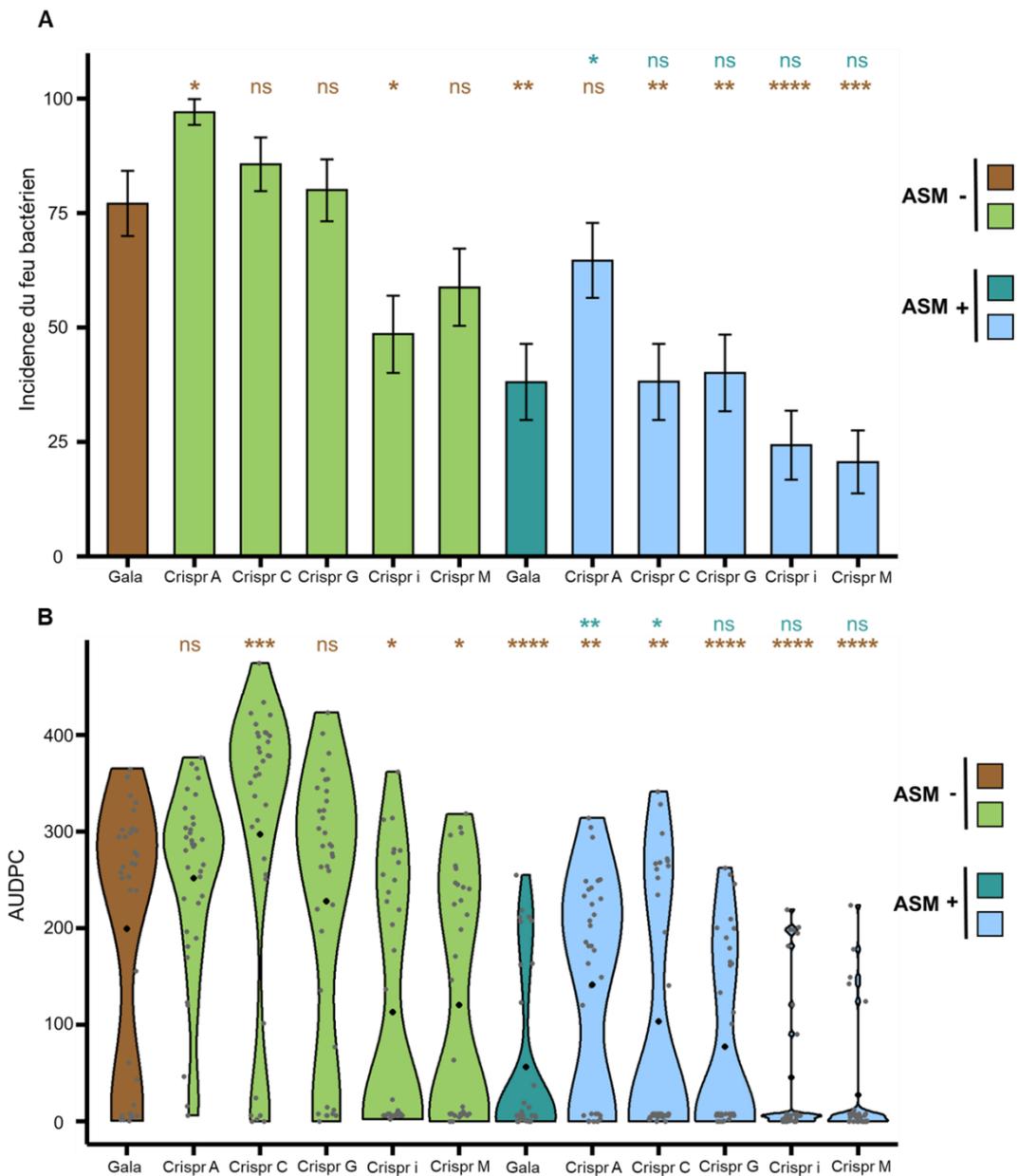
**Figure 31 : Quantification moyenne du taux d'édition des séquences des *MdAGGs* chez les différentes lignées Crispr en 2023.** Le taux d'édition correspond à  $(1/\text{Quantité d'ADN mesurée par qPCR correspondant aux séquences non éditées des } MdAGGs)$ . La valeur représentée est la moyenne mesurée chez 3 échantillons. Les données sont comparées par rapport à un 'Gala' non édité, considéré comme le témoin. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

Tout comme en 2022, les observations faites sur ADNg se retranscrivent au niveau de l'accumulation des transcrits de *MdAGGs*, au niveau de laquelle nous avons observé qu'à l'exception de la lignée Crispr G, cette accumulation chez les lignées Crispr traitées à l'ASM était significativement moins importante que celle mesurée chez le témoin résistant, en prenant en compte les trois types d'édérations (**Figure 32-A**), ou uniquement les éditions de type C (**Figure 32-B**). On observe également que pour les lignées Crispr A, C, i & M traitées, l'accumulation de transcrits de *MdAGGs* est significativement équivalente au témoin sensible, avec le couple qEdABC et avec le couple qEdC pour trois d'entre elles, Crispr M n'étant pas significativement équivalente au témoin sensible. Ce résultat pourrait suggérer que d'autres éditions de type C ont eu lieu chez la lignée Crispr C sur l'année écoulée et qu'elles ont permis d'atteindre un niveau d'accumulation de transcrits aussi faible que celui du témoin sensible, malgré le traitement à l'ASM. Du fait d'une accumulation de transcrits intermédiaire entre les témoins sensible et résistant chez la lignée Crispr M mesurée avec le couple d'amorce qEdC (**Figure 32-B**), il semblerait y avoir moins d'édérations de type C chez cette lignée par rapport aux lignées Crispr A, C & i.

Du point de vue du comportement de ces lignées en condition d'infection par la bactérie en 2023, nous avons pu observer que pour la lignée Crispr A traitée à l'ASM, l'incidence de la maladie était significativement supérieure à celle du témoin résistant, ce qui n'était pas le cas pour les autres lignées traitées à l'ASM (**Figure 33-A**). Lorsqu'on s'intéresse à la sévérité du feu bactérien sur les lignées traitées à l'ASM (**Figure 33-B**), on observe que contrairement aux lignées Crispr G, i et M, les lignées Crispr A et C sont significativement plus sévèrement touchées que le témoin résistant, mais pas autant que le témoin sensible. Du point de vue de l'incidence de la maladie, on peut également remarquer la plus grande sensibilité de la lignée Crispr A non traitée à l'ASM par rapport au témoin sensible. A l'inverse, la lignée Crispr i non traitée à l'ASM est moins sensible que le témoin sensible (**Figure 33-A**). Concernant la sévérité des lignées Crispr non traitées à l'ASM, on peut noter l'attaque plus sévère du feu bactérien sur la lignée Crispr C alors que l'infection semble moins sévère chez les lignées Crispr i & M par rapport au témoin sensible (**Figure 33-B**).



**Figure 32 : Accumulation relative des transcrits *MdAGGs* chez les lignées Crispr après un traitement à l'ASM lors de l'essai en serre de 2023. (A) Accumulation des transcrits *MdAGGs* dans les lignées et le témoin 'Gala' traité à l'ASM, relativement au témoin non traité en utilisant le couple d'amorces qEdABC. (B) Accumulation des transcrits *MdAGGs* dans les lignées et le témoin 'Gala' traité à l'ASM, relativement au témoin non traité en utilisant le couple d'amorces qEdC. Dans les deux graphiques, chaque point correspond à un échantillon dont la valeur correspond à la différence entre l'accumulation de transcrits de *MdAGGs* mesurée dans cet échantillon et la valeur moyenne d'accumulation de transcrits mesurée chez la lignée correspondante non traitée à l'ASM. Le losange noir représente l'accumulation moyenne. Pour les tests statistiques, les indications en bleu représentent des comparaisons avec le 'Gala' traité à l'ASM et les indications en marron des comparaisons avec le 'Gala' non traité à l'ASM. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.**



**Figure 33 : Incidence et sévérité du feu bactérien chez les lignées éditées traitées ou non à l’ASM lors de de l’essai en serre de 2023. (A)** Valeur moyenne de l’incidence 21 jours après inoculation, obtenue par Bootstrap. Les barres d’erreurs correspondent à l’erreur standard. Significativité du test de Student : \*\*\*\*P<0,0001 ; \*\*\*P<0,001 ; \*\*P<0,01 ; \*P<0,05 ; ns non significatif. **(B)** Valeur de l’AUDPC 21 jours après inoculation. Chaque point gris représente un échantillon et le losange noir correspond à l’AUDPC moyenne. Pour les tests statistiques, les indications **en bleu** représentent des comparaisons avec le ‘Gala’ traité à l’ASM et les indications **en marron** représentent des comparaisons avec le ‘Gala’ non traité à l’ASM. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \*\*\*\*P<0,0001 ; \*\*\*P<0,001 ; \*\*P<0,01 ; \*P<0,05 ; ns non significatif.

Suite à cette seconde caractérisation phénotypique en 2023, on observe 5 tendances :

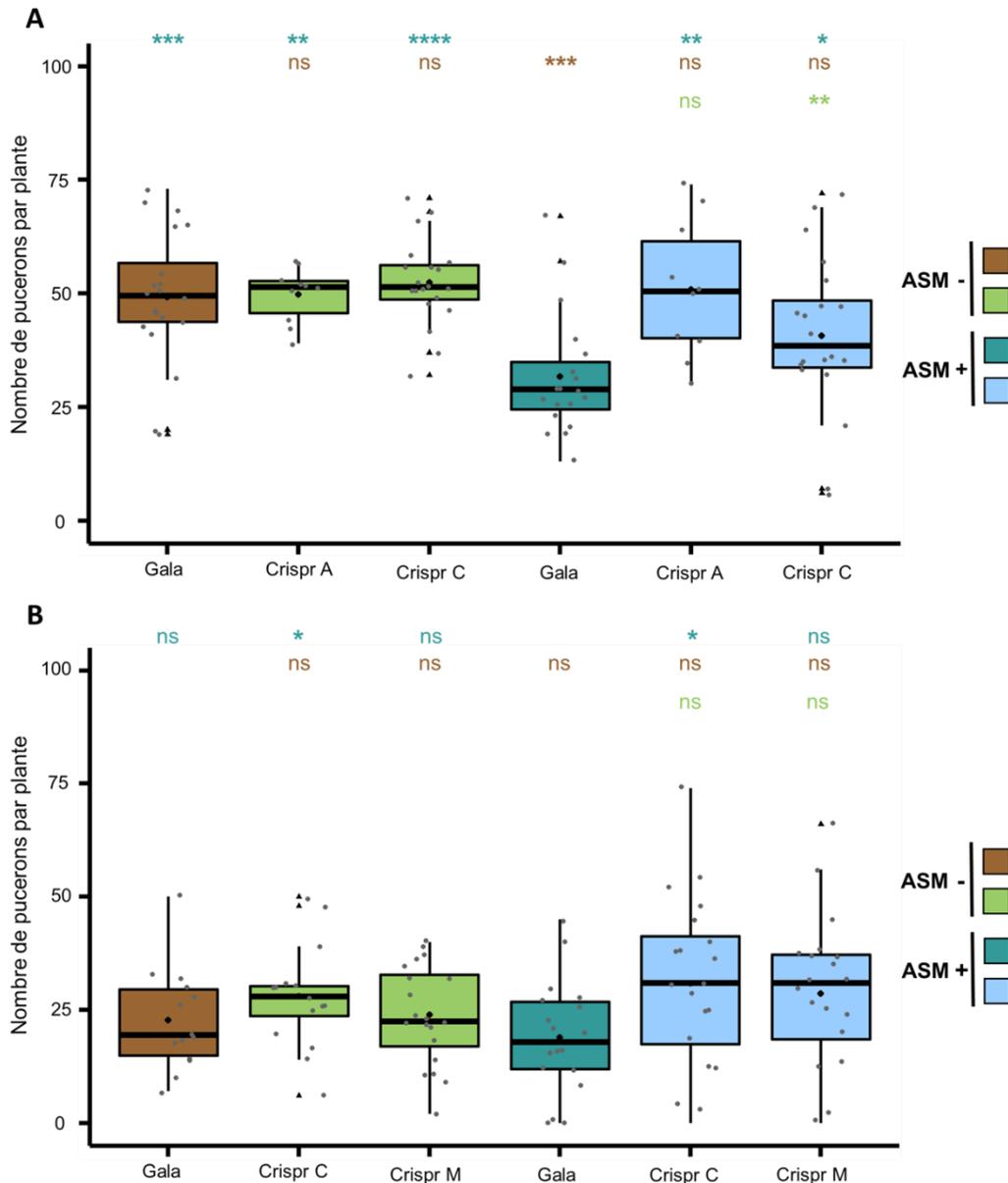
- Le niveau d'accumulation de transcrits de *MdAGGs* suite à un traitement à l'ASM chez la lignée Crispr A est identique à celui du témoin sensible. Cette observation se traduit par une incidence et une sévérité de la maladie équivalentes à celles du témoin sensible, comme en 2022.
- Suite au traitement à l'ASM, on peut noter l'absence de transcrits de *MdAGGs* non édités chez la lignée Crispr C. Cependant, chez cette lignée, l'incidence de la maladie post traitement à l'ASM reste cette année équivalente à celle du témoin résistant (alors qu'elle était différente en 2022) mais la sévérité reste tout de même intermédiaire par rapport à celles des témoins sensible et résistant.
- On observe toujours peu d'édits chez la lignée Crispr G. Par ailleurs, en 2023, l'ASM conserve son pouvoir protecteur chez cette lignée, que ce soit au niveau de l'incidence ou de la sévérité de la maladie, ce qui n'était pas le cas en 2022.
- La tendance observée pour l'accumulation de transcrits post traitement à l'ASM chez la lignée Crispr i en 2023 est identique à celle observée chez la lignée Crispr C, par contre chez cette lignée, les éditions de séquence des *MdAGGs* ne semblent toujours pas avoir d'impact sur le phénotype des plantes post infection, comme en 2022.
- Enfin, la tendance observée pour l'accumulation de transcrits post traitement à l'ASM chez la lignée Crispr M en 2023 est identique en tout point à ce qui a été observé lors de la première caractérisation en 2022. Au niveau phénotypique, les éditions de la séquence des *MdAGGs* ne semblent plus avoir d'impact sur le phénotype des plantes post infection, contrairement à 2022 où l'incidence et la sévérité étaient intermédiaires pour cette lignée, bien que non significativement.

### 1.3. Caractérisation phénotypique des lignées Crispr vis-à-vis du puceron cendré

En plus de conférer une résistance à *Ea*, le traitement à l'ASM de semis de pommiers les rend plus tolérants au puceron cendré (Warneys et al, 2018). Nous avons donc voulu vérifier *in planta* si les altérations observées pour certains traits de vie de *Dp* étaient dues aux *MdAGGs*. Nous avons ainsi utilisé certaines des lignées Crispr pour tenter de répondre à la question suivante : les lignées éditées pour les *MdAGGs* sont-elles moins tolérantes aux attaques de *Dp*, malgré un traitement à l'ASM ?

Les résultats du test de 2022 ont montré que le nombre de pucerons comptés chez les lignées Crispr A et C, traités à l'ASM, est significativement supérieur à celui compté sur le témoin résistant (**Figure 34-A**). On remarque également qu'il n'y a pas de différence significative du nombre de pucerons chez la lignée Crispr A traitée ou non, alors que ce nombre est significativement inférieur pour la lignée Crispr C traitée à l'ASM versus non traitée. Les plantes utilisées pour cet essai sont issues de la même acclimatation que les plantes ayant servi à faire la première caractérisation des lignées Crispr vis-à-vis

du feu bactérien (cf. chapitre 1 ; partie 1.2) On peut donc supposer que l'accumulation de transcrits de MdAGGs ainsi que l'accumulation protéique sont identiques dans la caractérisation de ces lignées vis-à-vis du puceron par rapport à la caractérisation vis-à-vis du feu bactérien. Les résultats de ce premier essai montrent donc que les MdAGGs sont impliquées dans la résistance au puceron cendré, en plus de la résistance au feu bactérien.



**Figure 34 : Boxplots représentant le nombre de pucerons dénombrés 10 jours après infestation. (A)** correspond au dénombrement lors de la première caractérisation en 2022 et **(B)** correspond à la seconde caractérisation en 2023. Chaque point gris représente le nombre de pucerons sur une plante, les triangles noirs représentent les valeurs considérées comme aberrantes et le losange noir correspond au nombre moyen de pucerons pour la modalité correspondante. Pour les tests statistiques, les indications **en bleu** représentent des comparaisons avec le ‘Gala’ traité à l’ASM, les indications **en marron** représentent des comparaisons avec le ‘Gala’ non traité à l’ASM et les valeurs **en vert** sont comparées à la même lignée non traitée à l’ASM. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \*\*\*\* $P < 0,0001$  ; \*\*\* $P < 0,001$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

Les résultats du test en 2023 ne sont malheureusement pas exploitables. En effet, on remarque qu'il n'y a pas de différences significatives du nombre de pucerons compté entre les témoins sensible et résistant (**Figure 34-B**). En comparant les témoins sensibles de la première et de la seconde caractérisation, on peut noter que le nombre moyen de pucerons dénombré est 2 fois plus faible dans la caractérisation de 2023, par rapport à celle de 2022. Par ailleurs, le nombre moyen de pucerons comptés sur le témoin résistant est quasiment identique entre les deux caractérisations. En 2023, l'état physiologique des plantes les rendaient équivalentes à des témoins résistants traités à l'ASM, empêchant donc de tester l'implication des MdAGGs dans la résistance contre *Dp*.

#### 1.4. Discussion

Dans cette partie, nous voulions vérifier si la famille des MdAGGs était impliquée dans la résistance à deux bioagresseurs du pommier : *Ea* et *Dp*.

Avant d'entrer dans les détails des deux caractérisations, on peut noter que la caractérisation phénotypique de 2023 a été faite dans des conditions moins optimales que celle de 2022. En effet, lors de la caractérisation de 2023, on peut observer que la lignée Crispr i non traitée à l'ASM a une incidence et une sévérité du feu bactérien significativement inférieure à celle du témoin sensible (**Figure 33**). De plus, entre les deux essais, les valeurs moyennes de l'incidence et de la sévérité ont diminué chez le témoin sensible, et c'est également le cas pour la sévérité chez le témoin résistant. Cette baisse peut être expliquée par une concentration d'inoculum inférieure à l'attendue :  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Une seconde hypothèse peut être que les plantes du second essai étaient dans un meilleur état physiologique pour se défendre contre *Ea* lors de l'inoculation. En 2023, un traitement contre l'oïdium a été réalisé 7 jours avant l'inoculation d'*Ea*, à cause de la présence du champignon sur certaines plantes, élicitant peut-être certains gènes impliqués dans la défense contre *Ea*. Enfin, l'efficacité de l'ASM sur le premier essai est de 65% et est de 50% sur le second essai. Même si ces deux valeurs sont différentes, plusieurs études portant sur l'efficacité de protection de l'ASM en conditions contrôlées donnent des efficacités de protection aux environs de 60% contre le feu bactérien (Marolleau et al, 2014 ; Chavonet et al, 2022). L'ASM ne semble donc pas être à l'origine de cette baisse d'infection.

Malgré cela, les tendances observées en 2022 demeurent en 2023, même si les résultats ne sont plus significatifs pour certaines lignées. Chez les lignées Crispr A & C, le niveau d'éditions de séquence des MdAGGs mesuré *via* l'accumulation de transcrits montre que quasiment toutes les MdAGGs semblent avoir subi une édition et ne sont donc plus fonctionnelles, puisque l'accumulation de transcrits chez ces lignées est équivalente à celle du témoin sensible (**Figure 28**). Au niveau phénotypique, et quelle que soit l'année, les lignées Crispr A & C sont moins résistantes que le témoin résistant voire aussi sensible que le témoin sensible au feu bactérien dans les deux essais, hormis pour l'incidence du feu bactérien chez la lignée Crispr C lors du second essai, sans doute expliquée par l'inoculum plus faible (**Figure 30 & 33**). Cette association apparente entre l'augmentation de l'incidence et de la sévérité de la maladie

d'une part et la baisse de l'accumulation de transcrits d'autre part, démontre bien *in planta* l'implication globale de la famille des *MdAGGs* dans la résistance au feu bactérien.

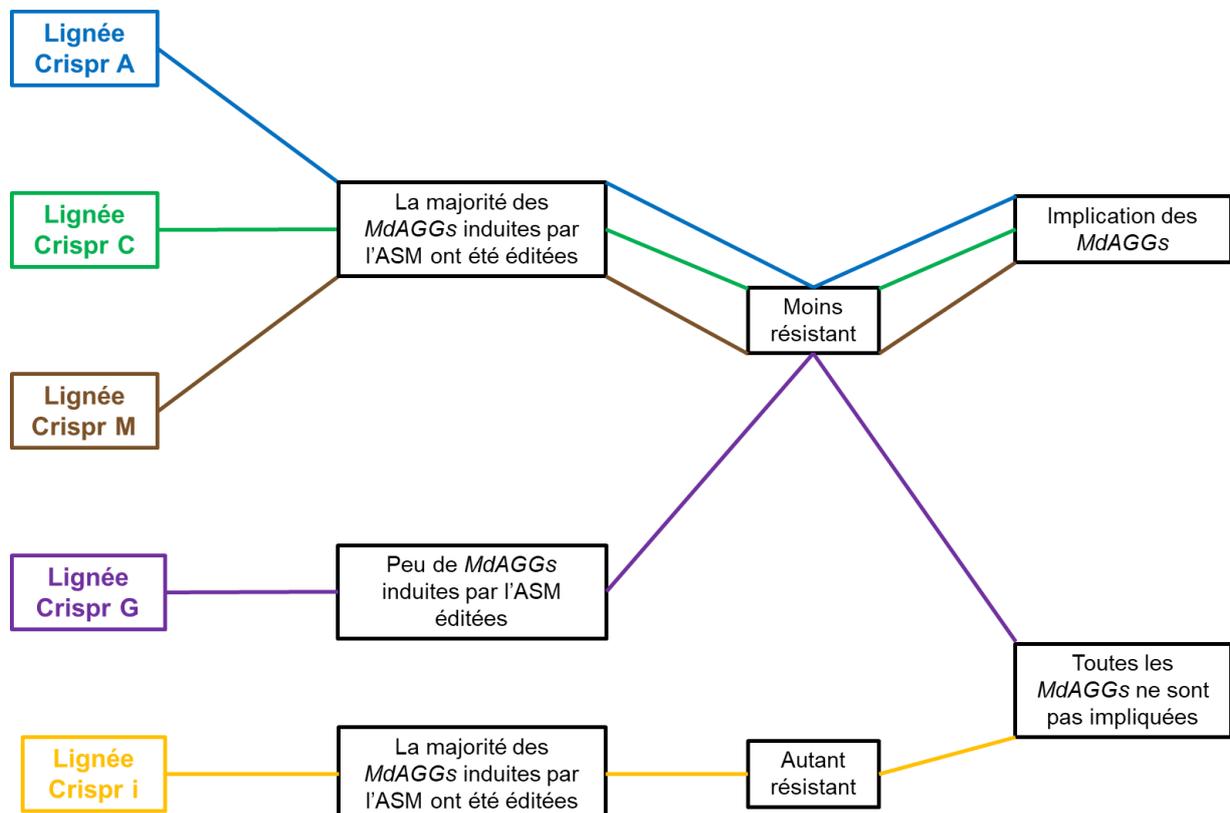
La lignée Crispr G peut potentiellement nous donner un peu plus d'indices sur l'implication de certains membres de la famille des *MdAGGs* dans la résistance au feu bactérien. En effet, lors de la première caractérisation de cette lignée, nous avons observé peu d'édérations de séquences de *MdAGGs*, la révélation par Western Blot a montré la présence de *MdAGGs*, tout en observant une perte du pouvoir protecteur de l'ASM contre le feu bactérien. Pour le second essai, le phénotype de cette lignée après infection est équivalent au témoin résistant mais la proximité de la valeur moyenne de la sévérité par rapport aux lignées Crispr A & C, ayant une résistance intermédiaire, nous laisse penser que si l'inoculum avait été plus élevé, on aurait eu une sévérité plus importante chez la lignée Crispr G (**Figure 33-B**). De plus, les résultats de génotypage par séquençage nous ont uniquement montré un indel dans la séquence de *MdAGG14* et la mesure globale du taux d'édition confirme qu'il y a très peu d'édérations des trois types chez cette lignée, que ce soit au cours du premier ou du second essai (**Figure 27, 28, 31, 32**). En accord avec ces résultats, on pourrait faire l'hypothèse qu'une partie seulement des *MdAGGs* pourrait être impliquée dans la résistance contre le feu bactérien, dont *MdAGG14*, et non l'ensemble de la famille. Une étude plus approfondie de *MdAGG14* pourrait être intéressante pour essayer de mieux comprendre le fonctionnement des *MdAGGs* dans cette résistance. Un des moyens serait d'obtenir la protéine recombinante de *MdAGG14* et de faire des études *in vitro* de cette bactérie au contact d'*Ea*, comme nous l'avons fait pour *MdAGG10*.

D'une manière plus globale, les résultats obtenus avec la lignée Crispr i semblent également montrer qu'une partie seulement des *MdAGGs* semblent impliquées dans la défense contre le feu bactérien. Malgré un niveau d'accumulation de transcrits de *MdAGGs* post traitement équivalent au témoin sensible pour les lignées Crispr A, C, i et M, le phénotype post infection de la lignée Crispr i est différent de ces lignées en 2022 et en 2023 (**Figure 30 & 33**). En 2022, le phénotype post infection de la lignée Crispr i est équivalent au témoin résistant alors qu'il est comparable au témoin sensible ou intermédiaire au témoin sensible et résistant pour les trois autres lignées (**Figure 30**). En 2023, même avec un inoculum plus faible, le phénotype post infection de la lignée Crispr i est toujours comparable au témoin résistant alors que celui des lignées Crispr A & C est intermédiaire aux témoins sensible et résistant (**Figure 33**). Ces phénotypes semblent donc montrer que les séquences éditées chez la lignée Crispr i ne participent pas ou très peu à la résistance au feu bactérien, alors que les séquences éditées chez les lignées Crispr A, C et M semblent y participer.

Ces résultats renforcent donc l'hypothèse de l'implication seulement d'une partie de la famille des *MdAGGs*, et non de l'ensemble. Cependant, l'étude de ces lignées ne nous permet pas de conclure plus en détails sur l'implication spécifique de chaque membre de la famille. Nous avons essayé d'aller plus loin dans cette caractérisation en essayant de dessiner des amorces amplifiant spécifiquement chaque membre, et ainsi être en mesure de préciser leur implication, mais sans succès, du fait de la proximité

de séquence trop importante entre les différentes *MdAGGs* (données non présentées). Pour vérifier cette hypothèse, on pourrait aussi réaliser des tests d'agglutination d'*Ea in vitro* avec les différentes *MdAGGs*, seules ou en cocktail, comme Chavonet et al (2022) l'ont fait avec *MdAGG10*. Si des résultats sont concluants avec certaines *MdAGGs*, on pourrait également tester *in vitro* l'effet de ces agglutinations sur la croissance d'*Ea* comme nous l'avons fait dans l'article Bodelot et al (2023).

La caractérisation des lignées Crispr nous permet donc de conclure quant à l'implication des *MdAGGs* dans la résistance au feu bactérien (*via* les résultats des lignées Crispr A, C et M). Nous avons également pu obtenir d'autres informations semblant montrer une implication d'une partie seulement de la famille des *MdAGGs* dans cette résistance, à un niveau global (*via* les résultats obtenus sur la lignée Crispr i) ou à un niveau plus qualitatif (*via* les résultats obtenus avec la lignée Crispr G). Un schéma récapitulatif des informations données par les lignées Crispr concernant l'implication des *MdAGGs* dans la résistance au feu bactérien est présenté dans la **figure 35**.



**Figure 35 : Schéma récapitulatif des informations apportées par les lignées Crispr sur l'implication des *MdAGGs* dans la résistance au feu bactérien.** Le statut de résistance des lignées est donné par rapport au témoin résistant.

L'implication des *MdAGGs* dans la résistance contre le puceron cendré semble aussi être vérifiée (**Figure 34-A**). On observe que l'ASM n'affecte pas autant les traits de vie de *Dp* chez les lignées Crispr A et C, que chez le témoin résistant. De nombreuses études ont déjà montré l'implication des lectines

dans la défense contre les pucerons. Lorsqu'*Acyrtosiphon pisum* ingère les lectines ASAI et ASAI, Fitches et al (2008) ont observé une mortalité des pucerons équivalente à celle observée lors d'une situation où ce dernier n'avait pas accès à une alimentation. Une des hypothèses de l'auteur pour expliquer l'effet insecticide de ces lectines est qu'elles pourraient se fixer à deux protéines présentes dans le système digestif de l'insecte et les empêcheraient de fonctionner, entraînant une absence d'alimentation. Ces deux protéines sont la saccharase, une enzyme présente dans l'intestin des insectes et scindant le saccharose en glucose et en fructose (Fisher et al, 1984), et l'alanine aminopeptidase, une enzyme permettant l'hydrolyse de la portion N terminale du reste d'un peptide, présente également dans l'intestin des insectes (Cristofolletti et al, 2006). Ces deux enzymes ont un domaine glycosylé, permettant la fixation des lectines ASAI et ASAI (Fitches et al, 2008). Toutefois, notre essai de 2022 ne permet pas de conclure ou d'émettre des hypothèses concernant un éventuel mode d'action distinct entre les différentes MdAGGs, dans la résistance à *Dp*. Les plantes des lignées Crispr A & C phénotypées dans cet essai sont issues de la même acclimatation que les plantes phénotypées post infection par *Ea* la même année. On peut donc faire l'hypothèse que le niveau d'édition des MdAGGs quantifié dans la partie 1.2 est identique chez les plantes de cet essai et ce niveau d'édition n'est pas différent entre les lignées Crispr A & C.

Pour le second essai, le nombre moyen de pucerons par plante présents sur les témoins sensible et résistant étant équivalent en fin d'essai, il est impossible d'interpréter les résultats. Lors de la seconde acclimatation, il y a eu un problème d'arrosage des plantes, entraînant un stress hydrique le jour du traitement à l'ASM, trois jours avant l'infestation. Ce stress a sans doute eu un impact sur l'efficacité de l'ASM, mais également directement sur le puceron. En effet, le stress hydrique peut être détecté par le puceron qui ne se reproduira pas sur les plantes concernées et cherchera à en rejoindre d'autres pour le faire (Leybourne et al, 2021). Cette explication est étayée par le nombre moyen de pucerons comptés en fin d'essai sur les témoins sensibles: il y a deux fois moins de pucerons sur les témoins sensibles du deuxième essai que sur les témoins sensibles du premier (**Figure 34**).

Un deuxième essai impliquant les autres lignées Crispr permettrait de renforcer les résultats du premier essai et d'affirmer avec plus de certitudes l'implication *in planta* des MdAGGs dans la résistance contre *Dp*. Pour ce second essai, le choix doit se porter sur des lignées Crispr ayant des niveaux d'éditions différents (au niveau de l'ADNg et de l'ADNc), ce qui nous permettrait d'en apprendre plus sur l'aspect quantitatif ou non de cette implication, et éventuellement sur des aspects qualitatifs : implication préférentielle de certains membres de la famille. Dans le cas où ces résultats seraient confortés, il resterait encore à identifier le(s) ligand(s) des MdAGGs chez *Dp*, expliquant l'effet insecticide.

## **2. Analyse par gain de fonction à l'aide de lignées surexpresseurs : la surexpression de la lectine *MdAGG10* de pommier, ne confère pas de résistance à deux bactéries pathogènes et au puceron cendré**

### **2.1. Caractérisation de *MdAGG10* *in vitro* et *in planta* pour son implication dans la résistance à certaines bactéries pathogènes**

L'objectif de ce travail, qui a fait l'objet d'un article (Bodelot et al, 2023) était double : d'une part étudier le pouvoir agglutinant de *MdAGG10* *in vitro*, sur un large spectre de bactéries pathogènes, des plantes comme de l'Homme, et d'autre part de poursuivre la caractérisation fonctionnelle *in planta* des agglutinines *via* cette fois-ci l'utilisation de lignées transgéniques de pommier ou d'*Arabidopsis* surexprimant de manière constitutive *MdAGG10* (lignées appelées « OE » par la suite). La première sous partie correspond à mon article publié dans *Journal of Plant Pathology* et la seconde sous partie comporte des études supplémentaires sur les lignées OE, réalisées notamment pour tester des hypothèses soulevées en discussion dans l'article.

#### **2.1.1. La surexpression de la lectine *MdAGG10* de pommier, à large spectre d'agglutination, ne confère pas de résistance au feu bactérien ou à la pourriture bactérienne**



# Overexpression of an apple broad range agglutinating lectin does not promote *in planta* resistance to fire blight and bacterial wilt

Antoine Bodelot<sup>1</sup> · Erwan Chavonet<sup>1</sup> · Marie Noelle Brisset<sup>1</sup> · Nicolas Dousset<sup>1</sup> · Elisa Ravon<sup>1</sup> · Christelle Heintz<sup>1</sup> · Richard Berthomé<sup>2</sup> · Matilda Zaffuto<sup>2</sup> · Marie Kempf<sup>3,4</sup> · Mélanie Foulon<sup>3</sup> · Estelle Marion<sup>3</sup> · Emilie Vergne<sup>1</sup> · Alexandre Degrave<sup>1</sup>

Received: 17 April 2023 / Accepted: 19 July 2023

© The Author(s) under exclusive licence to Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2023

## Abstract

Lectins, a large group of proteins present in all kingdoms of life can bind reversibly to glycans. The roles of plant lectins are diverse and include resistance to biotic or abiotic stress, notably bacterial resistance. A gene family encoding amaranthin-like lectins termed MdAGGs in apple (*Malus domestica*) has been identified to be overexpressed upon treatment with the plant resistance inducer acibenzolar-S-methyl (ASM) which promotes enhanced resistance to the fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* (*Ea*). In this study, we first screened the ability of purified MdAGG10 to agglutinate bacterial cells *in vitro* among a range of bacterial species. Several bacterial species, either Gram positive or negative, either plant- or human-pathogens were found to be agglutinated by MdAGG10 in acidic conditions. Apple and Arabidopsis lines constitutively overexpressing *MdAGG10* were generated and evaluated for their resistance to, respectively, *Ea* and *Ralstonia solanacearum*, both plant pathogens that were found in our screening. Despite MdAGG10 protein accumulated in tissues of both apple and Arabidopsis lines, they remained susceptible to their respective pathogens. Interestingly, *in vitro* agglutination of *Ea* by MdAGG10 did not impair bacterial growth, suggesting that other plant molecules are involved in the resistance to fire blight triggered after an ASM treatment.

**Keywords** *Erwinia amylovora* · *Ralstonia solanacearum* · *Malus domestica* · *Arabidopsis thaliana* · Amaranthin-like lectin

## Introduction

Lectins are a large protein family with at least one non-catalytic site recognizing and binding reversibly to mono- or oligosaccharides (Peumans and Van Damme 1995). Present in all kingdoms of life, lectins can be classified according to their subcellular localization, their

carbohydrate-recognition domain or their abundance in organisms (Tsaneva and Van Damme 2020). Indeed, some lectins are produced constitutively and stored in plant vacuoles (Van Damme et al. 1998), but expression of other is induced only when organisms are subjected to abiotic or biotic stress in plants (Jiang et al. 2010; Vandendorre et al. 2011), or during interaction with pathogenic bacteria, parasite or virus in animals (Coelho et al. 2017). In plants, membrane-bound receptor-like kinases harbouring extracellular lectin domains to recognize specific carbohydrates of pathogens and trigger defense responses have received extensive interest (Bellande et al. 2017). In contrast, defense-inducible lectins that do not display features of receptor-like kinase are less studied, although they can be involved in downstream immune responses as PR-like proteins (De Coninck and Van Damme 2021).

In *Malus domestica*, the application of the synthetic functional analogue of salicylic acid called acibenzolar-S-methyl (ASM) induces the expression of such PR-like lectins. In particular a 17-members lectin family called agglutinins

✉ Alexandre Degrave  
alexandre.degrave@agrocampus-ouest.fr

<sup>1</sup> Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

<sup>2</sup> LIPME, INRAE, CNRS, Université de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup> UMR 1302, Univ Angers, Nantes Université, CHU Angers, INSERM, CNRS, Immunology and New Concepts in ImmunoTherapy, INCIT, F-49000 NantesAngers, France

<sup>4</sup> Département de Biologie des Agents Infectieux, UF de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Angers, Angers, France

(MdAGG1 to MdAGG18) has been found to be highly over-expressed upon ASM treatment (Warneys et al. 2018). MdAGGs belong to the amaranthin family, one of the twelve lectin families described by Van Damme et al. (2008), and are composed of a unique amaranthin-like lectin domain. Proteins with one or more amaranthin domains are found in several plant species (Dang et al. 2017) but not in *Arabidopsis thaliana* (Eggermont et al. 2017). Among MdAGGs, MdAGG10 is one of the most ASM-induced gene and it shares the highest percentage of identity with the consensus sequence of these agglutinins (Warneys et al. 2018). MdAGGs expression and accumulation in leaf tissues as a result of ASM treatment are associated with a higher resistance to rosy aphid (*Dysaphis plantaginea*) and *Erwinia amylovora* (*Ea*), the causal agent of fire blight in susceptible *M. domestica* cultivars (Warneys et al. 2018; Chavonet et al. 2022).

*Ea* is a devastating Gram negative enterobacterium that infects members of the Rosaceae family by entering aerial part of the plant through natural openings and wounds (Thomson 2000). Low pH and low nutrients conditions are needed for the expression of *Ea* virulence factors (Wei et al. 1992). The bacteria produce exopolysaccharides (EPS), glycans of high molecular weight composed of repeated units which are essential for their pathogenicity (Bellemann and Geider 1992; Nitz et al. 1996). EPS can either be bound to the external membrane of bacteria, forming the capsule, or released as free EPS at the vicinity of the bacteria (Bennett and Billing 1980). Like for other Gram negative bacteria, the outer membrane of *Ea* contains lipopolysaccharides (LPS), divided in three portions: (1) a phospholipidic membrane-anchoring portion called lipid A which is bound to (2) a core region composed of oligosaccharides, and (3) the extreme portion of LPS called the O-antigen, formed of repeated chains of polysaccharides (Alexander and Rietschel 2001; Varbanets et al. 2003). LPS is involved in *Ea* virulence and contributes to protect bacterial cells from the oxidative burst triggered within its host during the infection process (Venisse et al. 2001; Berry et al. 2009). *In vitro* experiments have demonstrated that *Ea* cells devoid of free EPS or affected in EPS biosynthesis can be agglutinated by MdAGG10, suggesting that both EPS and LPS are targeted by this apple lectin. Moreover, the agglutination of *Ea* by MdAGG10 occurs only when the pH is below 4.8, acidic conditions that are reminiscent of those encountered by the bacteria in the apoplast of infected apple leaves (Chavonet et al. 2022).

More generally, EPS is an important pathogenicity factor of many Gram negative phytopathogenic bacterial species such as *Xanthomonas* spp., *Ralstonia* spp. or *Pectobacterium* spp. (Denny 1995; Chan and Goodwin 1999; Islamov et al. 2021). *Ralstonia solanacearum* is the causal agent of bacterial wilt, a disease affecting a large range of plants, including tobacco, tomato, potato and *A. thaliana* (Hayward 1991; Deslandes et al. 2002). The bacteria infect their hosts through the roots

and spread systemically once they reach xylem vessels. As for *Ea*, the EPS of *R. solanacearum* is composed of free and capsuled EPS (McGarvey et al. 1998). Free EPS causes the wilt symptoms by vascular occlusion or rupture of xylem vessels elements due to an excess of hydrostatic pressure. Even if the role of LPS in the virulence of *R. solanacearum* remains unknown, strains synthesizing a LPS modified in its structure turn out to be avirulent (Titarenko et al. 1997).

Studies have substantiated that the overexpression of PR-like lectins confers resistance against biotic and abiotic stress (Xin et al. 2011; Van Holle et al. 2016) including bacteria (Ma et al. 2013). According to our previous results showing that MdAGG10 agglutinates *Ea* cells, we performed an agglutination screening to determine which plant or human pathogenic bacteria are agglutinated *in vitro* by MdAGG10. We next evaluated whether MdAGG10 overexpression increases resistance of the susceptible *M. domestica* ‘Gala’ cultivar to fire blight and if its ectopic expression in *A. thaliana* affects resistance to *R. solanacearum*.

## Materials and methods

### Construction of vectors and plant transformation

The MdAGG10 sequence (MD10G1027210, 498bp) was cloned under the control of the CaMV35s promoter in the Gateway destination vectors pK7WG2D (Karimi et al. 2002) for apple transformation and pGWB2 (Xu et al. 2020) for *A. thaliana* transformation. The final constructs were transformed in *A. tumefaciens* strain EHA105 containing the helper plasmid pBBR-MCS5.

‘Gala’ stable transformation was performed on the youngest leaves of 4 weeks-old unrooted microshoots as described in Malabarba et al. (2020). Briefly, the agroinfiltrated leaves were cultured for 2 days in the dark at 22 °C on regeneration media (4.4 g L<sup>-1</sup> of Murashige & Skoog -MS- Medium -Duchefa Biochemie, BH Harlem, Netherlands-, 30 g L<sup>-1</sup> of saccharose -Duchefa Biochemie, BH Harlem, Netherlands-, 5 mg L<sup>-1</sup> of thidiazuron, 0.2 mg L<sup>-1</sup> of naphthalene acetic acid, solidified with 3 g L<sup>-1</sup> of Phytigel TM -Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA- pH 5.75) and 100 mM of acetosyringone. Leaves were then transferred on a fresh regeneration media complemented with 300 mg L<sup>-1</sup> of cefotaxime, 150 mg L<sup>-1</sup> of timentin and 100 mg L<sup>-1</sup> of kanamycin. The explants were kept in the dark and the appearance of adventitious buds was monitored every month, along with the transfer to fresh medium for a total of 6 months. All regenerated buds were micropropagated on the same medium as their mother plants, with the addition of 300 mg/L cefotaxime, 150 mg/L timentin, and 100 mg/L kanamycin. Transformation with a pCambia2301 plasmid (Gus reporter gene under the control of the CaMV35s promoter; Hajdukiewicz et al. 1994) was used as a control.

'Landsberg' stable transformation was performed as described by Zhang et al. (2006). Briefly, inflorescences were dipped in a suspension of *A. tumefaciens* ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) prepared in reverse osmosis water and complemented with 5% sucrose and 0.002% Silwet. After surface sterilization, the seeds were selected on MS agar plates (4.3 g L<sup>-1</sup> of MS medium, 10 g L<sup>-1</sup> saccharose and solidified with 8.9 g L<sup>-1</sup> of Phytigel TM, pH 5.9) complemented with kanamycin (50 mg L<sup>-1</sup>) at 20 °C with a photoperiod of 16 hours day and 8 hours dark.

### Plant growth conditions and ASM treatment

*In vitro* apple plants ('Gala' -WT- and transgenic lines) were micropropagated as described by Righetti et al. (2014) and the rooting conditions were the same as those reported by Faize et al. (2003). The *in vitro* rooted plants were transferred to the greenhouse and grown under 22 °C, a humidity rate of 80% and a shading of 500 W.m<sup>-2</sup> for 8 weeks before inoculation.

*A. thaliana* ('Landsberg' -WT- and stable F2 generation transgenic lines) seedlings were grown either on MS agar plates in a growth chamber at 20 °C with a photoperiod of 16 hours day and 8 hours dark (transformation) or on potting soil in a growth chamber at 22 °C, with a photoperiod of 16 hours days and 8 hours dark and a humidity rate of 70% (inoculation).

The solution of 0.2 g L<sup>-1</sup> of ASM (Bion<sup>®</sup> 50WG, Syngenta, Basel, Switzerland) was prepared with sterile distilled water and sprayed on plants with a 750 mL hand sprayer.

### Bacterial strains, culture, and inoculum preparation

All the bacterial strains used in this study, the media used for culture, the temperature and the atmosphere of culture are summarized in Supplementary Table 1. The culture conditions were optimal for the synthesis of EPS in all tested bacterial strains, and suspensions were prepared from exponential growth phase cultures cultivated on the appropriate solid medium.

For agglutination tests,  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> bacterial suspensions were prepared in reverse-osmosis. For mucoid bacterial isolates, the free EPS was removed by a 5 minutes centrifugation at 5,000 g and the pelleted bacterial cells were resuspended in reverse osmosis water to  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>.

Apple inoculation was performed with a suspension ( $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>) of the CFBP1430 strain of *Ea* (*Ea* WT) prepared in reverse osmosis water. *A. thaliana* inoculation was performed with a suspension ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) of the *R. solanacearum* wild type strain CFBP6924, as described by Plener et al. (2010),

For growth inhibition test, both strains *Ea* WT and CFPB7939 affected in EPS synthesis (*Ea ams*) were prepared in reverse osmosis water at  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>.

### *In vitro* bacterial agglutination and growth inhibition test

Bacterial suspensions were mixed (v/v) with purified MdAGG10 (40 µg mL<sup>-1</sup>, prepared in 100mM sodium acetate, pH 4) and incubated at room temperature for 30 minutes. Observations were performed on microscope slides with a digital camera (U-CMD3, Olympus, Tokyo, Japan) mounted on a binocular microscope (SZX16, Olympus, Tokyo, Japan).

For growth inhibition tests, bacterial suspensions were incubated during 1 hour in a (v/v) sodium acetate solution (100 mM sodium acetate, pH 4), or in Tris buffer (Tris-HCl, pH 7.5), with the recombinant MdAGG10 protein solution at 40 µg mL<sup>-1</sup> (Chavonet et al. 2022), or with mock (200 mM ammonium sulfate, 20 mM Tris-HCl, pH 8.5). The suspensions were then added (1/9 v/v) into Luria-Broth (Duchefa Biochemie, BH Haarlem, Netherlands) placed in an optical reader Bioscreen C (LabSystems, Helsinki, Finland) at 26 °C under agitation, where OD<sub>600</sub> was measured every 2 hours over a 70 hours culture period.

### DNA extraction and PCR genotyping

Genomic DNA was extracted from plant leaves as previously described by Fulton et al. (1995). The primers described in Table 1 were used to amplify (i) endogenes as markers of plant DNA suitability for PCR (*EF-1α* for apple and *AtCop1* for *A. thaliana*), (ii) the *nptII* transgene, (iii) the 23S ribosomal RNA as a marker of *A. tumefaciens* presence, and (iv) the p35s::MdAGG10 transgene. Amplifications were performed with GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer's recommendations. The PCR reaction conditions were the same for the 5 couples of primers: 95 °C for 5 minutes followed by 35 cycles at 95 °C during 30 seconds, 58 °C during 45 seconds and 72 °C during 60 seconds with a final extension of 5 minutes at 72 °C. PCR products were separated on a 2% agarose gel.

### Plant inoculation and phenotyping

Apple plants (WT and transgenic lines) which have been previously acclimatized as described in section Plant growth conditions and ASM treatment were inoculated by cutting two third of the youngest fully developed leaf with a pair of scissors previously dipped in the inoculum suspension of *Ea*. We inoculated plants which were taller than 20 cm. These outcut leaves were pooled by two and frozen at -80 °C to represent one biological replicate in subsequent analysis. Fire blight symptoms were scored at 4, 7, 11, 14, 19 and 21 days after inoculation by measuring the length of necrotized shoots per plant. These measures were used to calculate the Area Under Disease Progression Curve (AUDPC) according to Shaner and

**Table 1** Primers sequences used for PCR genotyping of apple and *A. thaliana* transgenic lines and for Q-PCR quantification of *MdAGGs* transcripts accumulation in apple and *A. thaliana*

Species	Gene (Accession)	Primers sequence
<i>Malus domestica</i>	qPCR Actin (MD14G1142600)	Forward CAACCTCTCGTCTGTGATAATG
		Reverse GCATCCTTCTGTCCCATCC
	GAPDH (MD16G1111100)	Forward GCTGCCAAGGCTGTTGGAA
		Reverse CAGTCAGGTCAACAACGGAAA
	TuA (MD03G1004400)	Forward GTTCAATGCTGTTGGTGGTG
		Reverse CTGCGGAGAAGGATAGATGG
	MdAGG (MD10G1026620 ; MD10G1027230 ; MD10G1027240 ; MD10G1027260)	Forward CAGCTGCTGACCGAAATGAAAC
		Reverse TCTGACTTGGGAGACTGAGTAGAT
	PCR p35s::MdAGG10 (plasmid pK7WG2D, Karimi et al. 2002::MD10G1027210)	Forward TTCTTGTCGGCGTAGTCCTC
		Reverse CTCCACTGACGTAAGGGATGA
	nptII (plasmid pK7WG2D, Karimi et al. 2002)	Forward ATACTTTCTCGGCAGGAGCA
		Reverse GCGTTCAAAAGTCGCCTAAG
EF 1- $\alpha$ (MD03G1103900)	Forward CTCTTGGTGTGTCAGGCAAATG	
	Reverse TCAAGGTTGGTGGACCTCTC	
23s ribosomal RNA Agrobacterium (plasmid pK7WG2D, Karimi et al. 2002)	Forward GTAAGAAGCGAACGCAGGGAACT	
	Reverse GACAATGACTGTTCTACGCGTAA	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	qPCR Actin (AT3G18780)	Forward GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
		Reverse AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
	Cla (AT4G24550)	Forward AGCATACACTGCGTGCAAAG
		Reverse TCGCCTGTGTCACATATCTC
	AtCopI (AT2G32950)	Forward GCTCGGCATGTGTCAAAA
		Reverse CCACTCAGCGCATCCTTC
	MdAGG10 (MD10G1026620 ; MD10G1027230 ; MD10G1027240 ; MD10G1027260)	Forward CAGCTGCTGACCGAAATGAAAC
		Reverse TCTGACTTGGGAGACTGAGTAGAT
	PCR p35s::MdAGG10 (plasmid pGWB2, Xu et al. 2020::MD10G1027210)	Forward TTCTTGTCGGCGTAGTCCTC
		Reverse CTCCACTGACGTAAGGGATGA
	nptII (plasmid pGWB2, Xu et al. 2020)	Forward ATACTTTCTCGGCAGGAGCA
		Reverse GCGTTCAAAAGTCGCCTAAG
	AtCop1 (AT2G32950)	Forward GCTCGGCATGTGTCAAAA
		Reverse CCACTCAGCGCATCCTTC
	23s ribosomal RNA Agrobacterium (plasmid pGWB2, Xu et al. 2020)	Forward GTAAGAAGCGAACGCAGGGAACT
		Reverse GACAATGACTGTTCTACGCGTAA

Apple gene accessions refer to the *Malus domestica* genome (GDDH13 v1.1) and *A. thaliana* gene accession to the *Arabidopsis thaliana* reference genome TAIR10

Finney (1977). From 5 to 29 plants per condition were used for these experiments.

*R. solanacearum* inoculations were performed on intact roots of four-week-old *A. thaliana* plants and symptoms assessed as previously described (Lohou et al. 2014) using a randomized complete block design (RCBD) in three biological repeats (20 plants/genotype/repetition) at 27 °C. Briefly, plants were soaked for 15 minutes in 2 L per tray of a bacterial suspension and then transferred to a growth chamber at 27 °C (75% Room Humidity, 12 hours light, at 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Wilting symptoms were monitored from 3 to 7 days post inoculation (dpi) with a disease index scale ranging from 0 for healthy plants to 4 for dead plants

(Morel et al. 2018). For each condition, 20 plants were studied.

### RNA extraction, reverse transcription and *MdAGGs* expression analysis

For RNA extraction, frozen leaf samples were ground into powder using a tissue lyser (Retsch, Hann, Germany) during 20 seconds at 25 Hz twice. Then, total RNA was extracted with a NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following manufacturer's recommendation. The concentration of RNA was measured with

a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 2 µg of RNA were used for reverse transcription into complementary DNA (cDNA) using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. Absence of genomic DNA contaminations was checked by polymerase chain reaction (PCR) using *EF-1α* primers (Table 1), designed from either side of an intron for apple, and *AtCop1* primers for *A. thaliana*.

Gene expressions were measured by mixing 4.3 µL of a 100 fold diluted cDNA suspension with 7.5 µL of MESA Blue 2X PCR MasterMix for SYBR Green Assays with fluorescein (Eurogentec, Liege, Belgium). The mix is complemented with 3 µL of primers according to the optimal concentration allowing an efficiency close to 100% and calculated in previous experiments. We used a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for the qPCR with the following program: 95 °C during 5 minutes, 35 cycles comprising 95 °C 3 seconds, 60 °C 45 seconds with real-time fluorescence monitoring. Melt curves were made at the end of the amplification to check the absence of non-specific amplifications and primer-dimers products.

Relative gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The normalization factor was calculated with 3 housekeeping genes (*Actin*, *GAPDH* and *TuA* for apple and *Actin*, *Cla* and *Cop1* for *A. thaliana*) (Table 1) as recommended by Vandesompele et al. (2002).

### Proteins extraction, separation and immunodetection

Frozen leaves were ground into powder in liquid nitrogen using mortar and pestle. Phenol extraction of protein and subsequent Bradford quantification were performed as described in Chavonet et al. (2022). Phenol-extracted proteins were separated on Mini PROTEAN TGX Precast Gel (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) during 35 minutes at 200 V (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, 4-Gel System, Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA) and were electroblotted onto 0.45 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (immobilon-P, Milli-pore Corp., Bedford, MA, United States). After protein transfer, the membrane was blocked with EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad Industries Inc, Hercules, CA, USA) and incubated overnight at 4 °C in EveryBlot Blocking Buffer containing 1:1000 of two rabbit antibodies anti-MdAGGs antibodies as described in Warneys et al. (2018). The membrane was then washed 5 times during 5 minutes in a TBSt solution (Tris 20 mM; NaCl 150 mM; Tween20 0.005%; v/v; pH 7.6) and incubated 1 hour in EveryBlot Blocking Buffer, containing 1:5000 of HRP conjugated goat anti-rabbit antibodies (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The membrane was revealed with the Clarity™ Western ECL

Substrates Kit (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The revelation was then performed with ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA). To reveal the total proteins of the samples, we used a stain free gel and the membrane was revealed by chemiluminescence.

### Data analysis

Data analysis were performed using Rstudio software (Posit team 2022) and the graphical representations were generated using the package “ggplot2” (Wickham et al. 2016) in association with “ggpubr” (Kassambara 2020).

A non parametric test (Wilcoxon) was used for pairwise comparisons, except for plant size measurements for which the Tukey test was performed.

## Results

### *In vitro* test of bacterial agglutination by MdAGG10

We investigated the MdAGG10 agglutination potential toward a large range of Gram positive and negative species, belonging to several pathogenic bacterial genera of plants and humans (Supplementary Table 1). For Gram negative plant pathogenic bacteria, all the bacteria tested from the *Pseudomonas* genus except *Pseudomonas fluorescens biovar I* were agglutinated by MdAGG10. Among all the *Pectobacterium* genus species screened, only *Pectobacterium aquaticum* was agglutinated by MdAGG10. Both studied strains of *Burkholderia cepacia* and *Xanthomonas* tested were agglutinated by MdAGG10, as well as *Dickeya chrysanthemi*, *Agrobacterium sp biovar I* strain and *Dickeya chrysanthemi biovar parthenii*. For several mucoid species, agglutination was only observed upon removal of the free EPS from the bacterial suspension. This was true for *Agrobacterium sp biovar I*, *Ea*, *Mesorizhobium loti*, *Pantoea agglomerans* and *Ralstonia solanacearum* GMI 1000 (Table 2). Interestingly, the bacterial mutant of *R. solanacearum* affected in the biosynthesis of the master regulator PhcA was not agglutinated by MdAGG10. Among the human Gram negative pathogenic bacteria tested, only *Klebsiella pneumoniae* escaped agglutination by MdAGG10, in contrast to *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas stutzeri* and *P. aeruginosa*. The latter seems to be protected from agglutination by its free-EPS, insofar agglutination of *P. aeruginosa* cells was only observed after free-EPS removal (Table 2).

Among all of the Gram positive bacterial strains tested, there was no observed agglutination for *Rhodococcus fascians*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae serotype 3* and *Streptococcus pyogenes*. All the other Gram positive bacterial

**Table 2** *In vitro* evaluation of bacterial agglutination by MdAGG10 on a panel of strains from diverse collections and hosts

Identification code	Bacterial species / strain	Host	Agglutinated by MdAGG10
Gram negative			
CFBP4716	<i>Agrobacterium sp. biovar 1</i>	Plant	a
CFBP5493	<i>Agrobacterium sp. biovar 1</i> *		a if w
CFBP2227	<i>Burkholderia cepacia</i>		a
CFBP2228	<i>Burkholderia cepacia</i>		a
CFBP4794	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> *		na
CFBP7086	<i>Dickeya chrysanthemi</i>		a
CFBP1270	<i>Dickeya chrysanthemi biovar parthenii</i>		a
CFBP6715	<i>Mesorhizobium loti</i> *		a if w
13516	<i>Pantoea agglomerans</i> *		a if w
CFBP3517	<i>Pantoea stewartii subsp. stewartii</i>		a
CFBP8637	<i>Pectobacterium aquaticum</i>		a
CFBP7370	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. actinidiae</i>		na
CFBP2634	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis</i>		na
CFBP6070	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>		na
CFBP3296	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. odoriferum</i>		na
CFBP8603	<i>Pectobacterium polaris</i>		na
CFBP8652	<i>Pectobacterium versatile</i>		na
CFBP2101	<i>Pseudomonas cichorii</i>		a
CFBP2102	<i>Pseudomonas fluorescens biovar 1</i>		na
CFBP1390	<i>Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola</i>		a
CFBP2443	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		a
CFBP1657	<i>Pseudomonas syringae pv. maculicola</i>		a
CFBP5092	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>		a
CFBP7438	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>		a
CFBP8283	<i>Ralstonia solanacearum</i> (KO mutant of CFBP6924)		na
CFBP6924	<i>Ralstonia solanacearum GMI 1000</i> *		a if w
CFBP5251	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>		a
CFBP2054	<i>Xanthomonas translucens pv. translucens</i>		a
CFBP1430	<i>Erwinia amylovora</i> *		a if w
2054266	<i>Enterobacter cloacae</i> *	Human	a if w
ATCC25922	<i>Escherichia coli</i>		a
ATCC700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		na
2054609	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *		a if w
2051551	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		a
2053927	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		na
Gram positive			
CFBP4999	<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> *	Plant	a if w
CFBP2049	<i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i>		a
ATCC13124	<i>Clostridium perfringens</i>	Human	a
ATCC29212	<i>Enterococcus faecalis</i>		a
BAA750	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		a
ATCC29213	<i>Staphylococcus aureus</i>		a
1950531	<i>Streptococcus pneumoniae serotype 3</i>		na

Mucoid bacterial species/strains are indicated by a star. (a): agglutination by MdAGG10, (na): no agglutination by MdAGG10, (a if w): agglutination by MdAGG10 only with washed bacteria, *ie.* bacterial suspensions from which free EPS has been removed by centrifugation. Representative pictures of 'a', 'na' and 'a if w' are provided in Supplementary Fig. 1 and details of strain origin and culture conditions in Supplementary Table 1

strains tested were directly agglutinated by MdAGG10, except for *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* for which free-EPS needed to be removed (Table 2).

Globally, MdAGG10 was able to agglutinate the cells of a large range of bacterial genus, either Gram negative or positive, and infecting plants or humans. Moreover, bacterial protection by free-EPS against MdAGG10-driven agglutination was not restricted to Gram negative plant pathogenic bacteria.

### Obtention of MdAGG10 constitutive overexpressor lines in apple and *A. thaliana*

In order to determine if the agglutination observed *in vitro* between MdAGG10 and bacteria reflects a phenomenon corresponding to a resistance mechanism *in planta*, we generated transgenic apple and *A. thaliana* plants constitutively overexpressing MdAGG10. In total, 1,005 leaves of apple vitroplants were sampled for stable *Agrobacterium*-mediated transformation with the expression vector *p35S::MdAGG10*. Only 3 different transgenic lines constitutively overexpressing MdAGG10 were obtained, and named line A, B and C after verifying T-DNA insertion by PCR (Supplementary Fig. 2). The transformation rate was 0.29%, lower than the 1.67% obtained for control transformation with a *p35S::GUS* expression vector. We also noticed that the rooting rates of lines A, B and C performed for acclimation in greenhouse were lower compared to untransformed WT 'Gala' (resp. 8.88; 22.22 and 22.22 compared to 60% for the WT) and the size of line A and C plants before inoculation was significantly lower compared to WT (resp. 20.11 and 21.98 compared to 25.2 cm) (Table 3).

Regarding *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. thaliana*, 13 transgenic lines constitutively overexpressing MdAGG10 were obtained. The proper insertion of the T-DNA was verified by PCR and the two lines (D and E, Supplementary Fig. 2) displaying the highest MdAGG10 expression were selected for further characterisation (data not shown). No noticeable growth differences were recorded between WT and transgenic lines in *A. thaliana*.

**Table 3** Phenotype analysis of transgenic and control apple plants

Plants	Rooting rate (%)	Size of 8 weeks-old plants (cm)
WT	60	25.2 ± 4.8
A	8.8	20.11 ± 5.58 (****)
B	22.22	24.22 ± 4.47 (ns)
C	22.22	21.98 ± 3.31 (**)

Rooting rate: percentage of plants displaying visible roots one month after their transfer on rooting medium. Size of the plants 8 weeks after their acclimation in the greenhouse. Both rooting rate value and mean size of plant were calculated with 57 WT plants, 27 OE A plants, 44 OE B plants and 30 OE C plants. Mean size ± standard deviation and significance of Tukey Test (\*\*\*\* P<0.0001; \*\* P<0.01; ns non-significant)

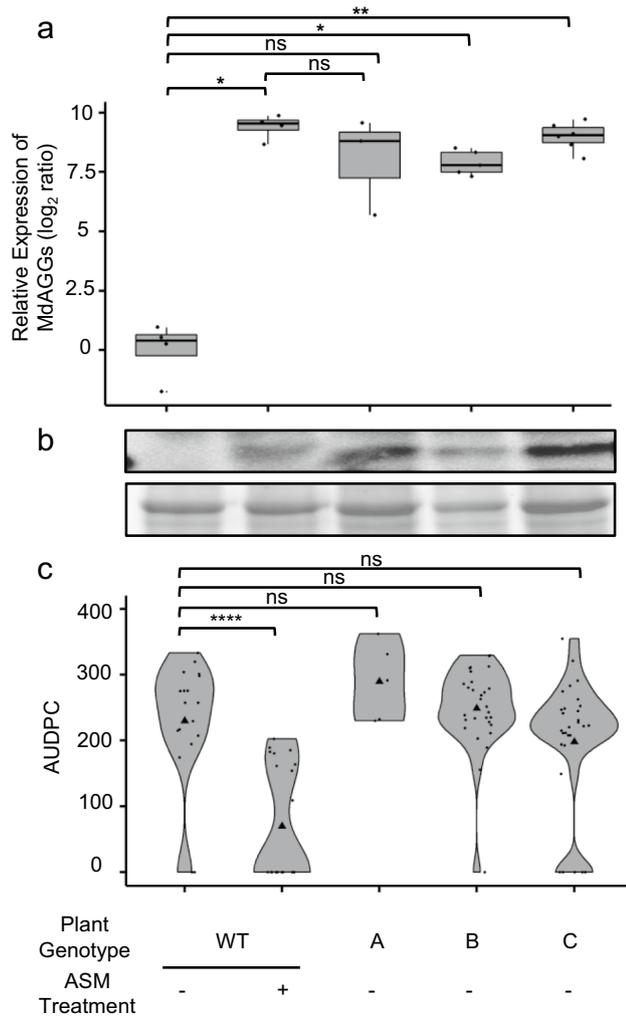
### Characterization of apple and *A. thaliana* overexpressing MdAGG10

To examine the impact of MdAGG10 overexpression in the resistance against *Ea* and *R. solanacearum*, we first compared the expression level of the target gene in the transgenic lines with that of untransformed plants. The primers used to evaluate MdAGG expression are predicted to anneal with the transcripts of all MdAGG members, except for MdAGG6 and MdAGG17. Expression in apple is therefore referred as MdAGGs expression, in contrast to *A. thaliana* lines that are only able to produce MdAGG10 transcripts. The expression of MdAGGs in apple lines A, B and C was compared to the expression in an ASM – treated 'Gala' (WT) and in an untreated WT. For lines B and C, the expression of MdAGGs was significantly up-regulated in comparison to untreated WT controls. Because of a too small number of biological repeats for line A, the relative expression of MdAGGs was not significantly different neither from the ASM-treated WT control nor from the untreated one; although the expression values calculated were in the same range as those calculated for the ASM-treated WT control (Fig. 1a). The accumulation of MdAGG proteins in leaf tissues was investigated in the three constitutive MdAGG10 overexpressor lines as well as in controls. MdAGG proteins were not detected in the untreated WT controls while accumulation was observed for lines A; B and C and in the ASM – treated WT control (Fig. 1b). These 3 overexpressing lines were further investigated in order to evaluate their susceptibility to *Ea*. The AUDPC calculated for the three transgenic lines after artificial inoculation were not different from the AUDPC calculated for the untreated WT control, in contrast to the AUDPC for the ASM-treated WT control, which was significantly lower (Fig. 1c).

We performed a similar approach for the *A. thaliana* – *R. solanacearum* pathosystem. We first checked the overexpression of MdAGG10 and its accumulation in leaf tissues. Line D and E overexpressed MdAGG10 compared to the wild type Landsberg (WT) susceptible control (Fig. 2a) and accumulated MdAGG10 in their leaf tissues (Fig. 2b). The calculation of AUDPC after artificial inoculation of *R. solanacearum* showed that as for apple, the constitutive overexpression of MdAGG10 in *A. thaliana* did not result in measurable enhanced resistance to bacterial wilt (Fig. 2c).

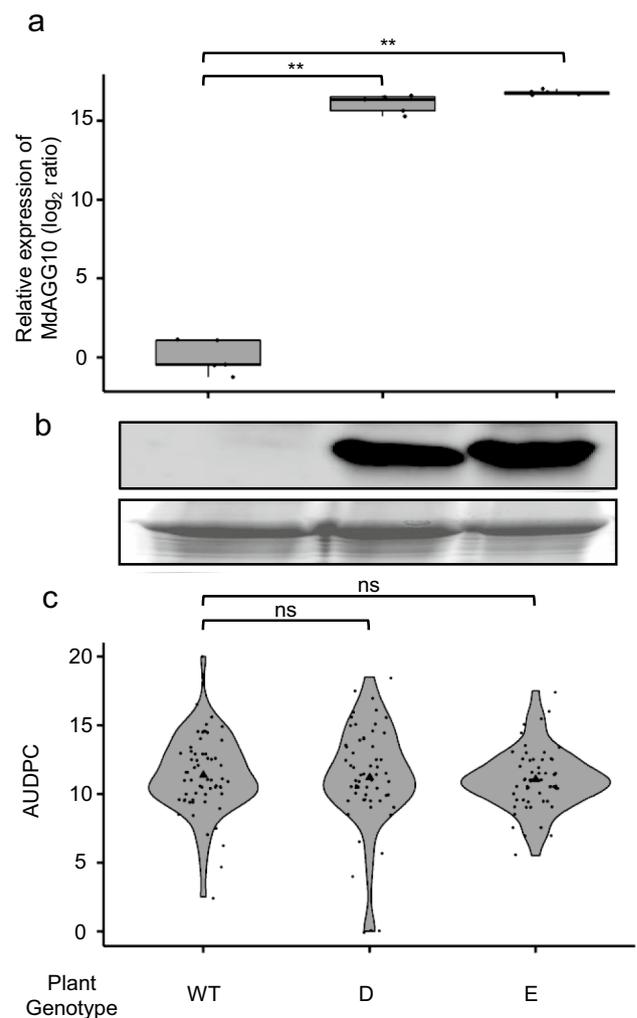
### Test of a potential biocide effect of MdAGG10 on *Ea*

The results of the previous experiments showed that the cells of several bacterial species, especially *Ea* and *R. solanacearum*, were agglutinated *in vitro* by MdAGG10 but that the accumulation of the protein in apple and *A. thaliana* did not provide any measurable enhanced resistance to



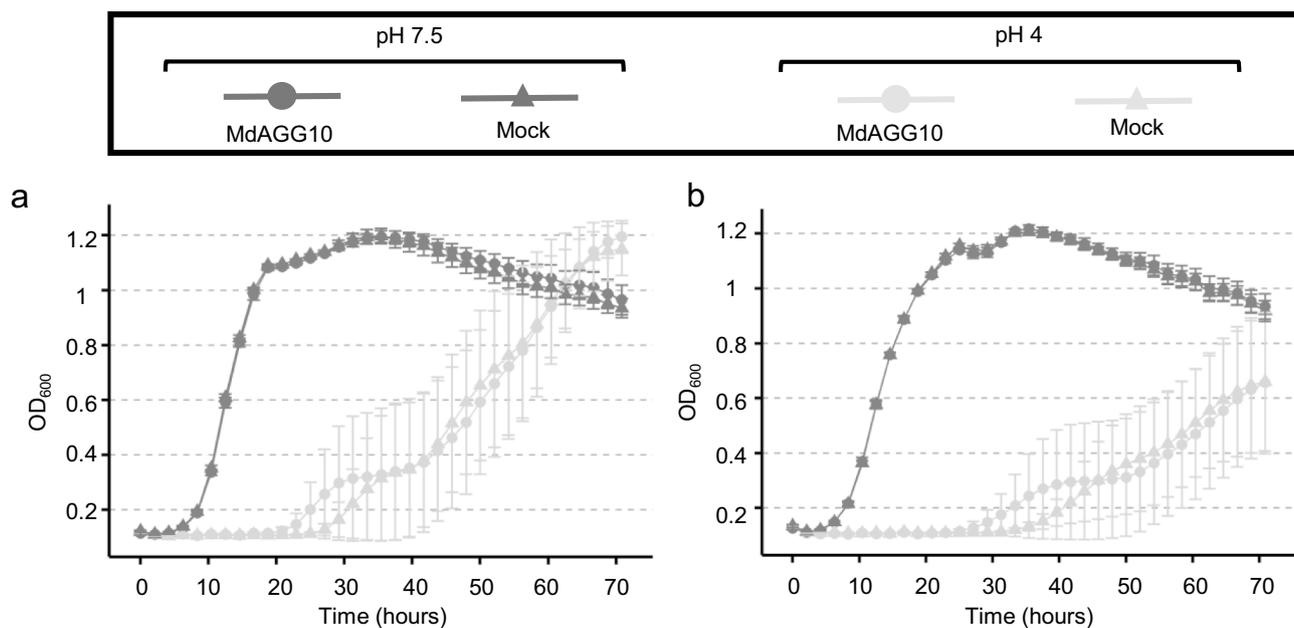
**Fig. 1** MdAGGs expression and accumulation, and phenotype after *Ea* infection in apple transgenic lines constitutively overexpressing *MdAGG10*. **a** Expression of *MdAGGs* relative to the mean of untreated WT. Each point represents one biological replicate, *i.e.* a pool of two leaves from independent plants ( $3 < n < 6$ ). **b** MdAGGs protein detection by Western blot (upper panel). Homogeneity of loaded proteins (40  $\mu$ g per well) was verified by Coomassie brilliant blue staining (lower panel). **c** Phenotypic assessment by AUDPC calculation over 21 days after *Ea* inoculation. Each point represents the AUDPC of one plant ( $5 < n < 29$ ). Triangles represent the mean AUDPC of each condition. Significance of Wilcoxon rank sum test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns non-significant

their respective pathogens. To gain insight into the effect of MdAGG10 on bacterial fitness, we determined if the *in vitro* agglutination of *Ea* cells by MdAGG10 affects its ability to multiply. We therefore measured bacterial growth in liquid LB culture media of *Ea* suspensions that were previously incubated with MdAGG10 in contrasting pH conditions that either allowed or prevented cell agglutination. This was performed with *Ea* WT for which agglutination is prevented by secretion of free-EPS, and with the agglutination-prone *Ea ams* mutant which is affected in EPS biosynthesis (Tharaud et al. 1994).



**Fig. 2** MdAGG10 expression and accumulation, and phenotype after *R. solanacearum* infection in *A. thaliana* transgenic lines overexpressing *MdAGG10*. **a** Expression of *MdAGG10* relative to the mean of WT. Each point represents one biological replicate, *i.e.* a pool of two leaves of independent plants ( $n = 5$ ). **b** MdAGG10 protein detection by Western Blot (upper panel). Homogeneity of loaded protein (15  $\mu$ g per well) was verified by Coomassie brilliant blue staining (lower panel). **c** Phenotypic assessment by AUDPC calculation over 7 days after *R. solanacearum* inoculation. Each point represents the AUDPC of one plant ( $n = 30$ ). Triangles represent the mean AUDPC of each condition. Significance of Wilcoxon rank sum test: \*\* $P < 0.01$ ; ns non-significant

The results showed that the growth of *Ea* WT was not impacted by the pre-incubation with MdAGG10 in near-neutral or acidic conditions (Fig. 3a). Pre-incubation with MdAGG10 did not impact the growth of *Ea ams*, including under the acidic conditions that allow MdAGG10-driven agglutination of the bacterial cells (Fig. 3b). For both strains, pre-incubation under acidic conditions significantly delayed measurable bacterial growth recovery, but the presence of MdAGG10 did not impact this delay.



**Fig. 3** Evaluation of the biocide effect of MdAGG10 on *Ea*. Evolution of  $OD_{600}$  corresponding to the *Ea* WT **a** or *Ea ams* **b** growth in liquid LB media. The strains were incubated 1 hour with MdAGG10

recombinant proteins (circle) or with mock (triangle) at pH 4 (light grey) or pH 7.5 (dark grey) before culturing. Means  $\pm$  SD of five independent repeats

Altogether, these results suggest that bacterial cell agglutination by MdAGG10 does not affect the ability of *Ea* to subsequently multiply in liquid culture media.

## Discussion

Since the discovery of the first lectin, these proteins have been found in plenty of plant and animal species, as well as in human (Dias et al. 2015; Coelho et al. 2017). Their binding properties allow them to be effective against plant or human pathogens (Lannoo and Van Damme 2014; Coelho et al. 2017). The *in vitro* agglutination observed between MdAGG10 and *Ea* has already been documented and MdAGGs have been associated with partial resistance to fire blight (Chavonet et al. 2022). In order to determine if MdAGGs could be associated with resistance to other pathogenic bacteria, we first investigated the agglutination property of MdAGG10 on a large range of bacterial species. We screened plant and human pathogenic bacteria because some lectins were previously shown to interfere with the development of some pathogenic bacteria of plants (Lannoo and Van Damme 2014) and humans (Tsaneva and Van Damme 2020). Extracellular glycoconjugates are very diverse on the outer surface of bacteria and vary between species of a same genus (Lerouge and Vanderleyden 2002; Bazaka et al. 2011). Since we observed agglutination by MdAGG10 in all the genera of the screened bacterial species, even in Gram positive bacteria, we can conclude the MdAGG10 binds to glycans

conserved among bacteria. In our previous study we showed that purified anionic polysaccharides were able to inhibit MdAGG10 agglutination of *Ea* (Chavonet et al. 2022). Here we report that most Gram positive bacterial species were also agglutinated by MdAGG10, suggesting the wall teichoic acid of these bacteria, known to be anionic glycopolymers (Swoboda et al. 2010), are also bound by MdAGG10.

It is noteworthy that free EPS protected several bacterial species from agglutination by MdAGG10, suggesting that mucoid strains could mask some surface polysaccharides targeted by defense-associated plant lectins. For instance, LPS, an ubiquitous component of all Gram negative outer membranes, induces plant innate immunity (Silipo et al. 2010) and has been shown to interact with defense-inducible lectins in several plant species (Vilakazi et al. 2017) or inhibit MdAGG10-driven agglutination of *Ea* (Chavonet et al. 2022).

Along the same screening, we evaluated two different strains of *R. solanacearum*: the wild type strain CFBP6924 and the strain CFBP8283, a KO mutant of CFBP6924 deficient for PhcA synthesis, a positive regulator controlling the synthesis of *R. solanacearum* virulence factors, including EPS and LPS (Perrier et al. 2018). Results show that the *phcA* mutant was not agglutinated by MdAGG10 whereas the WT strain was agglutinated only after cell-washing by centrifugation, which removes free EPS but leaves the capsulated EPS intact. Whether MdAGG10 targets LPS or capsulated EPS of *R. solanacearum* remains to be determined.

According to the *in vitro* agglutination potential of MdAGG10 on a large range of bacteria, and the role of

several lectins in the resistance to several pests, including bacteria (Chavonet et al. 2022; Ma et al. 2023), we hypothesized that constitutive overexpression of MdAGG10 would confer enhanced resistance against plant-pathogenic bacteria by impairing bacterial systemic progression. We therefore chose to evaluate the effect of MdAGG10 overexpression in apple toward *Ea*. This study was also undertaken for the *A. thaliana*/*R. solanacearum* pathosystem because it presents some similarities with the fire blight disease of apple insofar both bacteria spread systemically (Schell 2000; Koczan et al. 2009) and both are agglutinated by MdAGG10 but protected by their free EPS (Table 2). However, our results show that constitutive overexpression and accumulation of MdAGG10 in apple and *A. thaliana* does not enhance resistance to *Ea* and *R. solanacearum*, respectively. This absence of enhanced protection can rely on different factors or explanations.

First, MdAGG10 belongs to a protein family of 17 members, with coding sequence similarities ranging from 83% to 99% (Warneys et al. 2018). In our experiments, we chose MdAGG10 because of its similarity with the consensus sequence and its high expression upon ASM treatment (Warneys et al. 2018). A possible explanation would be that another MdAGG would have been more appropriate, or that MdAGGs protect against *Ea* when they are expressed as a cocktail of MdAGGs with complementary agglutination properties that are due to slight differences in protein sequence.

Although *Ea* WT and *Ea ams* are agglutinated by MdAGG10, *in vitro* incubation with this protein did not impair the bacterial ability to multiply. In contrast to the sole overexpression of MdAGG10, an ASM treatment of apple plants reprograms the transcriptome of apple plants toward defense and implies hundreds of defense-related genes (Warneys et al. 2018). Because MdAGG10-overexpressing apple lines did not display enhanced resistance to *Ea* it is therefore possible to speculate that other plant defense molecules, synthesised upon ASM treatment, complete the agglutination process observed *in vitro* in order to slow or even stop the growth of *Ea*.

Moreover, the apple transformation rate was 5 times lower for MdAGG10-transformed than for control-transformed plants. We also noticed that the overexpression of MdAGG10 negatively impacts the rooting rate of the 3 three transgenic lines and the growth of lines A and C. Studies have already shown that constitutive accumulation of PR proteins leads to fitness consequences in plant growth and development and does not always provide enhanced resistance against plant pathogens (Ali et al. 2018). On top of a pitfall hypothesis, lack of resistance observed in our transgenic lines overexpressing MdAGG10 might be explained by a plant physiological imbalance favouring the bacterial disease.

In contrast to apple lines, we did not observe phenotypic differences between *A. thaliana* overexpressing MdAGG10

and untransformed plants before the inoculation (data not shown). *R. solanacearum* enters into its host through the roots and spread in xylems vessels (Hikichi et al. 2007). We measured the expression of MdAGG10 in whole leaves but the expression in the roots may be lower, and could explain the susceptibility of *A. thaliana* transgenic lines to bacterial wilt. As for apple, MdAGG10 may also need other molecules to inhibit the growth after agglutinating *R. solanacearum* which are lacking in these lines. *In vitro* agglutination between MdAGG10 and *R. solanacearum* was performed at pH 4 and studies showed that (i) infections of bacteria can lead to an acidification of the apoplast (Kesten et al. 2019) and (ii) minimal pH for *R. solanacearum in vitro* growth is 4.5 but some of its virulence factors are highly expressed *in vitro* at pH 5.5 (Li et al. 2017). We showed previously that MdAGG10 does not agglutinate *Ea* at a pH above 4.8, but that infection of apple plants by *Ea* acidifies the pH of extracellular washing fluids (Chavonet et al. 2022). It therefore might be possible that in contrast to apple, the apoplastic pH of infected *A. thaliana* lines does not allow MdAGG10 to agglutinate *R. solanacearum* cells.

To conclude, the apple defense-related lectin MdAGG10 can bind *in vitro* to diverse bacterial glycans leading to agglutination. However, its constitutive accumulation in transgenic apple and *A. thaliana* lines does not improve resistance to their respective bacterial pathogens, *Ea* and *R. solanacearum*. Moreover, the constitutive expression of MdAGG10 seems to impair growth and development of apple transgenic lines. Associating MdAGG sequences with an *Ea*-inducible promoter, such as *pPPO16* (Gaucher et al. 2022), may be an alternative to the apparent toxicity of the constitutive accumulation of MdAGG10. Finally, the use of genome editing technologies involving CRISPR/Cas9 could be used to produce apple lines unable to synthesize functional MdAGGs in order to determine if ASM-induced resistance to *Ea* relies, at least partly, on these defense-related lectins.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01479-x>.

**Acknowledgment** This research was funded by a grant (to A.B.) from INRAE-BAP department and the region Pays de la Loire, and supported by the regional program “Objectif Végétal, Research, Education and Innovation in Pays de la Loire”, supported by the region Pays de la Loire, Angers Loire Métropole and the European Union. The authors are grateful for the technical support provided by platforms COMIC (bacterial collection), IMAC (cell imaging) and Phenotic (greenhouse facilities) of the SFR QUASAV.

## Declarations

**Conflict of interest** All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

## References

- Alexander C, Rietschel E (2001) Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7:167–202. <https://doi.org/10.1177/09680519010070030101>
- Ali S, Ganai BA, Kamili A, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, Rawat S, Grover A (2018) Pathogenesis-Related Proteins and Peptides as Promising Tools for Engineering Plants with Multiple Stress Tolerance. *Microbiol Res* 212–213:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Bazaka K, Crawford R, Nazarenko E, Ivanova E (2011) Bacterial extracellular polysaccharides. In: Linke D, Goldman A (ed) *Bacterial Adhesion*. Springer Netherlands pp 213–226. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_13)
- Bellande K, Bono JJ, Savelli B, Jamet E, Canut H (2017) Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? *Int J Mol Sci* 18:1164. <https://doi.org/10.3390/ijms18061164>
- Bellemann P, Geider K (1992) Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J Gen Microbiol* 138:931–40. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-5-931>
- Bennett R, Billing E (1980) Origin of the polysaccharide component of ooze from plants infected with *Erwinia amylovora*. *Microbiol* 116:341–49. <https://doi.org/10.1099/00221287-116-2-341>
- Berry M, McGhee G, Zhao Y, Sundin G (2009) Effect of a *WaaL* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiol Lett* 291:80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01438.x>
- Chan J, Goodwin P (1999) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Adv* 17:489–508. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00025-7)
- Chavonet E, Gaucher M, Warneys R, Bodelot A, Heintz C, Juillard A, Cournol R, Widmalm G, Bowen J, Hamiaux C, Brisset MN, Degrave A (2022) Search for host defense markers uncovers an apple agglutination factor corresponding with fire blight resistance. *Plant Physiol* 188:1350–68. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab542>
- Coelho L, Breitenbach Barroso C, Dos Santos Marcelino, Silva P, De Menezes Lúcia, Lima V, Viana Pontual E, Maria Guedes Paiva P, Henrique Napoleão T, Dos Santos Correia MT (2017) Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. Evid-based Complement Altern Med 2017:1–22. <https://doi.org/10.1155/2017/1594074>
- Dang L, Rougé P, Van Damme E (2017) Amaranthin-like proteins with aerolysin domains in plants. *Front Plant Sci* 8:1368. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01368>
- De Coninck T, Van Damme E (2021) Review: the multiple roles of plant lectins. *Plant Sci* 313:111096. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111096>
- Denny T (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopatho* 33:173–97
- Deslandes L, Olivier J, Theulières F, Hirsch J, Feng D, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci* 99:2404–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.032485099>
- Dias R, Machado L, Migliolo L, Franco O (2015) Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Mol* 20:519–41. <https://doi.org/10.3390/molecules20010519>
- Eggermont L, Verstraeten B, Van Damme E (2017) Genome-wide screening for lectin motifs in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Genome* 10: Plantgenome 02.0010. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.02.0010>
- Faize M, Malnoy M, Dupuis F, Chevalier M, Parisi L, Chevreau E (2003) Chitinases of *Trichoderma atroviride* induce scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple. *Phytopathology* 93:1496–1504. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.12.1496>
- Fulton T, Chunwongse J, Tanksley S (1995) Microprep Protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* 13:207–9. <https://doi.org/10.1007/BF02670897>
- Gaucher M, Righetti L, Aubourg S, Dugé de Bernonville T, Brisset MN, Chevreau E, Vergne E (2022) An *Erwinia amylovora* inducible promoter for improvement of apple fire blight resistance. *Plant Cell Rep* 41:1499–1513. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02869-8>
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994) The small, versatile pPZP Family Of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989–94. <https://doi.org/10.1007/BF00014672>
- Hayward A (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29:65–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
- Hikichi Y, Yoshimochi T, Tsujimoto S, Shinohara R, Nakaho K, Kanda A, Kiba A, Ohnishi K (2007) Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnol* 24:149–54. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.149>
- Islamov B, Petrova O, Mikshina P, Kadyirov A, Vorob'ev V, Gogolev Y, Gorshkov V (2021) The role of *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides in plant–pathogen interactions. *Int J Mol Sci* 22:12781. <https://doi.org/10.3390/ijms222312781>
- Jiang SY, Ma Z, Ramachandran S (2010) Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evol Biol* 10:79. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-79>
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193–95. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Kassambara A (2020) ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Kesten C, Gámez-Arjona F, Menna A, Scholl S, Dora S, Huerta AI, Huang HY (2019) Pathogen-induced pH changes regulate the growth-defense balance in plants. *The EMBO J* 38:e101822. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101822>
- Koczan J, McGrath M, Zhao Y, Sundin G (2009) Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology* 99:1237–44. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-11-1237>
- Lannoo N, Van Damme E (2014) Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci* 5:397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00397>
- Lerouge I, Vanderleyden J (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* 26:17–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x>
- Li S, Liu Y, Wang J, Yang L, Zhang S, Xu C, Ding W (2017) Soil acidification aggravates the occurrence of bacterial wilt in south China. *Front Microbiol* 8:703. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00703>
- Lohou D, Turner M, Lonjon B, Cazalé AC, Peeters N, Genin S, Vaillau F (2014) HpaP modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and harbours a substrate specificity switch domain essential for Virulence: role of HpaP in type III secretion and virulence. *Mol Plant Pathol* 15:601–14. <https://doi.org/10.1111/mpp.12119>
- Ma L, Haile Z, Sabbadini S, Mezzetti B, Negrini F, Baraldi E (2023) Functional characterization of MANNANOSE-BINDING LECTIN 1, a G-type lectin gene family member, in response to fungal pathogens of strawberry. *J Exp Bot* 74:149–61. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac396>
- Ma QH, Zhen WB, Liu YC (2013) Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance. *Biochim* 95:359–65. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.014>
- Malabarba J, Chevreau E, Dousset N, Veillet F, Moizan J, Vergne E (2020) New strategies to overcome present CRISPR/Cas9 limitations in apple and pear: efficient dechimerization and base editing. *Int J Mol Sci* 22:319. <https://doi.org/10.3390/ijms22010319>

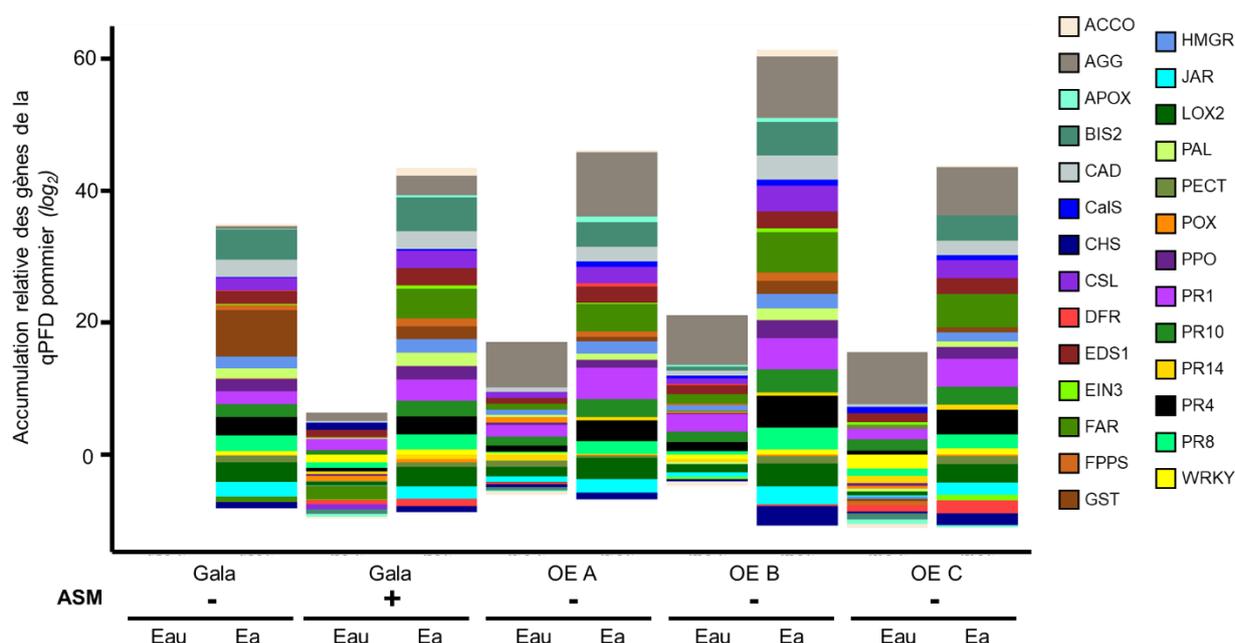
- McGarvey J, Bell C, Denny T, Schell M (1998) Analysis of extracellular polysaccharide I in culture and in planta using immunological methods: new insights and implications. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (ed) Bacterial Wilt Disease. Springer Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg 157–163. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03592-4\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03592-4_23)
- Morel A, Peeters N, Vailleau F, Barberis P, Jiang G, Berthomé R, Guidot A (2018) Plant pathogenicity phenotyping of *Ralstonia solanacearum* strains. Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols 223–239. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_18)
- Nimtzy M, Mort A, Domke T, Wray V, Zhang Y, Qiu F, Coplin D, Geider K (1996) Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Carbohydr Res 287:59–76. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00070-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00070-5)
- Perrier A, Barlet X, Peyraud R, Rengel D, Guidot A, Genin S (2018) Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. Microb Pathog 116:273–78. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.028>
- Peumans W, Van Damme E (1995) Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol 109:347. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
- Plener L, Manfredi P, Valls M, Genin S (2010) PrhG, a transcriptional regulator responding to growth conditions, is involved in the control of the type III secretion system regulon in *Ralstonia Solanacearum*. J Bacteriol 192:1011–19. <https://doi.org/10.1128/JB.01189-09>
- Posit Team (2022) RStudio: integrated development environment for R. Posit software, PBC, Boston, MA. <http://www.posit.co/>
- Righetti L, Djennane S, Berthelot P, Cournol R, Wilmot N, Loridon K, Vergne E, Chevreau E (2014) Elimination of the *nptII* marker gene in transgenic apple and pear with a chemically inducible R/Rs recombinase. Plant Cell, Tissue Organ Cult 117:335–48. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0443-2>
- Schell M (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia Solanacearum* by an elaborate sensory network. Annu Rev Phytopathol 38:263–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.263>
- Shaner G, Finney R (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. Phytopathology 77:1051. <https://doi.org/10.1094/Phyto-67-1051>
- Silipo A, Erbs G, Shinya T, Dow J, Parrilli M, Lanzetta R, Shibuya N, Newman MA, Molinaro A (2010) Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. Glycobiology 20:406–19. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp201>
- Swoboda J, Campbell J, Meredith T, Walker S (2010) Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. Chem BioChem 11:35–45. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900557>
- Tharaud M, Menggad M, Paulin JP (1994) Virulence, growth, and surface characteristics of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. Microbiology 140:659–69. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-2-625>
- Thompson S (2000) Epidemiology of fire blight. In: Vanneste J (ed) Fire Blight: The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, UK, pp 9–37. <https://doi.org/10.1079/9780851992945.0009>
- Titarenko E, López-Solanilla E, García-Olmedo F, Rodríguez-Palenzuela P (1997) Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) Solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. J Bacteriol 179:6699–6704. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6699-6704.1997>
- Tsaneva M, Van Damme E (2020) 130 years of plant lectin research. Glycoconj 37:533–551. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>
- Van Damme E, Peumans W, Barre A, Rougé P (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Crit Rev Plant Sci 17:575–692. <https://doi.org/10.1080/07352689891304276>
- Van Damme E, Lannoo N, Peumans W (2008) Plant Lectins. Adv Bot Res 48:107–209. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)
- Van Holle S, Smaghe G, E Van Damme (2016) Overexpression of nictaba-like lectin genes from glycine max confers tolerance toward *Pseudomonas syringae* infection, aphid infestation and salt stress in transgenic Arabidopsis plants. Front Plant Sci 7:1590. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01590>
- Vandenborre G, Smaghe G, Van Damme E (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochem 72:1538–50. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.024>
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3:research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Varbanets L, Vasil'ev V, Brovarkaya O (2003) Characterization of lipopolysaccharides from *Ralstonia solanacearum*. Microbiol 72:12–17. <https://doi.org/10.1023/A:1022261619561>
- Venisse JS, Gullner G, Brisset MN (2001) Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiol 125:2164–72. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.2164>
- Vilakazi C, Dubery I, Piater L (2017) Identification of lipopolysaccharide-interacting plasma membrane-type proteins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol Biochem 111:155–65. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.11.025>
- Warneys R, Gaucher M, Robert P, Aligon S, Anton S, Aubourg S, Barthes N, Braud F, Cournol R, Gadenne C, Heintz C, Brisset MN, Degrave A (2018) Acibenzolar-S-methyl reprograms apple transcriptome toward resistance to rosy apple aphid. Front Plant Sci 9:1795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01795>
- Wei ZM, Sneath B, Beer S (1992) Expression of *Erwinia amylovora* hip genes in response to environmental stimuli. J Bacteriol 174:1875–82. <https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6201-6210.1995>
- Wickman H (2016) ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Xin Y, Xiangrong Z, Mingju Z, Wenchoao G, Yingchuan T, Qizhong X, Jiahe W (2011) Transgenic potato overexpressing the *Amaranthus Caudatus* agglutinin gene to confer aphid resistance. Crop Sci 51:2119–24. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.11.0650>
- Xu J, Julie Lee YR, Liu B (2020) Establishment of a mitotic model system by transient expression of the D-type cyclin in differentiated leaf cells of tobacco (*Nicotiana Benthamiana*). New Phytol 226:1213–20. <https://doi.org/10.1111/nph.16309>
- Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. Nat Protoc 1:641–46. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

### 2.1.2. Profil d'expression de gènes de défenses chez les lignées OE

Dans l'article présenté précédemment, une des hypothèses avancées pour expliquer l'absence de résistance des lignées OE suite à l'infection par *Ea* est que la surexpression constitutive de MdAGG10 modifie le niveau d'expression d'autres gènes pouvant participer à la défense contre le feu bactérien et/ou modifie la balance croissance/défense de la plante. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié chez ces lignées l'expression des gènes de la « qPFD » du pommier (Brisset et Dugé de Bernonville, 2011), dont les *MdAGGs*, en condition d'infection par *Ea*. Ces résultats d'expression sont présentés dans la **figure 36**.



**Figure 36 : Expression relative des gènes de la qPFD du pommier chez les lignées surexpresses en présence ou absence d'*Ea*.** Chaque valeur correspond à la moyenne de l'expression de trois échantillons par rapport à la moyenne de l'expression mesurée chez la modalité « Gala non traitée », infiltrée avec de l'eau. L'expression des gènes est mesurée 24 heures après une infiltration avec de l'eau ou une solution d'*Ea*. Nous avons réalisé un test de rang de Wilcoxon en comparant la valeur d'expression de chaque gène de la qPFD entre les différentes modalités. Aucune expression d'un gène n'est significativement différente entre les différentes modalités.

En absence d'infection, on peut déjà remarquer que l'expression de ces gènes de défense est globalement plus importante chez les lignées OE par rapport au témoin résistant. En condition d'infection, on remarque également une expression globale des gènes de la qPFD légèrement supérieure chez les lignées OE par rapport au témoin résistant. Cependant, en comparant l'expression gène à gène des lignées OE par rapport au témoin résistant, en présence ou en absence d'infection, il n'y a aucune différence significative.

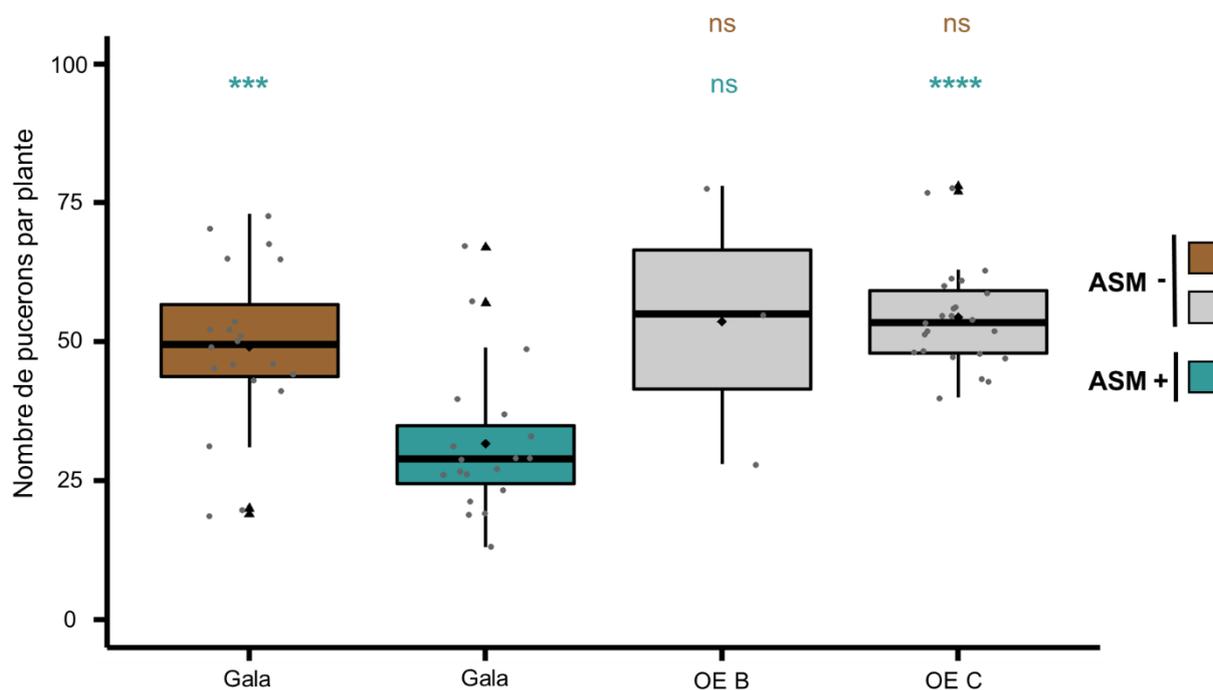
Cette analyse, même non significative statistiquement, semble donc accréditer l'hypothèse que la surexpression constitutive de *MdAGG10* induit légèrement plus les gènes de la qPFD par rapport au

témoin résistant. Cependant, ces légères inductions ne permettent pas d'expliquer la sensibilité de ces lignées au feu bactérien.

## 2.2. Caractérisation phénotypique des lignées OE vis-à-vis du puceron cendré

Comme pour les lignées Crispr, nous avons voulu étudier le phénotype des lignées OE suite à l'infestation de *Dp* et vérifier si la seule surexpression constitutive de *MdAGG10* était suffisante pour conférer au pommier une résistance au puceron cendré. Pour cela, nous avons utilisé les lignées OE B & C car elles ont un taux d'enracinement supérieur à la lignée OE A (cf. Tableau 3 dans Bodelot et al – 2023 -).

Pour la lignée OE B, le faible nombre de plantes où le dénombrement a été possible (n=3) ne permet pas de conclure quant à un quelconque effet de la surexpression de *MdAGG10* vis-à-vis de *Dp*. Le résultat du test montre par ailleurs que le nombre de pucerons moyens compté sur la lignée OE C est équivalent à celui compté sur le témoin sensible et significativement supérieur à celui compté sur le témoin résistant (Figure 37). La surexpression constitutive de *MdAGG10* chez la lignée OE C ne semble donc pas affecter les traits de vie de *Dp* et paraît insuffisante pour conférer au pommier une résistance au puceron cendré.



**Figure 37 : Boxplot représentant le nombre de pucerons comptés 10 jours après l'infestation de *Dp*.** Chaque point gris représente le nombre de pucerons sur une plante, les triangles noirs représentent les données considérées comme aberrantes et le losange noir correspond au nombre moyen de pucerons pour la modalité correspondante. Pour les tests statistiques, les indications **en bleu** représentent des comparaisons avec le 'Gala' traité à l'ASM, les indications **en marron** représentent des comparaisons avec le 'Gala' non traité à l'ASM. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \*\*\*\*P<0,0001 ; \*\*\*P<0,001 ; ns non significatif.

### 2.3. Discussion

Malgré des résultats prometteurs *in vitro* montrant la capacité de MdAGG10 à agglutiner un large spectre de bactéries (phyto)pathogènes, sa surexpression *in planta* s'avère ne pas conférer de résistance, ni au feu bactérien chez le pommier, ni à la pourriture bactérienne chez *A. thaliana* (Bodelot et al, 2023). La surexpression de *MdAGG10* ne semble pas non plus conférer de résistance contre *Dp* (**Figure 37**). Pour rappel, une des hypothèses expliquant l'absence de résistance pour les plantes surexprimant MdAGG10 dans le pathosystème *A. thaliana/R. solanacearum* était que lors de l'infection, le pH dans l'apoplaste d'*A. thaliana* n'est pas assez acide pour que l'agglutination entre la bactérie et MdAGG10, observée *in vitro*, puisse se produire *in planta*. Présente à l'échelle planétaire, cette maladie peut infecter une large gamme de plantes et peu de moyens de luttés sont disponibles hormis la création de variétés résistantes (Huet, 2014). Dans ce contexte, les résultats d'agglutination *in vitro* entre *R. solanacearum* et MdAGG10 ouvrent peut être une nouvelle voie d'investigation, impliquant la recherche et la caractérisation d'autres lectines à pouvoir agglutinant chez les plantes hôtes de cette bactérie, dans la gamme de pH requise.

Concernant le pathosystème *M. domestica/E. amylovora*, une des hypothèses expliquant la sensibilité des lignées OE au feu bactérien était l'absence d'expression, chez les lignées OE, d'autres molécules intervenant chez le témoin résistant, en réponse au traitement à l'ASM. Les résultats présentés dans la partie 2.1.2 ne nous permettent pas de valider ou de rejeter cette hypothèse. En effet, même si l'expression globale des gènes de la qPFD du pommier en valeur absolue est légèrement plus importante chez les lignées OE par rapport au témoin résistant, en présence ou en absence d'infection, la comparaison gène à gène entre le témoin résistant et les lignées OE ne montre aucune différence significative (**Figure 36**). Cependant, les gènes de la qPFD du pommier ne représentent que 29 gènes parmi les milliers impliqués dans la défense du pommier et induits suite à l'application d'ASM. Ainsi, tous les gènes de la qPFD ne participent pas forcément à la résistance au feu bactérien et certains gènes pouvant y participer n'y sont pas présents. L'expression des gènes de la qPFD après l'infestation de *Dp* n'a pas été réalisée mais un raisonnement similaire est applicable ici concernant l'absence d'impact de MdAGG10 sur les traits de vie de *Dp*.

Une autre hypothèse soulevée dans mon article, pouvant expliquer la sensibilité des lignées OE au feu bactérien, est l'impact néfaste de la surexpression de MdAGG10 sur la physiologie de la plante. En effet, les résultats présentés dans la partie 2.1.2 montrent que la surexpression de *MdAGG10*, en absence d'infection, induit l'expression de certains gènes de défenses, même si le faible nombre de mesures d'expression empêche d'observer une significativité. Ces résultats montrent donc que les lignées OE subissent un stress constitutif suite à la surexpression de *MdAGG10*. De plus pour rappel, les pommiers OE sont plus petits et ont un taux d'enracinement plus faible que des plantes non transformées (Bodelot et al, 2023). Des études ont déjà montré l'impact néfaste d'une expression trop importante de lectines

sur la croissance des plantes. Maeda et al (2023) a montré qu'une surexpression trop importante du gène *BROAD SPECTRUM RESISTANCE 1*, codant pour une lectine impliquée dans la résistance à différentes maladies fongiques et bactériennes, pouvait diminuer la taille de la canne à sucre la surexprimant. D'autres études ont déjà montré que l'extinction de certaines lectines entraînait une diminution de la taille ou du rendement de certaines plantes. C'est le cas par exemple chez le riz avec l'édition de la séquence du gène *OsSRK1*, une LecRLK, entraînant une diminution de la taille des plantes (Li et al, 2022). Cependant, le contrôle de ces lectines dans le développement des plantes est souvent dû aux activités kinases des LecRLKs plutôt qu'à leur activité lectine. A l'inverse, la surexpression de *NpPPP2-B10*, une lectine appartenant à la famille des Nictaba entraîne un meilleur taux de germination de graines de tabac ainsi qu'une croissance plus rapide des plantes (Wen et al, 2023). Dans nos différentes caractérisations, nous avons observé chez certaines de nos lignées Crispr (Crispr C & M) que l'édition de la séquence des *MdAGGs* entraîne un taux de croissance supérieur au témoin et ce, lors des deux acclimations en serre. Pour vérifier l'implication de MdAGG10 voire des MdAGGs en général dans la croissance du pommier, il pourrait être intéressant d'étudier l'expression de gènes impliqués dans la croissance chez les lignées OE. Néanmoins, des travaux menés dans le cadre d'une autre thèse dans mon laboratoire, portant sur la relation entre efficacité des SDP et nutrition en azote des pommiers, semblent indiquer qu'il est compliqué d'identifier des gènes impliqués dans la croissance du pommier et suffisamment différentiels pour mener ce type d'analyse.

## **CHAPITRE 2 : CREATION D'UNE RESISTANCE DURABLE DU POMMIER CONTRE LE FEU BACTERIEN VIA LA TECHNIQUE DE L'INTRAGENÈSE**

Nous avons déjà vu dans l'introduction générale de la thèse qu'il n'existe actuellement aucun moyen de lutte efficace contre le feu bactérien et la majorité des variétés de pommiers cultivées y sont sensibles. Certaines résistances ont été identifiées dans plusieurs études (Calenge et al, 2005 ; Peil et al, 2007 ; Durel et al, 2009 ; cf. partie 1.3.3. de l'introduction) mais le pommier étant une espèce pérenne auto-incompatible, le délai de création d'une nouvelle variété est de 15 à 25 ans et ces résistances ne sont donc pas encore disponibles en vergers commerciaux. Le développement des NBTs depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle permettrait d'accélérer le délai d'obtention de nouvelles variétés (Lusser et al, 2011). Parmi ces techniques, on trouve l'intragénèse précédemment définie (Rommens et al, 2007 ; cf. partie 3.2.3. de l'introduction). Les produits issus de cette technique sont encore considérés en Europe comme des OGM mais cette classification peut évoluer dans les mois qui viennent puisqu'ils sont concernés par la réévaluation de classification en cours suite au rapport de la commission européenne (2023).

Dans le chapitre 1, nous avons démontré *in planta*, grâce à l'outil d'édition du génome CRISPR/Cas9, que les agglutinines participent à la résistance du pommier contre le feu bactérien (cf. partie 1.1.). Cependant, leur expression chez ce dernier est conditionnée à un traitement préalable à l'ASM qui, en conditions contrôlées, possède une efficacité intéressante mais comme les autres SDP, voit son efficacité chuter lorsqu'il est appliqué en vergers (Walters et al, 2007). Nous avons également vu dans le chapitre 1 (cf. partie 2.1.) que le promoteur *p35s* utilisé pour surexprimer constitutivement *MdAGG10*, ne permet pas d'obtenir une résistance contre le feu bactérien chez le pommier. De plus, cette surexpression semble avoir un effet néfaste sur la physiologie des plantes transgéniques, avant même l'infection par *Ea*. Ces résultats ont confirmé que l'utilisation d'un promoteur surexprimant de manière constitutive *MdAGG10* ne semblait pas être un bon moyen pour créer de la résistance.

Pour utiliser cette famille de gènes, il faudrait donc les associer au promoteur d'un gène fortement inductible par *Ea* (les MdAGGs n'étant que peu induites par la bactérie), qui ne déclencherait donc la production de MdAGG qu'à l'occasion d'une infection. Un tel promoteur ayant déjà été identifié par l'équipe (promoteur du gène de polyphénol oxydase pPPO16), son association avec *MdAGG10* a été étudiée, pour l'élaboration d'une résistance durable du pommier au feu bactérien par intragénèse.

Dans ce chapitre, je vais commencer par détailler la stratégie d'obtention des lignées intragéniques puis je présenterai la caractérisation moléculaire et phénotypique des lignées transgéniques et intragéniques obtenues.

## 1. Obtention des constructions et lignées

### 1.1. Choix des éléments de la cassette intragénique à associer à la séquence codante de *MdAGG10*

La surexpression constitutive de *MdAGG10* n'étant pas la solution pour obtenir une résistance contre le feu bactérien, il fallait choisir un promoteur qui ne serait induit que lorsque la plante serait infectée par *Ea*. Cette dernière induit l'expression de nombreux gènes chez le pommier lors de son attaque (Baldo et al, 2010 ; Sarowar et al, 2011) et dans le cadre de cette réflexion sur le promoteur à associer à la séquence codante de *MdAGG10*, le choix s'est porté sur le promoteur du gène *PPO16* (*pPPO16*) de pommier, décrit par Gaucher et al, (2022a). Lors de l'infection par *Ea*, ce promoteur permet une induction forte, précoce (dès six heures post infection), et transitoire (décroissance dès 6 heures post infection) de la séquence codante associée. Il fait donc un bon candidat puisque que sous son contrôle, l'expression de *MdAGG10* ne serait induite qu'au moment opportun, lors de l'attaque par la bactérie. Concernant le terminateur, nous avons choisi le terminateur de la Rubisco (*TermRubisco*), la protéine permettant la fixation du CO<sub>2</sub> dans les plantes *via* la photosynthèse (Ellis, 1979). Ce terminateur a déjà été utilisé plusieurs fois pour la génération de pommiers intragéniques (Joshi et al, 2011 ; Schaart et al, 2011).

Dans le cadre de ma thèse j'ai réalisé deux constructions différentes : pPPO16-MdAGG10-Term35S (PA) et pPPO16-MdAGG10-TermRubisco (PAT). Du fait de la présence de ce terminateur d'origine virale, la construction PA ne pourra pas donner lieu à des plantes considérées comme intragéniques. Par contre, elle me permettait de tester, dans le cadre de la thèse, l'intérêt de l'association entre pPPO16 et MdAGG10. Les résultats phénotypiques obtenus sur l'association entre le promoteur pPPO16 et MdAGG10 pourront nous donner une indication sur le comportement possible des lignées intragéniques lorsqu'elles seront obtenues. La production de plantes intragéniques est beaucoup plus longue (environ un an de plus) qu'une transformation classique, car elle se fait en deux étapes, 1) la production de plantes transgéniques par protocole classique (cf. matériel et méthodes, partie 6.1.), puis 2) la régénération de plantes intragéniques à partir de tissus foliaires des plantes transgéniques initiales, par activation de la recombinase combinée à une sélection négative des cellules régénérantes non recombinées (cf. matériel et méthodes, partie 6.2.). Être en mesure d'obtenir les lignées intragéniques PAT et d'en réaliser l'analyse n'était pas envisageable dans le cadre de ma thèse. Nous avons pu réaliser l'étape 1) du processus avec la construction PAT et l'étape 2) est en cours, l'analyse de ces plantes étant prévue au-delà de la fin de ma thèse.

### 1.2. Obtention des constructions PA et PAT

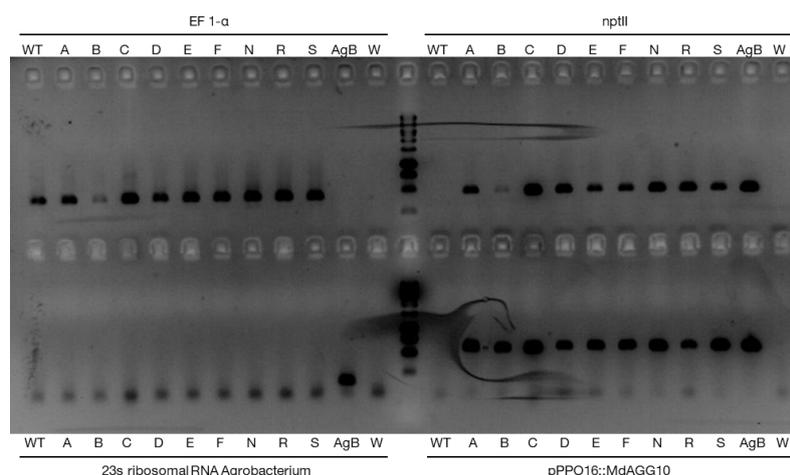
Au contraire des constructions p35s-MdAGG10 et Crispr qui avaient déjà été obtenues avant mon arrivée en thèse, j'ai construit les plasmides comprenant les constructions PA et PAT. La première étape

a consisté à insérer le promoteur *pPPO16* et la séquence codante de *MdAGG10* au sein de deux plasmides distincts puis de les associer par digestion / ligation. Pour plus de détails, voir la partie 5.3.1 du matériel et méthodes.

Pour obtenir la construction PAT, la séquence du Term35S présente dans le plasmide contenant PA est remplacée par la séquence de TermRubisco (au préalable insérée dans un plasmide intermédiaire) par digestion / ligation. Pour permettre l'obtention de pommiers intragéniques, il faut par ailleurs choisir un plasmide contenant une recombinase, qui nous permettra d'éliminer du T-DNA toute autre séquence que l'ensemble promoteur – séquence codante – terminateur d'intérêt. Cette partie non souhaitée après transformation, contient notamment la recombinase elle-même et les gènes de sélection. Notre choix s'est porté sur le plasmide pMF1-GFP-dest, un plasmide qui comme *TermRubisco* a déjà été utilisé dans la création de lignées de pommiers intragéniques (Schaart et al, 2010). La séquence PAT est ensuite insérée dans le plasmide pMF1-GFP-dest *via* un clonage Gateway®. Pour plus de détails concernant la construction de ce plasmide, se référer à la partie 5.3.2 du matériel et méthodes.

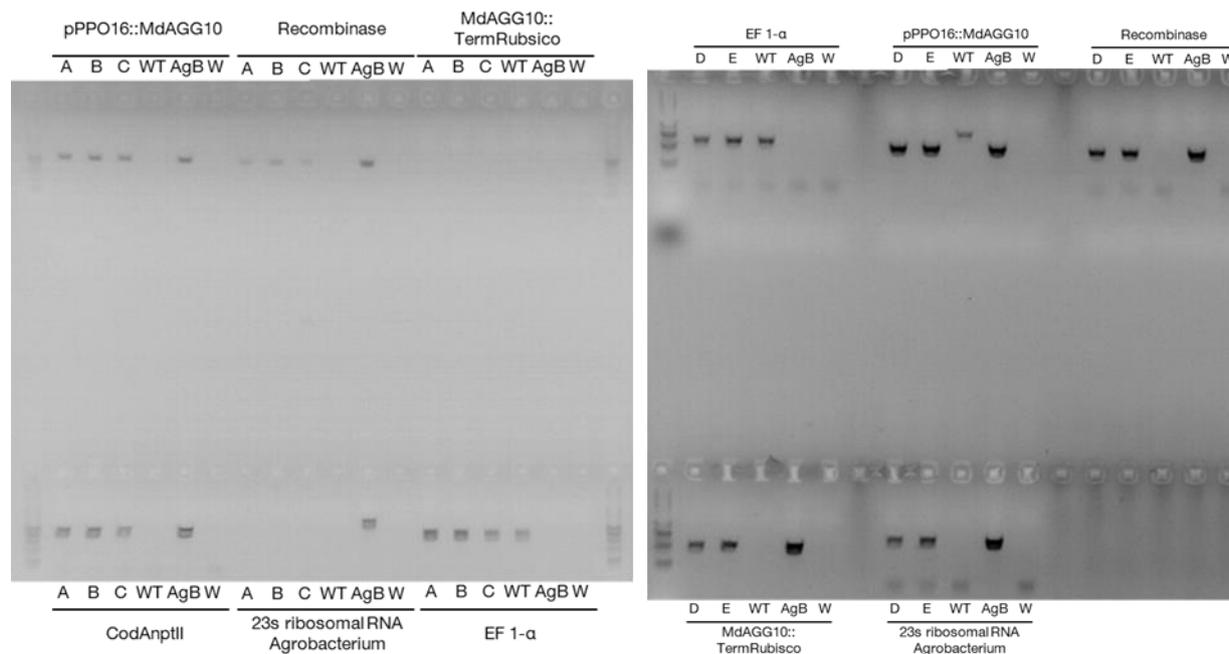
### 1.3. Obtention des lignées contenant la construction PA ou la construction PAT

En deux transformations successives nous avons obtenu neuf lignées de pommiers transgéniques contenant la cassette PA dans le fond génétique 'Gala'. Par la suite, ces lignées seront nommées PA-A ; PA-B ; PA-C ; PA-D ; PA-E ; PA-F ; PA-N ; PA-R et PA-S. Ces lignées ont été obtenues après agroinfiltration de 1 150 feuilles, soit un taux de transformation de 0,78 %. Le génotypage par PCR de ces lignées prouvant la présence du T-DNA complet et l'absence de contamination par *Agrobacterium* est présenté en **figure 38**. Parmi ces 9 lignées, nous avons décidé d'étudier les lignées PA-A à PA-F car elles étaient plus avancées que les autres en termes de nombre de plantes disponibles au début des expérimentations.



**Figure 38** : PCR sur l'ADNg des 9 lignées transgéniques de pommiers ayant la cassette PA dans le plasmide pKGWFS7. WT : Plante non transformée ; Lignée A à F, N, R, S : Lignées transgéniques sélectionnées ; AgB : ADN extrait de la souche d'*A. tumefaciens* utilisée pour la transformation stable ; W : Témoin Eau. Les séquences des couples d'amorces utilisés pour les amplifications sont résumées dans l'**annexe 2**.

Dans un deuxième temps, nous avons obtenu six lignées de pommiers contenant la cassette PAT dans le fond génétique ‘Gala’. Ces lignées seront nommées par la suite PAT-A ; PAT-B ; PAT-C ; PAT-D et PAT-E. Ces 5 lignées ont été obtenues en deux transformations successives totalisant 1 017 feuilles agroinfiltrées, soit un taux de transformation de 0,49 %. Le génotypage par PCR de ces lignées prouvant la présence du T-DNA complet et l’absence de contamination par *Agrobacterium* est présenté en **figure 39**.



**Figure 39 : PCR sur l’ADNg des 5 lignées transgéniques de pommiers ayant la cassette PAT dans le plasmide pMF1-GFP-dest.** WT : Plante non transformée ; Lignée A à E: Lignées transgéniques sélectionnées ; AgB : ADN extrait de la souche d’*A. tumefaciens* utilisée pour la transformation stable ; W : Témoin Eau. Les séquences des couples d’amorces utilisés pour les amplifications sont résumées dans l’annexe 2.

Pour les lignées PAT-A ; PAT-B et PAT-D, les expérimentations de l’étape 2) permettant d’activer la recombinaison des éléments non souhaités après transformation, et de favoriser la régénération des cellules recombinées par sélection négative des non-recombinés sont actuellement en cours.

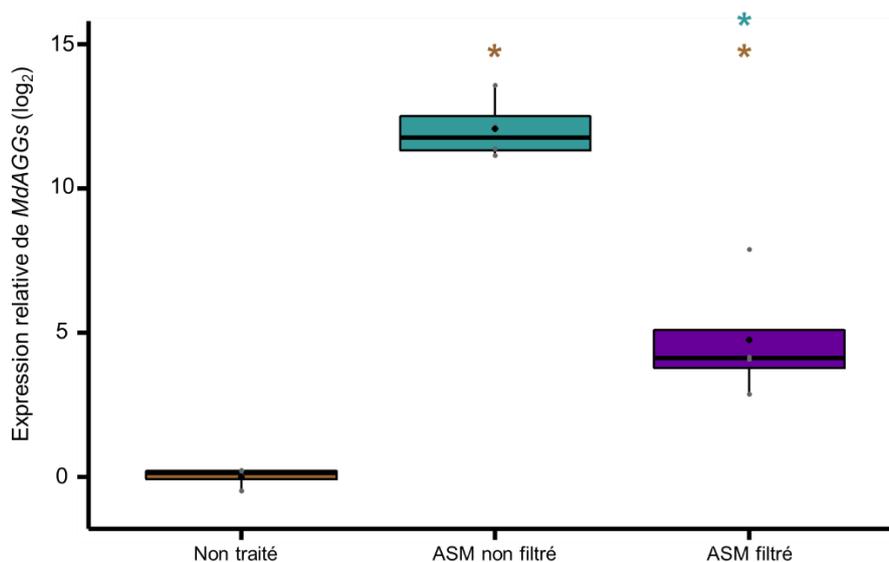
## 2. Caractérisation des lignées transgéniques PA au stade vitroplant

Dans cette partie, nous allons présenter la caractérisation moléculaire et phénotypique des lignées PA suite à l’infection par *Ea*. Dans un objectif de gain de temps, nous avons débuté cette caractérisation au stade vitroplant même si la révélation d’une potentielle résistance partielle sur ce type de matériel semble périlleuse, étant donné la plus grande sensibilité des vitroplants à *Ea* par rapport à des semis ou des plantes acclimatées en serre. Préalablement aux tests des lignées PA, nous avons voulu vérifier que notre contrôle de résistance, ‘Gala’ traité à l’ASM, était toujours utilisable dans ces conditions favorables au feu bactérien. Chez des vitroplants de ‘Gala’ traités à l’ASM et en comparaison au contrôle sensible

représenté par des vitroplants de ‘Gala’ non traités, j’ai donc d’une part mesuré le niveau d’expression des *MdAGGs* et d’autre part analysé leur phénotype suite à l’infection par *Ea*.

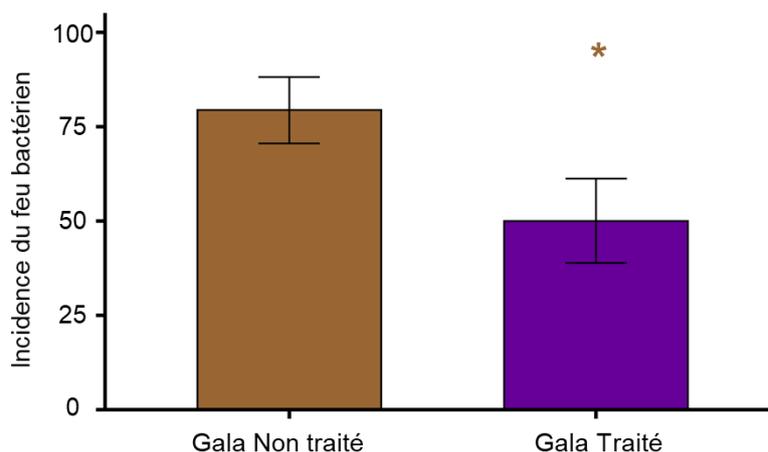
### 2.1. Vérification préliminaire de l’expression des *MdAGGs* et de la résistance au feu bactérien conférée par un traitement à l’ASM chez des vitroplants de ‘Gala’

Le niveau d’expression relative des *MdAGGs* suite à un traitement à l’ASM est présenté dans la **figure 40**. Nous avons utilisé deux modalités de traitement différentes : une modalité « ASM non filtré » et une modalité « ASM filtré ». Le travail sur vitroplants devant se faire en conditions stériles, nous voulions éliminer le plus possible de contaminations potentielles présentes dans la formulation du Bion® 50WG, tout en vérifiant que cette filtration n’altérerait pas l’efficacité du produit. Le résultat montre que par rapport à un témoin non traité à l’ASM, nous observons dans les deux cas une induction significative de l’expression des *MdAGGs* suite à l’application d’ASM. On peut donc ensuite vérifier si la filtration ne fait pas perdre à l’ASM son pouvoir protecteur contre le feu bactérien.



**Figure 40 : Mesure de l’effet de la filtration de la solution d’ASM sur l’expression relative des *MdAGGs* chez des vitroplants ‘Gala’.** Chaque point gris représente l’expression d’un échantillon relativement au témoin non traité et le losange noir représente l’expression moyenne. Pour les tests statistiques, les valeurs **en bleu** sont comparées au ‘Gala’ traité à l’ASM non filtré, les valeurs **en marron** sont comparées au ‘Gala’ non traité à l’ASM. Significativité du test de rang de Wilcoxon : \*P<0,05.

Le niveau d’incidence de la maladie chez les vitroplants traités ou non à l’ASM filtré est présenté dans la **figure 41**. Les résultats montrent que ce traitement permet bien de conférer une résistance après infection : l’ASM a une efficacité de protection de 37%, une valeur inférieure à ce qui a été mesurée précédemment dans la thèse (cf. Chapitre 1 ; partie 1.2.) mais que l’on considère comme suffisante pour envisager la caractérisation des lignées PA au stade vitroplant.



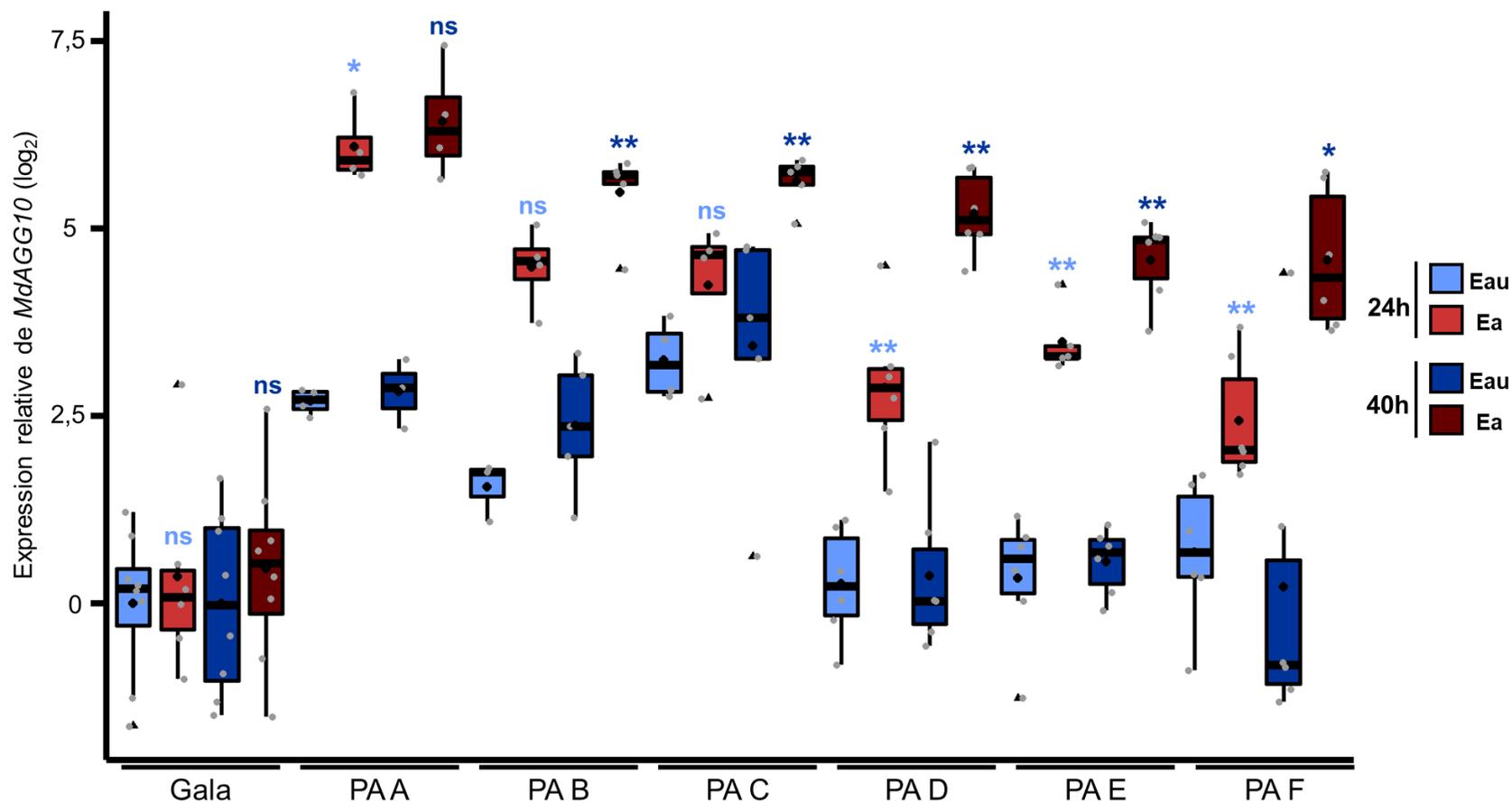
**Figure 41 : Vérification de l'action de protection du Bion contre une infection d'*Ea*.** La modalité « Non Traité » (respectivement « Traité ») correspond à une absence de traitement à l'ASM (respectivement à un traitement à l'ASM). L'incidence du feu bactérien est mesurée 15 jours après l'inoculation sur des vitroplants de 'Gala' traités ou non à l'ASM. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard. Significativité du test de Student : \* $P < 0,05$ .

## 2.2. Expression de *MdAGG10* et accumulation de la protéine dans les tissus des lignées PA suite à l'infection par *Ea*

Avant de caractériser phénotypiquement les six différentes lignées, j'ai tout d'abord vérifié que suite à l'infection par *Ea*, ces six lignées PA surexprimaient bien *MdAGG10* et qu'on observait une accumulation de la protéine dans les tissus foliaires.

La **figure 42** récapitule les résultats correspondants. Pour toutes les lignées, on remarque que l'infiltration par *Ea* comparée à celle d'eau a significativement induit l'expression de *MdAGG10*, visible à 24 heures comme à 40 heures post infiltration. On observe plusieurs profils dans l'expression de *MdAGG10* (**Tableau 6**) :

- Pour les lignées PA-A et PA-B, on observe une expression de *MdAGG10* quasiment stable 24 et 40 heures après l'infection avec un niveau d'induction par *Ea* respectivement 10,5 et 7,5 fois supérieur au niveau observé avec de l'eau,
- La lignée PA-C est induite plus faiblement que les autres lignées (*MdAGG10* y est exprimée 2 fois plus 24 heures après l'infection d'*Ea*, 4 fois plus 40 heures après l'infection),
- Les lignées PA-D et PA-F sont moyennement induites 24 heures après l'infiltration par *Ea* (respectivement 6 et 3,5 fois plus par rapport à celle observée avec de l'eau) mais fortement induites 40 heures après. *MdAGG10* y est exprimée respectivement 28 et 36 fois plus par rapport à l'expression mesurée chez les plantes infiltrées avec de l'eau,
- Chez la lignée PA-E, on observe 24 heures après l'infection, une induction 8,5 fois supérieure chez les plantes infiltrées par *Ea* par rapport aux plantes infiltrées par de l'eau, suivie d'un doublement de l'expression de *MdAGG10* 16 heures plus tard.



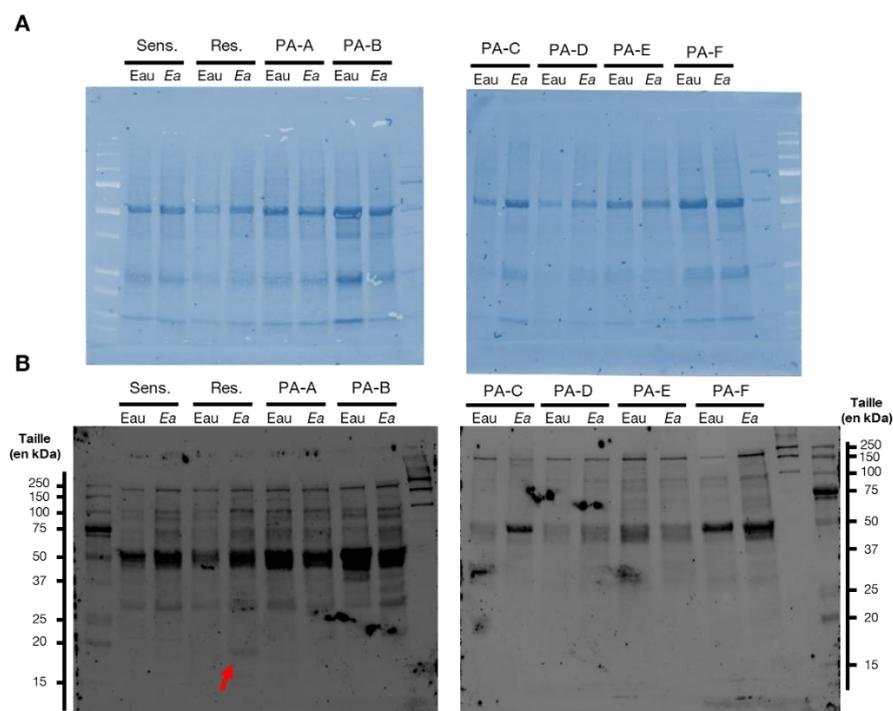
**Figure 42 : Expression relative de *MdAGG10* chez les lignées PA ainsi que chez ‘Gala’ 24 et 40 heures après l’infiltration d’eau ou d’*Ea*. Les expressions mesurées 24 heures après infiltration (respectivement 40 heures) sont calibrées avec la moyenne de l’expression mesurée chez ‘Gala’ 24 heures après une infiltration avec de l’eau (respectivement 40 heures après une infiltration avec de l’eau). Chaque point gris représente l’expression relative d’un échantillon, les losanges noirs représentent la moyenne de l’expression relative de chaque modalité et les triangles noirs correspondent aux outliers. Pour les tests statistiques, chaque modalité infiltrée avec *Ea* est comparée à la même modalité infiltrée avec de l’eau. Significativité des tests de rang de Wilcoxon : \*\* $P < 0,01$  ; \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.**

		Expression relative <sub>Ea</sub> - Expression relative <sub>Eau</sub>	
Modalité	Temps Post-infiltration	Expression relative moyenne (log <sub>2</sub> )	Expression relative moyenne
Gala Non traité	24 heures	0,359	1,283
	40 heures	0,462	1,378
PA-A	24 heures	3,392	10,498
	40 heures	3,606	12,174
PA-B	24 heures	2,928	7,610
	40 heures	3,107	8,617
PA-C	24 heures	1,004	2,006
	40 heures	2,195	4,578
PA-D	24 heures	2,617	6,136
	40 heures	4,827	28,381
PA-E	24 heures	3,147	8,855
	40 heures	4,021	16,230
PA-F	24 heures	1,756	3,377
	40 heures	5,194	36,610

**Tableau 6 : Valeur moyenne de l'expression relative de MdAGG10.** Les valeurs dans le tableau correspondent à la différence à un temps post infiltration donnée, de la moyenne de l'expression relative de MdAGG10 après l'infiltration d'Ea et la moyenne de l'expression relative de MdAGG10 après l'infiltration de l'eau.

Nous avons par la suite vérifié si cette induction de *MdAGG10* par *Ea* se traduisait par une accumulation de la protéine dans les tissus foliaires, 40 heures post infiltration. A l'inverse de la mesure de l'expression de *MdAGG10* qui s'est faite sur des vitroplants, la mesure de l'accumulation de MdAGG10 a été faite sur des plantes acclimatées en serre. Malheureusement, nous n'observons aucune accumulation de MdAGG10 dans aucune des 6 lignées PA (**Figure 43**). Nous détectons tout de même les MdAGG10 chez le témoin résistant infiltré avec *Ea*.

Nous avons ensuite voulu vérifier si la construction PA permettait de conférer une résistance au feu bactérien, et ce dès le stade vitroplant.



**Figure 43 : Accumulation de MdAGG10 chez les lignées PA 40 heures après l’infiltration de l’eau ou d’*Ea*.** Dans chaque puits se trouve 11 µg de protéines. Sens. (respectivement Res.) correspond à des plantes ‘Gala’ non traitées (respectivement traitées) à l’ASM 3 jours avant l’infiltration. **(A)** Membrane après transfert vérifiant l’homogénéité de la quantité de protéines présente dans chaque puits. La membrane est colorée avec un filtre rendant un aspect de coloration au bleu de Coomassie. **(B)** Immunodétection sur membrane des MdAGGs. La flèche rouge (➔) pointe la bande représentative des MdAGGs.

### 2.3. Caractérisation phénotypique au stade vitroplant des lignées PA suite à l’infection par *Ea*

#### 2.3.1. Phénotypage des lignées PA après l’infection d’*Ea*

La **figure 44** présente l’incidence et la sévérité de la maladie sur vitroplants pour les six lignées PA, ainsi que pour les témoins respectivement sensible et résistant : des vitroplants de ‘Gala’, traité ou non à l’ASM. On remarque que 12 jours après inoculation, l’incidence des lignées PA est équivalente à celle du témoin sensible. Par contre, pour deux tiers des lignées (quatre sur six), l’évolution de l’incidence n’est pas identique à celle du témoin sensible. En effet, comme le montre les résultats des tests de Student de comparaison de moyenne deux à deux entre chaque lignée et le témoin sensible (**Tableau 7**), pour les lignées PA-B, et PA-D, l’augmentation de l’incidence s’avère moins rapide entre le cinquième et le sixième jour post infiltration et pour les lignées PA-A, et PA-F entre le cinquième et le septième jour post infiltration (**Figure 44**).

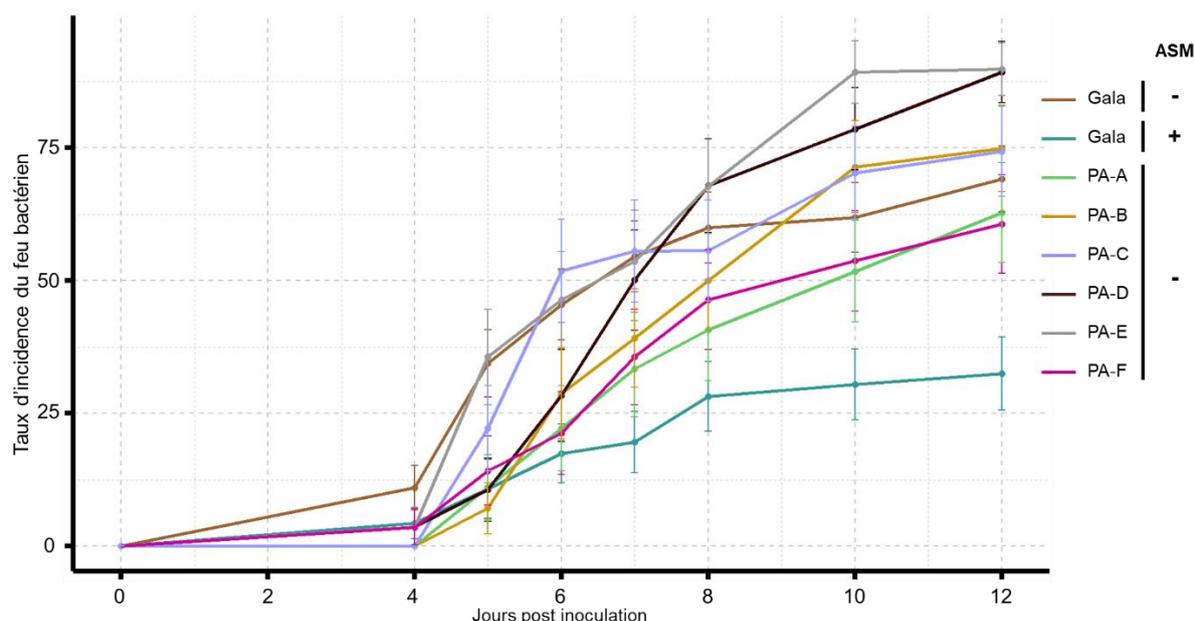
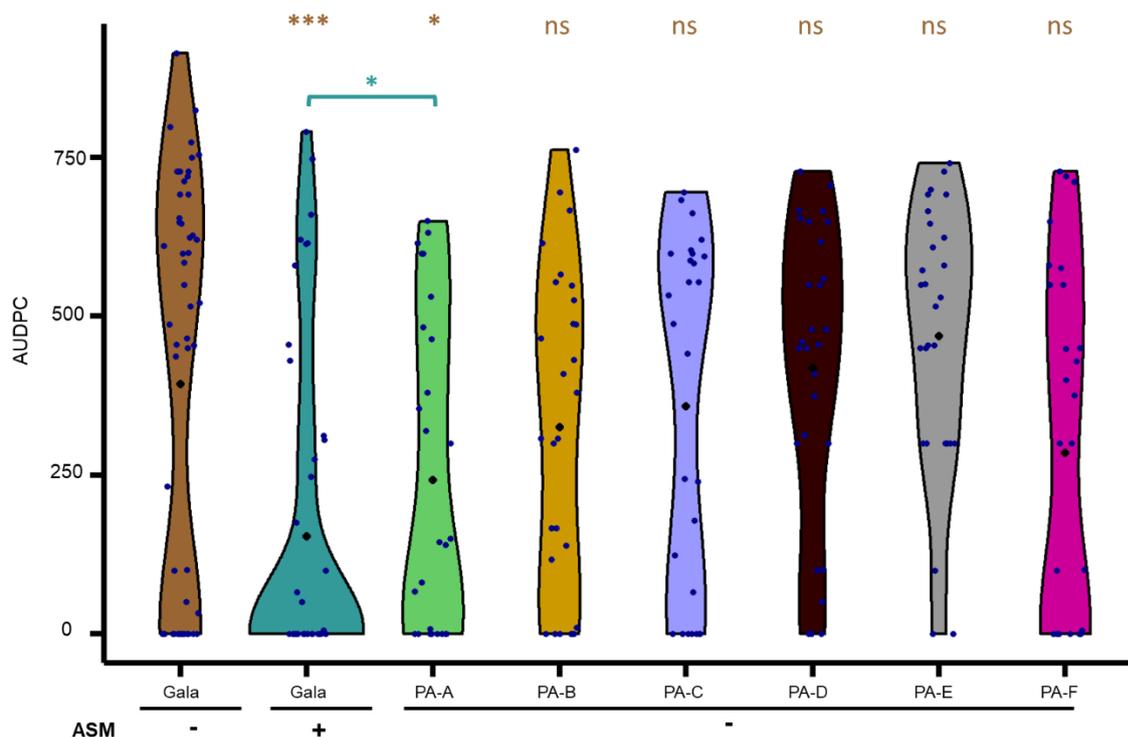


Figure 44 : Evolution de l'incidence du feu bactérien. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type.

4 dpi			5 dpi			6 dpi			7 dpi		
	Témoin sensible	Témoin résistant									
Témoin résistant	0,232		Témoin résistant	0,0035		Témoin résistant	0,002		Témoin résistant	0,0003	
PA-A	0,054	0,144	PA-A	0,011	0,95	PA-A	0,0365	0,62	PA-A	0,077	0,224
PA-B	0,0521	0,146	PA-B	0,0009	0,621	PA-B	0,131	0,296	PA-B	0,195	0,0831
PA-C	0,0538	0,145	PA-C	0,24	0,226	PA-C	0,587	0,004	PA-C	0,937	0,00375
PA-D	0,189	0,88	PA-D	0,009	0,956	PA-D	0,1315	0,0286	PA-D	0,7	0,011
PA-E	0,2	0,876	PA-E	0,935	0,024	PA-E	0,938	0,015	PA-E	0,941	0,006
PA-F	0,191	0,888	PA-F	0,033	0,688	PA-F	0,027	0,0679	PA-F	0,1135	0,147
8 dpi			10 dpi			12 dpi					
	Témoin sensible	Témoin résistant									
Témoin résistant	0,0024		Témoin résistant	0,003		Témoin résistant	0,0005				
PA-A	0,112	0,284	PA-A	0,381	0,082	PA-A	0,574	0,013			
PA-B	0,394	0,071	PA-B	0,375	0,002	PA-B	0,567	0,002			
PA-C	0,691	0,027	PA-C	0,451	0,002	PA-C	0,665	0,002			
PA-D	0,473	0,002	PA-D	0,103	0,0005	PA-D	0,026	0			
PA-E	0,465	0,00325	PA-E	0,004	0	PA-E	0,003	0			
PA-F	0,251	0,129	PA-F	0,485	0,055	PA-F	0,467	0,019			

Tableau 7 : Valeurs des p-values associé au test de Student. « dpi » pour « day post inoculation ». Les valeurs en marron ou en bleu signifient que la différence entre les deux modalités est significative *i.e.* lorsque  $P < 0,05$ .

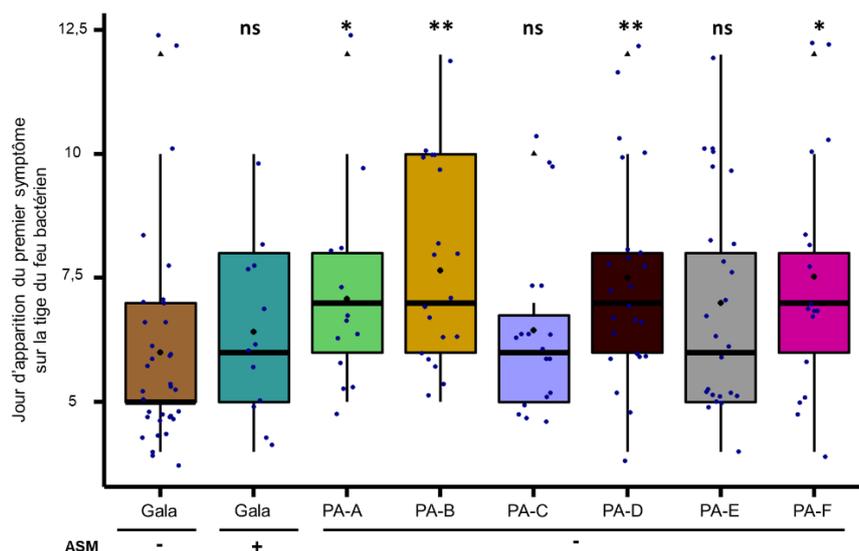
Concernant la sévérité, représentée en figure 45 par le calcul de l'AUDPC sur les 12 jours du phénotypage post infection, les résultats montrent que la lignée PA-A est atteinte avec une sévérité intermédiaire à celles des deux témoins. Les autres lignées sont par contre atteintes aussi sévèrement que le témoin sensible.



**Figure 45 : Mesure de la sévérité du feu bactérien chez les lignées PA.** La modalité « Non Traité » (respectivement « Traité ») correspond à une absence de traitement à l’ASM (respectivement à un traitement à l’ASM). Les points bleus correspondent à la valeur de l’AUDPC d’un vitroplant et les losanges noirs à la valeur moyenne de l’AUDPC pour chaque modalité. Pour les tests statistiques, les valeurs en **bleu** sont comparées au ‘Gala’ traité et les valeurs en **marron** sont comparées au ‘Gala’ non traité. Significativité des tests de rang de Wilcoxon : \*\*\* $P < 0,0001$  ; \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

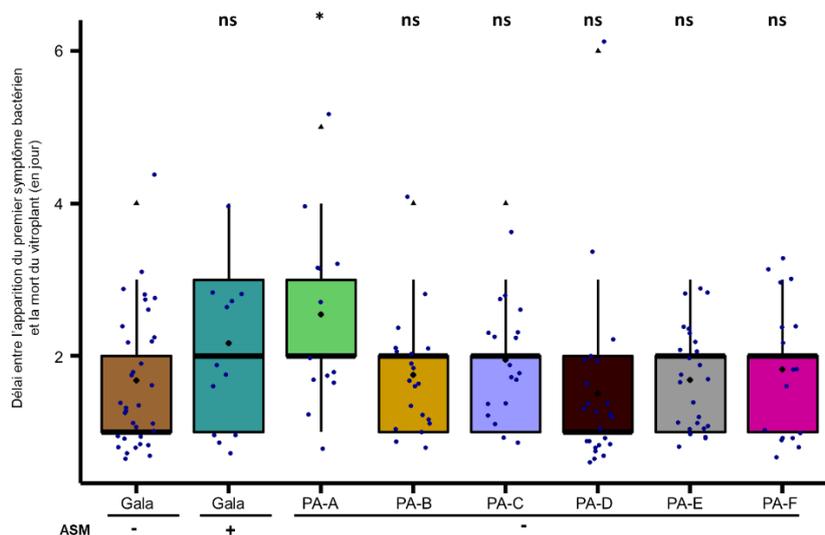
### 2.3.2. Délai d’apparition du premier symptôme de la maladie

L’observation du délai moyen d’apparition du premier symptôme pour chaque lignée (**Figure 46**) montre que pour PA-A, PA-B, PA-D et PA-F, ce délai est significativement plus tardif que chez le témoin sensible, ce qui n’est pas le cas pour PA-C et PA-E.



**Figure 46 : Temps entre l'inoculation et l'apparition du premier symptôme du feu bactérien sur la tige.** Chaque point bleu représente le jour où a été noté pour la première fois un symptôme du feu bactérien sur la tige. Le losange noir est le jour d'apparition moyen du premier symptôme du feu bactérien. Les triangles noirs correspondent aux outliers. Pour les tests statistiques, les valeurs sont comparées au 'Gala' non traité. Signification des tests de rang de Wilcoxon \*\* $P < 0,01$  ; \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

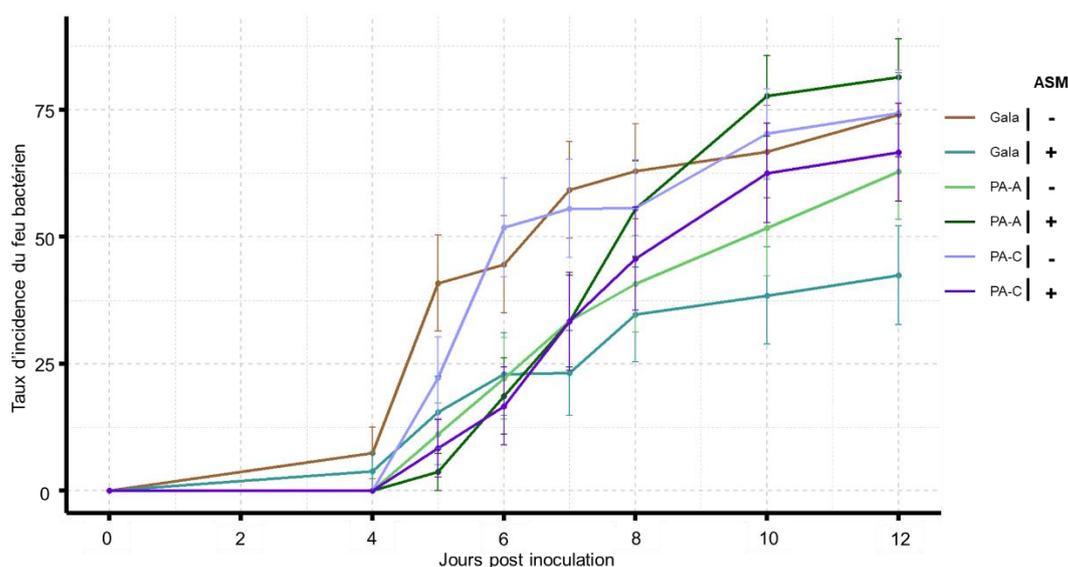
Cependant, une fois que le premier symptôme est apparu, le délai mis par la maladie pour tuer la plante semble similaire entre les lignées et le témoin sensible, hormis pour la lignée PA-A (**Figure 47**) pour laquelle ce délai est plus long d'environ 50% (un peu moins de 2 jours pour le témoin sensible et lignées similaires, un peu moins de 3 jours pour la lignée PA-A).



**Figure 47 : Temps de survie des lignées PA une fois infectée par *Ea*.** Est considéré comme mort un vitroplant présentant des symptômes sur l'ensemble de la tige. Chaque point bleu représente un vitroplant mort. Le losange noir est le délai moyen entre l'apparition du premier symptôme et la mort du vitroplant. Pour les tests statistiques, les valeurs sont comparées au 'Gala' non traité. Signification du test de Wilcoxon : \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

### 2.3.3. Effet d'un traitement à l'ASM sur le phénotype des lignées PA après une infection d'Ea

Nous avons voulu ensuite étudier si un traitement à l'ASM avant infection des lignées PA leur conférait une résistance, équivalente ou supérieure, à celle observée chez le témoin résistant. Nous avons choisi pour cela la lignée PA-A qui semble avoir un niveau de protection intermédiaire aux deux témoins, et la lignée PA-C équivalente au témoin sensible. Pour ces deux lignées, on remarque que 12 jours après inoculation, l'incidence de la maladie (**Figure 48**) est équivalente à celle du témoin sensible et significativement supérieure à celle du témoin résistant, en présence ou en absence de traitement à l'ASM. Le tableau 8 récapitule les résultats des tests de Student comparant les moyennes de l'incidence deux à deux, entre le témoin sensible ou résistant.

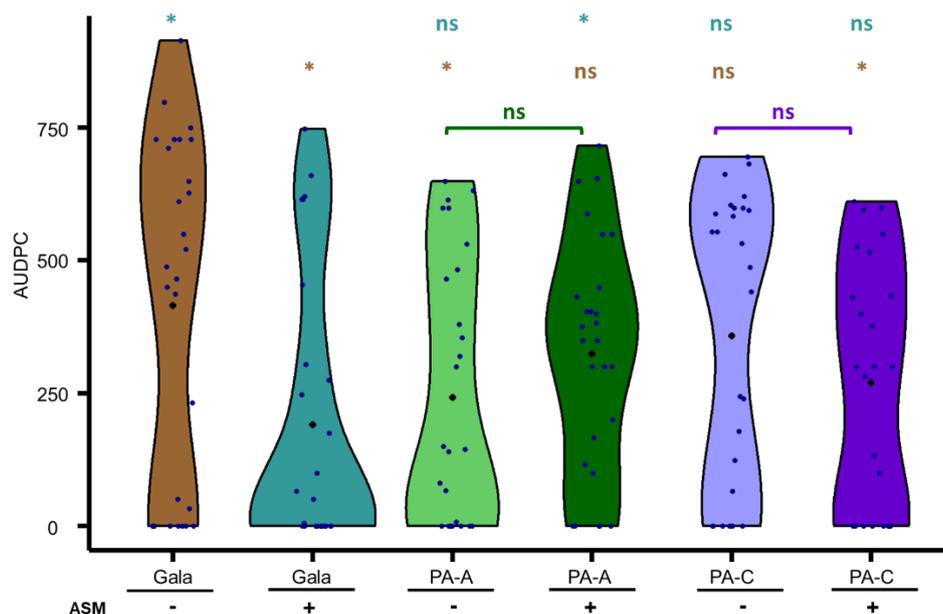


**Figure 48 :** Evolution de l'incidence du feu bactérien. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type.

4 dpi			5 dpi			6 dpi			7 dpi		
	Témoin sensible	Témoin résistant									
Témoin résistant	0,232		Témoin résistant	<b>0,0035</b>		Témoin résistant	<b>0,002</b>		Témoin résistant	<b>0,0003</b>	
PA-A_NT	0,054	0,144	PA-A_NT	<b>0,011</b>	0,95	PA-A_NT	<b>0,0365</b>	0,62	PA-A_NT	0,077	0,224
PA-A_T	0,0535	0,1374	PA-A_T	<b>0,00008</b>	0,2398	PA-A_T	<b>0,0108</b>	0,907	PA-A_T	0,0754	0,2293
PA-C_NT	0,0538	0,145	PA-C_NT	0,24	0,226	PA-C_NT	0,587	<b>0,004</b>	PA-C_NT	0,937	<b>0,00375</b>
PA-C_T	0,0504	0,1397	PA-C_T	<b>0,005</b>	0,6917	PA-C_T	<b>0,0109</b>	0,9116	PA-C_T	0,086	0,2374
8 dpi			10 dpi			12 dpi					
	Témoin sensible	Témoin résistant		Témoin sensible	Témoin résistant		Témoin sensible	Témoin résistant			
Témoin résistant	<b>0,0024</b>		Témoin résistant	<b>0,003</b>		Témoin résistant	<b>0,0005</b>				
PA-A_NT	0,112	0,284	PA-A_NT	0,381	0,082	PA-A_NT	0,574	<b>0,013</b>			
PA-A_T	0,6962	<b>0,0253</b>	PA-A_T	0,1317	<b>0,00041</b>	PA-A_T	0,2064	<b>0,0003</b>			
PA-C_NT	0,691	<b>0,027</b>	PA-C_NT	0,451	<b>0,002</b>	PA-C_NT	0,665	<b>0,002</b>			
PA-C_T	0,264	0,1633	PA-C_T	0,9532	<b>0,014</b>	PA-C_T	0,8208	<b>0,00975</b>			

**Tableau 8 :** Valeurs des p-values associé au test de Student. « NT » pour « Non traité à l'ASM » et « T » pour « Traité à l'ASM ». « dpi » pour « day post inoculation ». Le témoin sensible (respectivement résistant) correspond au 'Gala' non traité à l'ASM (respectivement 'Gala' traité à l'ASM). Les valeurs en **marron** ou en **bleu** signifient que la différence entre les deux modalités est significative *i.e.* lorsque  $P < 0,05$ .

Concernant la sévérité, représenté en **figure 49** par le calcul de l'AUDPC sur les 12 jours de l'inoculation, les résultats confirment tout d'abord ceux présentés en **figure 45** : PA-A est atteinte avec une sévérité intermédiaire à celles des deux témoins et PA-C est atteinte aussi sévèrement que le témoin sensible. Mais ces résultats montrent aussi que, même si le traitement à l'ASM ne modifie pas significativement la réponse de chaque lignée à la sévérité de la maladie (non significativité des tests statistiques entre les modalités traités et non traités pour une même lignée), ce traitement modifie suffisamment cette réponse 1) pour rendre PA-A traitée comparable au témoin sensible et différente du témoin résistant, donc plus sensible que PA-A non traitée, et 2) pour rendre PA-C traitée différente du témoin sensible et comparable au témoin résistant, donc plus résistante que PA-C non traitée.



**Figure 49 : Mesure de la sévérité du feu bactérien chez les lignées PA.** Les points bleus correspondent à la valeur de l'AUDPC d'un vitroplant et les losanges noirs à la valeur moyenne de l'AUDPC pour chaque modalité. Pour les tests statistiques, les valeurs en **bleu** sont comparées au 'Gala' traité et les valeurs en **marron** sont comparées au 'Gala' non traité. La valeur couleur **verte** (respectivement **violette**) compare les plantes PA-A (respectivement PA-C) non traitées à l'ASM avec celles qui l'ont été. Significativité des tests de rang de Wilcoxon : \* $P < 0,05$  ; ns non significatif.

### 3. Les lignées PA semblent ralentir la progression de la maladie, sans la stopper

Des lignées intragéniques à partir de la construction PAT sont en cours d'obtention dans l'équipe mais n'auraient pas pu être obtenues dans le cadre de ma thèse. Afin de pouvoir tout de même tester l'intérêt de l'association entre le promoteur inductible *pPPO16* et la séquence codante *MdAGG10*, nous avons donc aussi créé les lignées transgéniques PA, qui dès le stade vitroplant, révèlent déjà des résultats très encourageants du point de vue de la résistance à *Ea*.

Les lignées PA-A à F présentent bien toutes une expression de *MdAGG10* inductible par *Ea*, stable ou croissante entre 24 et 40 heures post infection (**Figure 42**). Cependant, nous ne détectons *MdAGG10* dans aucune des 6 lignées PA (**Figure 43**). Dans leur étude, Chavonet et al (2022) avaient étudié l'expression des *MdAGGs* et l'accumulation de ces protéines dans les différents tissus de la plante après un traitement à l'ASM. Ils avaient remarqué qu'il fallait atteindre un certain niveau d'expression relatif, supérieur en  $\log_2$  à 4,25, pour pouvoir détecter par Western Blot la présence de *MdAGGs*. Ce niveau d'expression relative 40 heures après l'infiltration d'*Ea* est atteint chez les lignées PA-D et PA-F. Cependant, l'expression relative de *MdAGG10* a été mesurée sur des vitroplants alors que l'accumulation de protéines a été effectuée sur des plantes acclimatées en serre. Il est probable que les niveaux d'expression mesurés sur vitroplants soient différents de ceux qui auraient pu être mesurés chez les plantes acclimatées en serre. Nous avons par ailleurs essayé à plusieurs reprises de détecter *MdAGG10* par Western Blot à partir de vitroplants, sans succès. En effet, nous n'arrivions pas à accumuler assez de protéines totales lors de l'extraction pour faire un Western Blot. En conclusion, cette absence de détection de *MdAGG* par Western Blot dans les lignées PA ne signifie pas qu'il n'y a pas de traduction des transcrits en protéines, mais que la quantité requise de *MdAGG10* pour pouvoir dépasser le seuil de détection par Western Blot est trop élevé.

En absence de traitement à l'ASM, que l'on observe l'incidence (**Figure 44**), la sévérité (**Figure 45**), le jour d'apparition du premier symptôme (**Figure 46**) ou encore la durée entre l'apparition du premier symptôme et la mort de la plante (**Figure 47**), les lignées PA-C et PA-E sont toujours similaires au témoin sensible. La similarité apparente entre PA-C et le témoin sensible semble s'expliquer par la faible induction de l'expression de *MdAGG10* par *Ea*. En effet, la lignée PA-C est la lignée la moins induite par *Ea* des 6 lignées étudiées, que ce soit 24 heures ou 40 heures après infection (**Figure 42**). Concernant la lignée PA-E, malgré une induction moyenne supérieure aux lignées PA-B ; PA-D et PA-F 24 heures après infection, et supérieure aux lignées PA-A et PA-B 40 heures après l'infection les observations phénotypiques faites sur cette lignée sont similaires aux observations faites sur le témoin sensible. L'expression de *MdAGG10*, rapide et à une forte intensité au cours du temps, censé protéger cette lignée contre *Ea*, pourrait en fait être la cause du phénotype observé après l'infection de la bactérie. *MdAGG10* pourrait être à l'origine d'une désorganisation de la physiologie de la plante, faisant perdre l'effet positif de l'induction (voir plus bas)

Pour les quatre autres lignées on observe un retard transitoire du développement de la maladie, qui démarre 2 à 2,5 jours plus tard que pour le témoin sensible (**Figure 44**), et dont l'augmentation de l'incidence s'avère moins rapide entre le cinquième et le sixième jour (PA-B et PA-D) ou entre le cinquième et le septième jour (PA-A et PA-F) post inoculation (**Figure 44**). Ce retard conduit même jusqu'à une diminution de la sévérité de la maladie pour la lignée PA-A (**Figure 45**), ainsi qu'à un délai plus long mis par la maladie pour tuer la plante (**Figure 47**). Ces résultats phénotypiques sont par ailleurs cohérents avec les données d'expression. En effet, les lignées PA-A et PA-B sont la première et troisième lignée concernant le niveau d'induction précoce de *MdAGG10*. Les lignées PA-D et PA-F

sont les deux premières lignées concernant le niveau d'induction de *MdAGG10* 40 heures après l'infection par *Ea* (**Figure 42 ; Tableau 6**). Ainsi, pour peu que l'induction de *MdAGG10* soit forte dès 24 heures post infection ou à des niveaux très élevés 40 heures post infection, il apparaît comme possible de retarder transitoirement le développement de la maladie, grâce à la construction PA.

Il est possible que cet aspect transitoire de la résistance observée soit dû au matériel végétal utilisé (les vitroplants), connu pour être intrinsèquement hautement sensible au feu bactérien. En particulier, le milieu de culture des plantes semble propice pour maintenir la bactérie le temps qu'elle arrive à pénétrer les tissus de l'hôte. Nous avons en effet observé plusieurs fois au cours de nos essais de phénotypage l'apparition de symptômes de feu bactérien à la base du vitroplant et une propagation ascendante de la maladie. Nous avons parfois même observé une propagation de la maladie partant des repousses périphériques du cal central et se propageant ensuite sur le vitroplant principal. Ces résultats *in vitro* sont néanmoins très encourageants quant à l'issue des tests phénotypiques en serre qui auront lieu à l'automne 2023. En effet, plusieurs études montrent qu'*ex vitro*, les observations initialement faites *in vitro* en réponse à des stress biotiques ou abiotiques sont globalement respectées et généralement amplifiées (Carretero et al, 2007 stress salin sur manioc, Vijayan et al, 2003 stress salin sur mûre, Rodríguez et al, 2007 *Alternaria solani* sur pomme de terre, García-Almodóvar et al, 2015 *Plum Pox Virus* sur prunier). Ces résultats sont d'autant plus encourageants quand on sait que l'efficacité de protection de l'ASM mesurée sur les vitroplants n'est que de 37% alors qu'elle a atteint 50 et 60% dans les essais sur plantes acclimatées en serre (cf. chapitre 1 ; partie 1.2.3.).

Cependant ce retard uniquement transitoire du développement de la maladie chez les lignées PA semble aussi cohérent avec l'hypothèse faite dans le chapitre 1 (cf. partie 1.4. et 2.3.) et selon laquelle d'autres molécules végétales que les protéines agglutinines sont impliquées pour stopper et détruire la bactérie lors de la résistance déclenchée par un traitement à l'ASM. Pour rappel, lorsque nous avons étudié *in vitro* la croissance d'*Ea* WT ou *Ea ams* incubé avec *MdAGG10*, nous avons observé des agglutinations associées à un arrêt transitoire de la croissance bactérienne mais pas d'effet biocide, la croissance bactérienne repartant entre 20 et 30 heures après l'incubation selon la souche.

Des études ont déjà montré que les lectines pouvaient n'avoir un impact que sur certains traits biologiques des bioagresseurs lors de l'infection d'hôtes, et n'être ainsi responsables que d'une partie de la défense et non de sa totalité. Une étude de Kanrar et al, (2002) a montré que l'expression d'une lectine à domaine hévéine augmentait le temps de latence, c'est-à-dire le temps entre le début de l'infection et la production d'organes reproducteurs (Madden et al, 2007) pour *Alternaria brassicae* chez *Brassica napus*. Une autre étude publiée par Rawat et al, (2016) montre que la surexpression constitutive de *PFT*, une lectine composée de deux domaines agglutinines ainsi qu'un domaine ETX/MTX2, permet de ralentir la progression de *Fusarium graminearum* chez le blé. Comme dans notre cas, la résistance observée lors de la surexpression de *PFT* seule n'est pas complète, et un des arguments avancés dans cette étude pour expliquer ce résultat est l'implication d'autres molécules pour permettre une défense complète. Un récent exemple montre aussi que la surexpression d'une G-lectine chez *Fragaria*

*ananassa*, la *mannose-binding lectin 1*, permet de réduire la progression de *Botrytis cinerea* sans pour autant décaler la date d'apparition du premier symptôme (Ma et al, 2023).

Les lignées PA permettent également d'investiguer la question subsidiaire d'un possible effet additif des résistances obtenues *via* l'induction précoce de *MdAGG10* et d'un traitement à l'ASM. Les résultats montrent que même si le traitement à l'ASM ne modifie pas significativement la réponse de chaque lignée à la sévérité de la maladie, ce traitement modifie suffisamment cette réponse 1) pour rendre PA-A traitée comparable au témoin sensible et différente du témoin résistant, donc plus sensible que PA-A non traitée, et 2) pour rendre PA-C traitée différente du témoin sensible et comparable au témoin résistant, donc plus résistante que PA-C non traitée (**Figure 48**). Or, PA-A est la lignée qui semble la plus précocement fortement induite alors que PA-C est la lignée qui semble la moins induite (**Figure 42**). Le comportement inverse de ces lignées suite au traitement à l'ASM pourrait donc s'expliquer d'une manière équivalente à celui des lignées OE au chapitre 1 (cf. partie 2.3.) ou de la lignée PA-E : la sensibilité de ces lignées au feu bactérien pourrait s'expliquer par une surexpression trop importante de *MdAGG10* qui entraînerait des dysfonctionnements physiologiques l'empêchant de se défendre efficacement lors de l'infection. Une autre hypothèse pour expliquer la sensibilité de ces lignées malgré le traitement à l'ASM serait un silencing post transcriptionnel ou PTGS. Le PTGS est un phénomène épigénétique permettant de contrôler la traduction de l'ARN d'un gène en quantité anormale (Meins, 2000). Le PTGS est un système de défense adaptatif de la plante qui se met en place lors de la détection de double brin d'ARN, structure présente en général lors de la répllication du génome de la plupart des virus (Baulcombe, 1999). Chez des plantes transgéniques, un PTGS du gène *gus* suite à l'association avec un promoteur induisant trop fortement son expression a déjà été décrit dans plusieurs études (Morel et al, (2000) chez *A. thaliana* ; Sohn et al, (2011) chez le tabac).

Ainsi, de manière similaire aux lignées OE ou aux plantes PA-E, les plantes PA-A traitées à l'ASM exprimeraient trop (expression due au traitement trois jours avant plus à l'induction forte et précoce en début d'infection) *MdAGG10* et sa défense en pâtirait ; alors que les plantes PA-C en exprimeraient suffisamment moins (expression due au traitement trois jours avant et à la moindre induction en début d'infection) pour ne pas dépasser le seuil rendant néfaste les effets de cette expression, et profiteraient donc d'un effet additif bénéfique du traitement et de l'induction. Pour vérifier l'hypothèse du PTGS, il faudrait vérifier le niveau d'expression de *MdAGG10* chez la lignée PA-A, suite à un traitement à l'ASM, suivi 3 jours plus tard de l'inoculation par *Ea*, et le comparer au niveau d'expression d'un témoin uniquement traité à l'ASM. On pourrait aussi vérifier la présence de *MdAGG10* dans les tissus par Western Blot. On pourrait penser intuitivement que plus le niveau d'expression d'un gène est important, plus il sera efficace. Les résultats portant sur les lignées PA traitées à l'ASM et les observations faites sur les lignées OE semblent indiquer que cela n'est pas aussi simple. De plus, certaines études ont déjà montré que ce ne sont pas forcément les plantes qui expriment le plus le gène d'intérêt qui confère le plus de résistance. Burrows (1998) a testé le potentiel de protection d'une lectine, la GNA contre *Globodera pallida* chez la pomme de terre. Il a remarqué que ce n'était pas la lignée qui surexprimait le

plus la GNA qui était la plus résistante contre le nématode, mais une lignée avec un niveau d'expression intermédiaire.

Ces résultats *in vitro* sont très instructifs quant au fonctionnement de la défense déclenchée par MdAGG10. Les tests phénotypiques des lignées PA en serre à l'automne 2023 prévoient également une modalité traitement à l'ASM et viendront, nous l'espérons, confirmer ces résultats préliminaires.

Les différents résultats dans ce chapitre, bien qu'ils restent à confirmer en serre, montrent que la construction PA semble conférer au pommier une résistance partielle au feu bactérien. L'induction du promoteur *pPPO16* par *Ea* semble atteindre une intensité suffisante pour ralentir la multiplication d'*Ea* chez 4 lignées PA sur 6 (**Figure 46**). Le(s) mécanisme(s) expliquant ce ralentissement semble(nt) complexe(s), même si la cinétique d'induction de l'expression de *MdAGG10* pourrait être une explication. Une autre perspective de ce chapitre sera de vérifier que ces premiers résultats obtenus sur les lignées PA sont transposables sur les lignées PAT qui seront obtenues dans un futur proche. *TermRubisco* a un effet inducteur documenté lorsqu'il est associé à son promoteur mais également à d'autres promoteurs comme le CaMV35s (Schaart et al, 2011). Cet effet inducteur pourrait aussi être visible lors de l'association au promoteur *pPPO16*. Comme observé chez les pommiers OE, la lignée PA-A traitée à l'ASM ou la lignée PA-E, il faudra donc vérifier chez les lignées recombinées PAT, si une possible induction trop importante en intensité n'entraîne pas des dysfonctionnements dans le métabolisme de la plante. Si cette construction confère au pommier une résistance, même partielle, au feu bactérien, ce serait la première construction intragénique à notre connaissance remplissant cet objectif.



## **DISCUSSION GENERALE**

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mieux caractériser la famille des MdAGGs vis-à-vis de deux bioagresseurs du pommier, *Ea* et *Dp*. L'étude de Warneys et al (2018) présentait pour la première fois l'induction des MdAGGs par l'ASM et faisait l'hypothèse qu'elles étaient impliquées dans la perturbation de certains traits de vie du puceron cendré. On savait également qu'induites par l'ASM dans les tissus foliaires, les MdAGGs du pommier étaient associées à la résistance au feu bactérien (Chavonet et al, 2022). Le phénotypage des lignées de pommiers éditées pour les séquences codantes des *MdAGGs* grâce à l'outil CRISPR/Cas9, nous a permis de valider fonctionnellement l'implication *in planta* des gènes de cette famille dans les réponses de défense du pommier à ces deux bioagresseurs. Vis-à-vis d'*Ea*, cette analyse semble également indiquer que certains membres de la famille sont plus impliqués que d'autres, bien que nous n'ayons pas pu déterminer spécifiquement lesquels, outre MdAGG10 et MdAGG14. Cette dernière partie propose des ouvertures possibles quant à la suite de l'étude de la famille des MdAGGs, et sa possible utilisation dans la création de variétés de pommier plus résistantes. Le focus est majoritairement fait sur l'interaction entre les MdAGGs et *Ea*, mais l'implication de cette famille de protéines dans la résistance à d'autres bioagresseurs est également abordée.

### **1. Quels sont les membres de la famille des MdAGGs spécifiquement impliqués dans la résistance au feu bactérien ?**

La caractérisation *in planta* des MdAGGs *via* les lignées Crispr, outre la preuve de leur implication dans la résistance au feu bactérien, nous a également appris qu'une partie seulement des membres de la famille semble impliquée, notamment MdAGG14 *via* l'analyse de la plante Crispr G. Par ailleurs, la construction PA associant le promoteur *pPPO16* et la séquence codante de *MdAGG10* (cf. chapitre 2) nous informe qu'*in planta* vis-à-vis d'*Ea*, MdAGG10 serait également impliquée, car cette construction permet de ralentir l'apparition des symptômes. Ces différents résultats semblent donc confirmer l'implication possible de plusieurs agglutinines dans le processus de défense. Néanmoins, la construction PA ne permettant pas de stopper complètement la propagation de la maladie, ces résultats indiquent également que 1) les différentes agglutinines impliquées ne le sont pas forcément de manière équivalente, certaines participent peut-être plus que d'autres au processus, et donc que 2) MdAGG10 n'est pas forcément la meilleure candidate à cibler pour la création de variétés résistantes. Outre ces hypothèses déjà évoquées dans le chapitre 1, différentes questions restent ouvertes, que l'on peut traduire en perspectives pour la suite de l'analyse de cette famille de gènes, et à terme de son utilisation en amélioration variétale. D'une part, en quoi les différents membres de la famille, pourtant si proches, pourraient différer, et ainsi plus ou moins participer au processus de défense ? Le niveau d'expression

suite au traitement par l'ASM (et qui confère une résistance à *Ea*), peut bien sûr être un facteur indicatif, qui nous a aidé dans notre choix de MdAGG10 comme cible pour la surexpression constitutive ou transitoire. Mais ce facteur indiquait également MdAGG3, 11, 14, 15 ou encore MdAGG16 comme de bons candidats (cf. Introduction – Tableau 3). Outre le niveau d'expression lors de l'attaque par la bactérie, des aspects structuraux pourraient également entrer en ligne de compte, qui permettraient d'expliquer l'implication plus importante de certaines agglutinines par rapport à d'autres : d'une part une meilleure liaison à leur substrat putatif, les polysaccharides bactériens, et d'autre part une meilleure multimérisation, auto ou allo, avec d'autres agglutinines ou d'autres protéines impliquées, et permettant la création d'un réseau piégeant plus efficacement les bactéries. En effet, malgré l'importante homologie de séquence des membres de la famille, l'analyse fine des rares différences reste à faire, notamment au niveau de leurs sites de liaison au substrat ou de dimérisation. Cette dernière hypothèse d'une différence de structure des sites actifs des MdAGGs comme permettant d'expliquer leurs rôles distinctifs dans la réponse de défense semble d'autant plus prometteuse au regard des récents résultats de thèse d'Axelle Frantz dans l'équipe. Cette thèse porte sur l'identification du (des) ligand(s) protéiques interagissant avec les MdAGGs. Or des ligands potentiels pourraient être des MdDiAGGs, dont certaines possèdent en partie C-terminale un domaine aérolysine, leur conférant des propriétés de toxines "pore-forming", augmentant la perméabilité membranaire des cellules sur la membrane desquelles elles se sont fixées (Parker et al, 1996). Des premiers résultats de phénotypage en condition d'infection par *Ea* montrent qu'au stade "vitroplant", des lignées éditées *via* CRISPR/Cas9 pour les deux gènes de pommier codant des MdDiAGG à domaine aérolysine sont moins résistantes que le témoin résistant. Ces résultats sont d'autant plus encourageants que certaines études ont déjà montré l'implication des domaines aérolysines dans la défense contre des bioagresseurs. Récemment, Singh et al (2023) ont montré qu'une lectine de blé possédant un domaine aérolysine et conférant une résistance contre *Fusarium graminearum*, confère également une résistance contre plusieurs champignons comme *Sclerotinia sclerotinum* ou *Botrytis cinerea*, lorsqu'elle est exprimée chez *A. thaliana*. Le domaine aérolysine est présent chez les eucaryotes mais également chez les bactéries, participant alors à la virulence de ces dernières (Peraro et van der Goot, 2016).

## 2. Quel rôle des MdAGGs dans le développement du pommier ?

Les caractérisations phénotypiques des lignées Crispr et OE ont montré que l'extinction ou la surexpression constitutive de *MdAGGs* avaient un impact sur la physiologie du pommier. Les lignées OE avaient un taux d'enracinement plus faible que le témoin et deux de ces trois lignées avaient un taux de croissance plus faible (Bodelot et al, 2023). Certaines lignées éditées avaient quant à elles, un taux de croissance plus rapide par rapport au témoin non transformé (cf. Chapitre 1, partie 1.2.1). Ces différentes observations semblent indiquer tout d'abord que la surexpression de *MdAGG10* a un impact négatif sur plusieurs aspects développementaux du pommier. Et le fait que l'édition des MdAGGs

semble permettre une croissance plus rapide du pommier vient confirmer un potentiel impact de ces gènes sur le développement. Cependant, ces observations sont faites sur les lignées Crispr C ; i & M, trois lignées ayant un niveau d'édition globale équivalent. Il est donc compliqué, avec ces résultats, de donner plus de précisions sur l'impact des MdAGGs dans ce processus. Jusqu'à présent et à ma connaissance, l'implication des MdAGGs, voire même des lectines de la famille des amaranthines, dans la croissance des plantes n'a pas encore été décrite dans la littérature. Il existe pourtant différents exemples de l'implication de lectines dans ce contrôle de la croissance des plantes. La surexpression constitutive chez le coton de la lectine *ASAL*, appartenant à la famille des GNA, entraîne un taux de croissance supérieur par rapport au témoin (Din et al, 2021). Chez le riz, la surexpression de la lectine *OsJAC1*, appartenant à la famille des jacalines entraîne une diminution de la taille des coléoptiles (Jiang et al, 2007). Ces différents exemples montrent donc que les lectines peuvent avoir des rôles antagonistes dans le développement de la plante. Dans notre cas, les MdAGGs auraient plutôt une action défavorable sur la croissance des plantes. Des études complémentaires telles que l'édition ciblée d'une ou plusieurs MdAGGs, ou leur surexpression constitutive, pourraient être réalisées afin d'essayer de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces observations, et préciser les potentielles répercussions sur les mécanismes de défenses impliquant les MdAGGs. Cependant, la forte proximité de séquence des membres de la famille rend l'édition ciblée compliquée. Dans l'éventualité d'une utilisation des MdAGGs pour la création de variétés résistantes à *Ea*, et au puceron cendré, ces informations complémentaires seraient toutefois pertinentes pour déterminer les seuils d'expression à ne pas dépasser pour ces gènes, afin de ne pas affecter la physiologie de la plante. Les résultats actuels militent déjà en faveur d'une surexpression inductible et transitoire, telle que permise par le promoteur *pPPO16*.

### **3. Les MdAGGs sont-elles de bons candidats pour la création de résistances durables contre le feu bactérien ?**

L'implication des MdAGGs dans la résistance à deux bioagresseurs du pommier, culture possédant l'IFT le plus important en France, fait, en soi, de ces lectines des candidats intéressants à considérer dans le choix de gènes à sélectionner pour la création de variétés résistantes. Des résultats dans l'équipe (Stage de M2 d'Axelle Frantz) semblent également indiquer que les MdAGGs permettent d'inhiber *in vitro* la croissance de *Venturia inaequalis*, le champignon responsable de la tavelure du pommier. Les MdAGGs seraient donc des protéines efficaces contre les trois bioagresseurs principaux du pommier, une coïncidence d'action encore jamais rapportée pour un gène de cette espèce. C'est d'autant plus remarquable au regard de la diversité des bioagresseurs en question : une bactérie, un insecte et un champignon.

Jusqu'à présent, les différentes études annonçant comme objectif la création de variétés résistantes au feu bactérien, ou au puceron cendré, ont porté sur l'utilisation de QTLs de résistances (Emeriewen et al, 2021), dont les gènes sous-jacents s'avèrent majoritairement des gènes de résistance. Or, la course à

l'armement entre le bioagresseur et la plante conduit, souvent rapidement, au contournement de ces gènes, par modification de la structure de la protéine d'avirulence du bioagresseur, qui n'est ainsi plus reconnue. Des contournements de QTLs de résistance à différents bioagresseurs ont ainsi déjà été observés chez le pommier (Vogt et al, 2013 ; Emeriewen et al, 2015). De plus, la création de variétés de pommiers résistantes aux stress biotiques est relativement longue à cause de l'auto-incompatibilité de cette espèce, et de sa longue phase juvénile. Dans leur étude, Chavonet et al (2022) avaient proposé de classer la famille des MdAGGs comme une nouvelle classe de protéines PR, certaines de ces dernières ayant déjà été utilisées pour créer des plantes résistantes à des stress biotiques et abiotiques, notamment chez le riz, le blé, la pomme de terre ou encore le tabac (Ali et al, 2018 ; Kaur et al, 2022). Une revue de Moosa et al, publiée en 2017 récapitule 15 années d'utilisation de PR protéines pour la création de nouvelles variétés résistantes aux champignons phytopathogènes. D'après eux, les PR protéines sont de bons candidats pour l'amélioration de la résistance, permettant une résistance durable contre les champignons à condition d'en associer plusieurs au sein de la même variété, afin de diminuer la pression de sélection côté plante. Dans d'autres études, l'utilisation de PR protéines dans la création de variétés résistantes à différents stress est parfois remise en question. En effet, l'expression des PR protéines dans ces variétés est souvent constitutive, *via* l'utilisation du promoteur CaMV35S, et les lignées correspondantes sont donc interdites d'utilisation dans l'UE car OGM. De plus, cette surexpression, comme nous l'avons déjà vu chez le pommier dans le cas des agglutinines, peut aussi avoir un impact négatif sur le rendement et la croissance des plantes (Kaur et al, 2022).

Dans notre cas, les MdAGGs ont l'air de posséder un avantage, c'est qu'elles semblent interagir notamment avec les LPS et EPS d'*Ea* (Chavonet et al, 2022). Bien que la structure en trois domaines distincts des LPS soit conservée chez les bactéries, il peut y avoir des variations au sein de la structure de l'antigène O, même au sein d'une même espèce bactérienne (Alexander et Rietschel, 2001). Les LPS faisant partie des PAMPs les plus reconnus par le système de défense des plantes, la course aux armements entre la plante et la bactérie peut exercer une forte pression de sélection sur la structure des LPS (Caroff et Novikov, 2019). Cependant, de trop grandes variations dans la structure des LPS et de l'EPS peuvent aussi avoir des impacts sur la virulence des bactéries ou sur leur capacité de résistance aux antibiotiques. En effet, plusieurs études ont déjà montré qu'une modification de la séquences des LPS entraîne une perte de la pathogénicité chez plusieurs bactéries Gram négatives (Dow et al, 1995 ; Toth et al, 1999) dont *R. solanacearum* et *Ea* (Metzger et al, 1994 ; Titarenko et al, 1997). Des souches de la bactérie *Burkholderia pseudomallei* ayant une capacité de synthèse réduite de galactose, de mannose et de fructose pour la composition de leur EPS étaient aussi moins résistantes à certains antibiotiques (Mongkolrob et al, 2015). De plus, Chavonet et al (2022) ont fait l'hypothèse que les interactions entre MdAGG10 et *Ea* se faisaient entre un composant de l'EPS ou des LPS d'*Ea*, chargé négativement, et le site de fixation de MdAGG10 chargé positivement. Les interactions entre *Ea* et les MdAGGs seraient donc de type électrostatiques. La diversité des polysaccharides présents dans la

structure de l'antigène O des LPS ou dans les polysaccharides composant l'EPS font des MdAGGs des bons candidats pour éviter une pression de sélection trop intense et donc entraîner des contournements.

Cependant, si les MdAGGs semblent de bons candidats pour l'amélioration variétale en termes de durabilité, comme explicité ci-dessus, les résultats de mon travail indiquent bien que leur expression doit néanmoins rester sous « contrôle », et qu'une surexpression inductible et transitoire semble la plus apte à permettre l'atteinte des objectifs concomitants de résistance et de non perturbation physiologique. Néanmoins même dans ce contexte d'expression, le risque demeure de trop exprimer les MdAGGs et d'en perdre du coup les bienfaits. En effet, l'analyse du phénotype de la lignée inductible PA-A montre que le retard d'apparition des symptômes de feu bactérien observé chez cette lignée en absence de traitement à l'ASM, est perdu lorsque cette dernière est traitée à l'ASM, trois jours avant l'infection par *Ea*. Une des hypothèses possibles pour expliquer ce résultat serait que MdAGG10 ait subi un silencing post-transcriptionnel (PTGS, Vaucheret et al, 2001), du fait d'une expression trop importante liée au cumul des actions de l'ASM et du promoteur *pPPO16*.

L'utilisation de la construction PA est donc plutôt prometteuse, mais pas dénuée de contraintes d'utilisation, notamment en termes d'association de moyens de lutte. Par ailleurs, la construction PA est une construction intermédiaire, non totalement intragénique, puisque que le terminateur de cette construction reste d'origine virale. Il reste donc encore à observer l'impact potentiel du terminateur TermRubisco de pommier sur l'expression de *MdAGG10* dans les constructions pleinement intragéniques PAT. TermRubisco est en effet un terminateur susceptible de favoriser l'expression des gènes avec lesquels il est associé (Schaart et al, 2011). Néanmoins en cas de surexpression trop importante de *MdAGG10* du fait de TermRubisco, et les conséquences néfastes que l'on connaît (perte de résistance, perturbation physiologique), trouver un autre terminateur adéquat au sein du génome du pommier ne sera pas un réel problème. Nous pouvons d'ores-et-déjà envisager d'utiliser le terminateur natif de MdAGG10.

S'il reste encore des améliorations techniques à apporter comme d'identifier de meilleurs candidats que MdAGG10 pour stopper l'infection et non seulement la retarder, ou encore de vérifier l'effet du terminateur dans la construction intragénique finale ; il n'en demeure pas moins que les plantes PA représentent un premier exemple de réussite d'amélioration partielle de la résistance du pommier au feu bactérien grâce à une stratégie intragénique, cette stratégie ciblant par ailleurs un gène de défense (versus un gène de résistance), qu'on espère ainsi plus durable dans le temps. Dans le cadre de l'ouverture de l'Union Européenne au NBT (proposition du 5 juillet 2023 de déréguler les plantes issues de mutagénèse dirigée par CRISPR/Cas et de cisgénèse et intragénèse), le potentiel impact de ces « prototypes » sur l'amélioration du pommier quitte le domaine de la preuve de concept pour celui du réel.

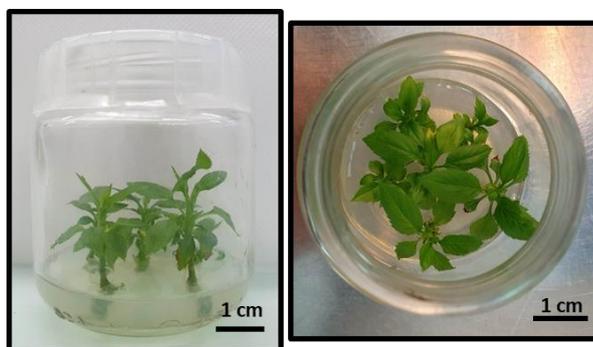


## MATERIEL ET METHODES

### 1. Condition de culture du matériel végétal

#### 1.1. Culture et multiplication *in vitro* du pommier

Les vitroplants de pommier de la variété 'Gala' sont mis en culture par six (**Figure 50**) dans des pots contenant du milieu POM (Murashige et Skoog, 1962) auquel on a ajouté 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de benzyl adénine (BAP) et 0,01 mg.L<sup>-1</sup> d'acide indolybutyrique (AIB). Chaque mois, les vitroplants sont mis sur un nouveau milieu POM. Au préalable, on sépare chaque nouveau départ du cal central et on enlève l'ensemble des feuilles pour ne laisser que les feuilles les plus proches de l'apex. On retire également le cal afin que le vitroplant puisse prélever plus facilement les nutriments et les hormones présents dans le milieu et ainsi mieux se développer et se multiplier.



**Figure 50 : Vitroplants de 'Gala' de 3 semaines.** Ces plantes sont multipliées tous les mois sur un milieu POM frais.

Les études de phénotypage et de mesure d'expression des gènes portant sur des vitroplants utilisent des plants transférés sur un nouveau milieu POM deux semaines avant les expérimentations.

#### 1.2. Induction, expression racinaire du pommier et croissance en serre

Afin de tester les constructions étudiées en serre, une induction / expression des racines est nécessaire chez les vitroplants, avant de les acclimater en serre. Les conditions d'induction et d'expression racinaires sont identiques à celles présentées par Faize et al, (2003). Les vitroplants sont ensuite acclimatés en serre dans des mottes Fertiss (Fertil, Boulogne Billancourt, France), après un raccourcissement de la taille des racines permettant une meilleure insertion dans les mottes. Les plantes dans les mottes sont mises sous une serre en plastique pendant 3 à 4 semaines. Ces dernières sont ouvertes au fur et à mesure pour évacuer l'humidité et la chaleur. Les plantes sont ensuite repotées dans des pots de 1 L avec du terreau. Tout au long de leur présence en serre, les plantes poussent avec une photopériode de 16 heures, sous 22 °C, avec un taux d'humidité de 80% ainsi qu'un ombrage de 500 W.m<sup>-2</sup>. Sauf précision contraire (apport d'engrais), les plantes sont arrosées à l'eau claire.

### 1.3. Culture de semis d'*A. thaliana*

Les graines d'*A. thaliana* sont semées dans du terreau humidifié et placées dans une chambre de culture à 22 °C avec une photopériode de 16 heures ainsi qu'un taux d'humidité de 70%. Les 3 premiers jours de pousse, une serre en plastique est ajoutée au-dessus des pots pour favoriser leur croissance. Lorsque les premières plantules commencent à pousser, un éclaircissage est fait pour qu'il ne reste qu'une plantule par pot et ainsi faciliter les différentes expériences.

## 2. Traitement à l'ASM

Lorsque l'expérience nécessite un traitement à l'ASM, une solution de 0,2 g.L<sup>-1</sup> d'ASM (Bion® 50WG, Syngenta, Basel, Switzerland) est préparée avec de l'eau puis est ensuite pulvérisée sur les plantes 72 heures avant l'inoculation avec la bactérie. La pulvérisation est faite avec un pulvérisateur à main de 750 mL.

Lorsque les expériences sont sur plants de culture *in vitro*, l'eau utilisée pour faire la solution d'ASM doit être stérile, puis la solution est filtrée à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,22 µm (Pall Corporation, Port Washington, NY, United States). Avant inoculation des plants 72 heures après traitement, les plants traités à l'ASM sont placés sur un milieu POM frais pour éviter l'accumulation d'humidité due au traitement, qui favorise le développement de champignons sur le milieu de culture. Le traitement des vitroplants est fait avec un microdiffuseur Ecospray (Seidden, Madrid, Spain).

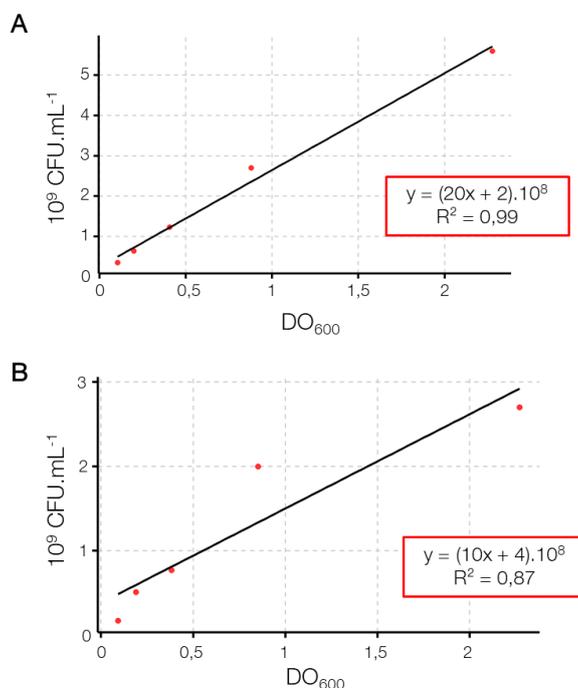
## 3. Souches bactériennes, culture et inoculation

L'ensemble des souches utilisées dans les différentes expérimentations ainsi que leurs conditions de culture (milieu, température, atmosphère) sont récapitulées dans l'**annexe 1**. Sauf mention contraire, les inocula sont préparés dans une solution d'eau osmosée stérilisée à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. La préparation des inocula se fait *via* la mesure de la DO<sub>600</sub> avec un spectrophotomètre µQuant® (Bio-Tek, Colmar, France). Hormis pour les souches d'*Ea*, de *R. solanacearum* et la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens* dont la préparation des inocula est présentée dans les parties suivantes (respectivement dans les parties 3.1 ; 3.2 et 6.1), une DO<sub>600</sub> de 0,1 correspond à un inoculum ayant une concentration de 10<sup>8</sup> colony forming unit (CFU).mL<sup>-1</sup>.

Les expérimentations portant sur les tests d'agglutination *in vitro* de diverses bactéries sont effectuées avec des inocula à une concentration de 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. Hormis pour cette expérimentation, les expérimentations du reste de la thèse portent sur deux espèces bactériennes, *Ea* et *Ralstonia solanacearum* dont la préparation des inocula ainsi que les méthodes d'inoculation sont présentées ci-dessous.

### 3.1. Préparation des inocula d'*Ea* et expérimentations associées

Sauf mention contraire, la souche CFBP1430 d'*Ea* (*Ea* WT), virulente sur la majorité des variétés de pommiers (Paulin et Samson, 1973) est utilisée dans nos expérimentations. La préparation de l'inoculum est effectuée en mesurant la  $DO_{600}$  comme décrit ci-dessus mais en rapportant la valeur à une courbe étalon spécifique de chaque souche d'*Ea* utilisée (**Figure 51**).



**Figure 51 : Courbes étalons pour la préparation des inocula des différentes souches d'*Ea* utilisées.** La courbe **A** correspond à la souche *Ea* WT et la courbe **B** correspond à la souche *Ea\_ams* (Chavonet, 2022).

L'inoculation des plantes pour le phénotypage est effectuée avec une suspension d'*Ea* à une concentration de  $10^7$  CFU.mL $^{-1}$ . Pour les plantes acclimatées en serre, la plus jeune feuille développée est coupée aux deux tiers avec une paire de ciseaux préalablement trempée dans la suspension d'*Ea*. Lorsque le phénotypage porte sur des vitroplants, une feuille en position apicale est sectionnée selon le même procédé.

Dans certains cas, la mesure d'expression de gènes ainsi que l'accumulation de MdAGG10 se fait sur des plantes infiltrées sous vide avec une suspension d'*Ea* à une concentration de  $10^7$  CFU.mL $^{-1}$ . Avant l'infiltration, on complète la suspension d'*Ea* avec 0,002% de Silwet L-77® (v:v) (De Sangosse Ltd, Cambridge, United Kingdom). L'infiltration sous vide est faite avec une pompe CF69PR 60/4 Leroy-Somer (Leroy-Somer, Angoulême, France) pendant 1 minute à une pression de -0,9 Pa, outre le temps nécessaire à atteindre cette valeur. L'inoculation sous vide de vitroplants se fait sur plantes entières alors que pour des plantes acclimatées en serre, seul l'apex et les plus jeunes feuilles développées sont infiltrées.

Pour les études portant sur les inhibitions de croissance bactériennes, les inocula des souches *Ea* WT et *Ea ams* sont préparés à une concentration de  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>.

### 3.2. Préparation des inocula de *Ralstonia solanacearum* et expérimentations associées

Les semis d'*A. thaliana* sont inoculés par immersion des racines pendant 15 minutes dans un inoculum de  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> de la souche CFBP6924 de *R. solanacearum*, virulente sur cet hôte (Salanoubat et al, 2002). Les pots contenant les plantes sont immergés dans la solution d'inoculum pendant 20 minutes puis les pots sont transférés en chambre de culture à 27 °C, avec une humidité relative de 75 % et une photopériode de 12 heures (Morel et al, 2018).

### 4. Elevage et infestation de *Dysaphis plantaginea*

Les pucerons sont élevés pendant 10 jours sur des greffes de pommier 'Golden delicious' (sur porte-greffe 'MM106'), placées en chambre de culture dans des conditions de jour court (8 heures de jour), 22 °C le jour et 18 °C la nuit et 80% d'humidité relative.

La plus jeune feuille totalement développée de chaque plante testée est infestée par dépôt d'un puceron avec l'aide d'un pinceau préalablement humidifié avec de l'eau. Pendant 10 jours, les pommiers infestés sont cultivés en chambre de culture (16 heures de jour, 22 °C et 70% d'humidité relative).

### 5. Obtention des vecteurs de transformation génétique

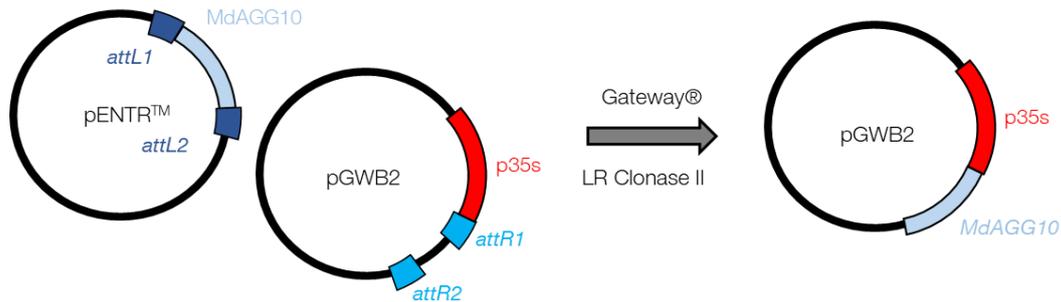
L'ensemble des enzymes de restrictions utilisées sont de la marque New England BioLabs (Ipswich, MA, United States). Les digestions ont toutes été réalisées à 37 °C pendant 3 à 4 heures. Concernant les ligations :

- Dans les étapes de digestion – ligation la T4 DNA Ligase de Promega (Madison, WI, United States) est utilisée selon les recommandations du fournisseur.
- Lors des recombinaisons LR, la LR Clonase™ II de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, United States) est utilisée selon les recommandations du fournisseur.
- Lors des recombinaisons BP, la BP Clonase™ II de Thermo Fisher Scientific est utilisée selon les recommandations du fournisseur.

#### 5.1. Obtention de la construction surexprimeur p35s::MdAGG10

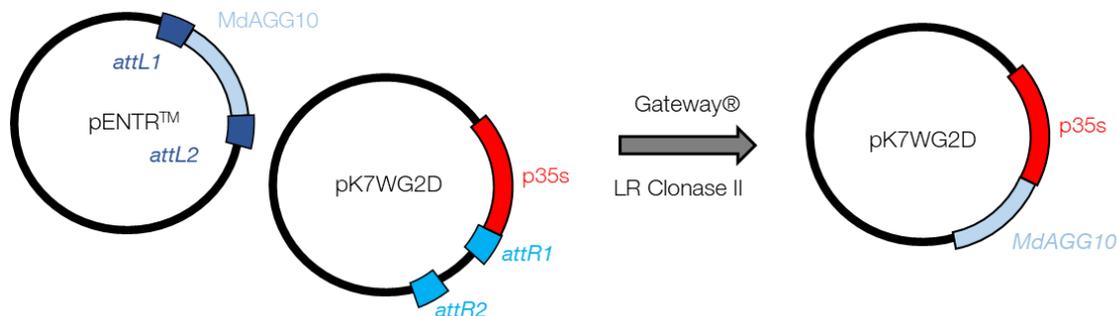
*MdAGG10* a été amplifié par PCR sur ADN génomique (ADNg) de la variété 'Gala', avec le couple d'amorces A (**Annexe 2**) et l'enzyme Q5® High Fidelity 2X MasterMix (New England BioLabs Inc, Ipswich, MA, United States - voir partie 9.2 pour les spécificités de la PCR), pour ensuite être cloné dans le plasmide d'entrée pENTR™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, United States) selon les

recommandations du fournisseur. La séquence de *MdAGG10* a ensuite été transférée derrière un promoteur p35s dans le plasmide de destination pGWB2 (Nakagawa et al, 2007) via un clonage Gateway®, en utilisant l'enzyme LR Clonase™ II (Figure 52).



**Figure 52 : Clonage Gateway® et obtention du plasmide pGWB2 contenant la construction p35s::MdAGG10 utilisé dans la transformation d'*A. thaliana*.**

Le plasmide pGWB2\_p35s::MdAGG10 ne peut pas être utilisée pour transformer le pommier car le gène de sélection porté par le T-DNA du plasmide pGWB2 est un gène de résistance à l'hygromycine, un antibiotique pour lequel il est impossible de faire de la sélection chez le pommier. Pour le pommier, le plasmide de destination fut donc le plasmide pK7WG2D (Karimi et al, 2002 – Figure 53), pour lequel le gène de sélection porté par le T-DNA est un gène de résistance à la kanamycine, antibiotique utilisable pour la sélection chez le pommier.



**Figure 53 : Clonage Gateway® et obtention du plasmide pK7WG2D contenant la construction p35s::MdAGG10 utilisé dans la transformation du pommier.**

## 5.2. Obtention de la construction CRISPR/Cas9 permettant la mutagenèse dirigée des *MdAGGs*

Les deux gRNAs appelés « U3 » et « U6 » et visant l'ensemble des *MdAGGs*, ont été choisis à partir de la séquence codante de *MdAGG10* et avec l'aide du site CRISPOR TEFOR (<http://crispor.tefor.net/>). Le choix s'est porté sur des gRNAs ayant un crRNA pouvant cibler le plus possible de *MdAGGs* autre que *MdAGG10*, avec un nombre de mésappariements (c'est-à-dire de différences de bases entre la séquence du crRNA et les séquences ciblées) strictement inférieur à trois et se situant à plus de trois nucléotides

du PAM. En effet, on considère qu'un nombre de mésappariements strictement supérieur à deux ne permettra pas une coupure du double brin d'ADN (Charrier et al, 2019). Par ailleurs, un mésappariement trop proche du PAM ne permet pas au gRNA de se fixer sur le brin cible. La séquence des deux gRNAs choisis est donnée en **figure 54**.

A

```

ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcGAGCTCGAATTCAAAGTAGAAGTGAATGTT
TAAATAAAAAGGTTGCTAGTATTCTCTTAACATTAATTAAGCATACGTCCAAGTTGTTTATC
TTTTAACCCTAAACGCTATCCCAATTAACCTCACACAGGTTTTCTGTATAAAATTTAGAGA
TAGTAGTTTCGGCTCCCAAACTATTGAAAACCTAAAGGAACAAAAACGAAGAGAGAGAGAG
GAGCGAGAGCGCTCTTAGCTGTAAACGAAACATCTCATTCTTGTCCACATCGACCGTT
TCCAGATTACTAAAGCTGCTTATATGCCTAAACAATGACCAACTGTTcAAGGGCTTGGTAG
TACAGGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
AAGTGGCACCAGTTCGGTGTCTTTTTTGGCTCGTgacccagctttcctgtacaaaagtggg
cccc
    
```

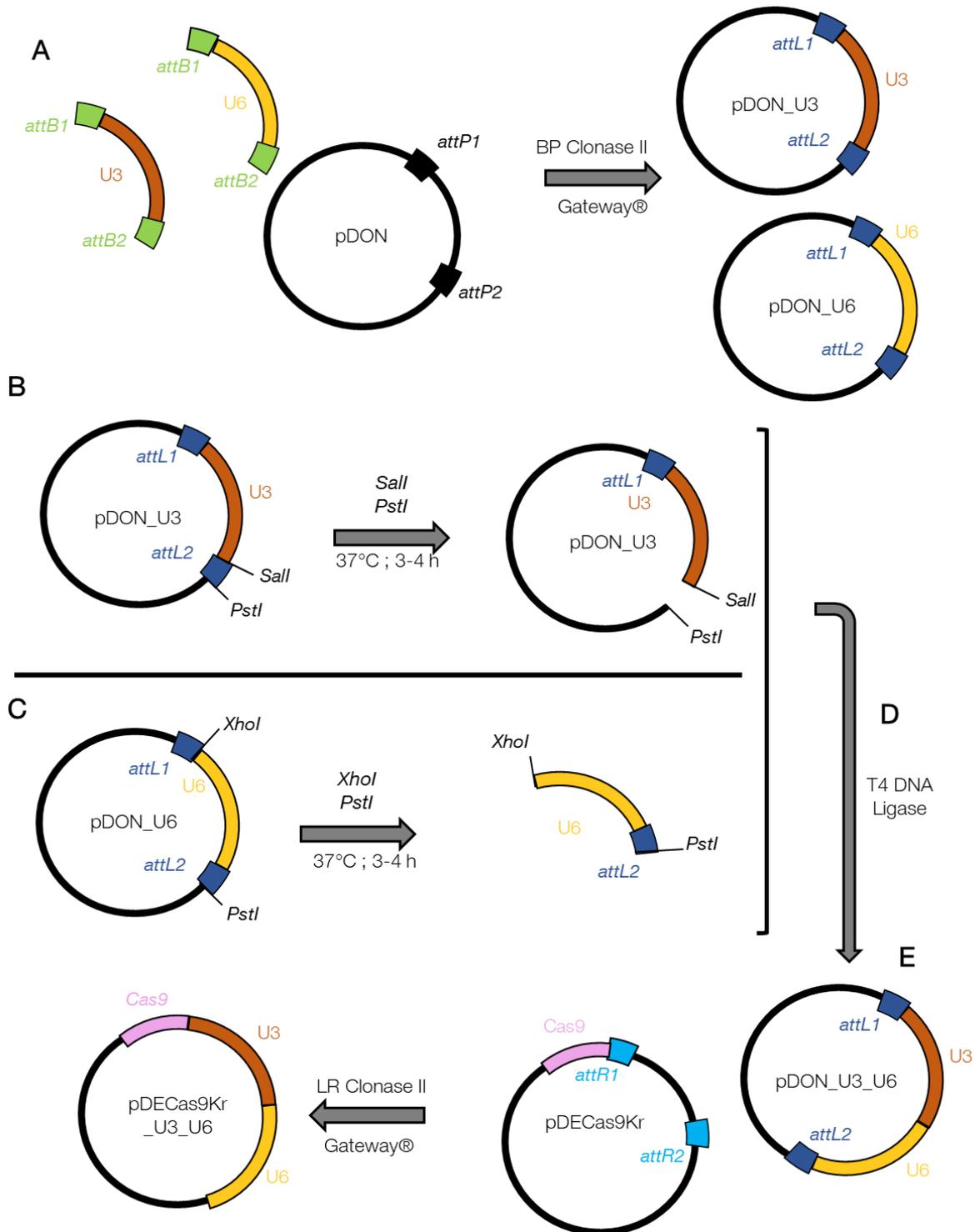
B

```

ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcGAGCTCCTCGAGTTTGGATTACCATTCTTA
AAATTTGAAAGCTGTGAATTTGTGTCAACCTATACTTGTACAACATATGACATGCCATATTGT
TTCTGTAAGTGGAGTTGTCAACCTGCCGCTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCAAGGCTCTTAA
CCTTGTGGTTCGTGGGTTTCGAGCCCCACGGTGGGCGCTGCTTTTTATTTTAACTTTTTTAA
TCGACAAATACGCTGCGTTTTACAAAAGTGGTGGAGGAGGTGTCCACATCGAGCAACGCG
AGTGGTATTAATGCTTTATATCAATTAGACTGCAAAAAGTGTgTGGACCAAAACAGGC
TATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
TGGCACCAGTTCGGTGTCTTTTTTGGCTCGTgacccagctttcctgtacaaaagtggg
cccc
    
```

**Figure 54 : Séquence des 2 guides (gRNA) synthétisés pour cibler la séquence codante des MdAGGs.** (A) est la séquence du gRNA associé au promoteur U3 et (B) est la séquence du gRNA associé au promoteur U6. En **jaune**, on a les bornes *att* 1 et 2 utilisées pour le clonage Gateway®. En **bleu** la séquence du promoteur U3 (A) ou U6 (B), en **rose** la séquence des *crRNA* (*i.e* la séquence de nucléotides interagissant avec la séquence d'ADN ciblée), en **gras**, la séquence du *tracrRNA* (complexe permettant de donner sa conformation au *crRNA*), la portion soulignée correspond au site de restriction *Sall*, en **rouge** à celui de *SacI*.

Chaque gRNA a été inséré dans un plasmide d'entrée pDONR207<sup>TM</sup> (pDON – Invitrogen, Waltham, MA, United States) via un clonage Gateway® en utilisant la BP Clonase<sup>TM</sup> II (**Figure 55-A**). L'insertion a été vérifiée par PCR en utilisant la GoTaq® G2 (Promega, Madison, WI, United States - Voir partie 9.2 pour les spécificités de la PCR) et le couple d'amorce B (**Annexe 2**). L'étape suivante a consisté à insérer le gRNA « U6 » dans le plasmide pDON\_U3 par une étape de digestion ligation. Le plasmide pDON\_U3 est ouvert en utilisant les enzymes *Sall* et *PstI* (**Figure 55-B**) et le gRNA « U6 » est extrait du plasmide pDON\_U6 avec les enzymes de restriction *XhoI* et *PstI* (**Figure 55-C**). Le bout coupé au niveau du site de restriction de *Sall* sur le plasmide pDON\_U3 est complémentaire à celui au niveau du site de restriction *XhoI* du gRNA « U6 ». Pour les deux digestions, nous avons utilisé les quantités suivantes :



**Figure 55 : Différentes étapes de la construction du plasmide pDECas9KR contenant les guides U3 et U6 ciblant les séquences codantes des *MdAGGs*.** (A) représente le clonage Gateway® BP entre le guide U3 ou U6 contenant les bornes BL et BR et le plasmide de destination pDON. (B) et (C) sont les digestions pour respectivement ouvrir le plasmide pDON après le guide U3 et éliminer la borne *attL2* avec les enzymes de restriction *Sall* et *PstI* et l'extraction de guide U6 avec la borne *attL2* du plasmide pDON avec les enzymes de restriction *XhoI* et *PstI*. (D) représente la ligation entre les deux éléments digérés décrits dans (B) et (C). Enfin l'étape (E) est un clonage Gateway® LR entre le plasmide de destination pDECas9Kr et le plasmide d'entrée pDON portant les guides U3 et U6.

	pDON_U6	pDON_U3
Plasmide	1500 ng	1500 ng
Tampon	5 µL	5 µL
<i>XhoI</i>	1 µL	1 µL
<i>PstI</i>	1 µL	1 µL
Eau	35 µL	31 µL

**Tableau 9 : Quantités utilisées pour la digestion des plasmides pDON\_U6 et pDON\_U3**

Suite à la digestion, le plasmide pDON\_U3 ouvert et la séquence digérée d'U6 sont prélevés sur le gel de migration et purifiés avec le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, United States) selon les recommandations du fournisseur. Après ligation pour former le plasmide pDON\_U3\_U6 (**Figure 55-D**), le couple de gRNAs U3\_U6 a ensuite été cloné dans le plasmide de destination pDECas9Kr (Charrier et al, 2019) via un clonage Gateway® en utilisant l'enzyme LR Clonase™ II (**Figure 55-E**). L'insertion du couple de gRNAs a été vérifiée par PCR en utilisant l'enzyme GoTaq® G2 et le couple d'amorces C (**Annexe 2**), puis par séquençage.

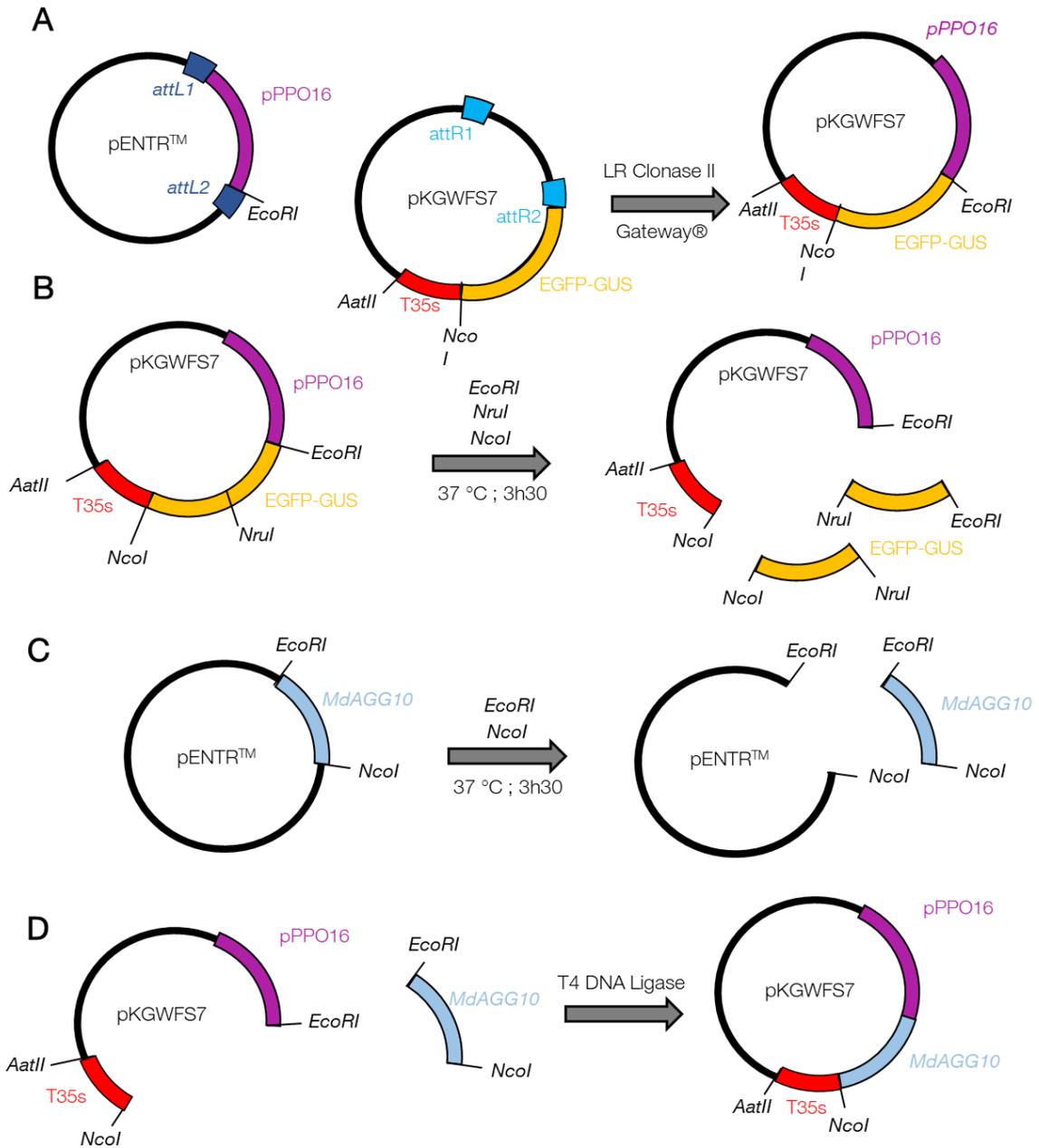
### 5.3. Obtention de la construction intragénique inductible par *Ea* pPPO16::MdAGG10::TermRubisco

#### 5.3.1. Construction de la cassette inductible par *Ea* pPPO16::MdAGG10

Une séquence de 2 kb en amont du CDS du gène *PPO16* (MD10G1299400 ; *pPPO16*) contenant le promoteur proximal, a été amplifiée par PCR en utilisant l'enzyme Q5® High Fidelity 2X MasterMix selon les recommandations du fournisseur et le couple d'amorces D (**Annexe 2**), permettant l'ajout d'un site de restriction *EcoRI* en 3'. L'amplicon a ensuite été cloné dans un plasmide pENTR™ selon les recommandations du fournisseur. La cassette pPPO16\_ *EcoRI* a ensuite été clonée *via* un clonage Gateway® dans le plasmide de destination pKGWFS7 (**Figure 56-A** - Karimi et al, 2002), en utilisant l'enzyme de clonage LR Clonase™ II.

Le CDS de *MdAGG10* (MD10G1027210, 498 pb) a lui aussi été amplifié par PCR, avec le couple d'amorces E (**Annexe 2**) et l'enzyme Q5® High Fidelity 2X MasterMix selon les recommandations du fournisseur. Le couple d'amorces E permet d'ajouter le site de restriction *EcoRI* en 5' de la séquence et le site de restriction *NcoI* en 3'. L'amplicon est ensuite cloné dans un plasmide pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, United States) selon les recommandations du fournisseur.

Le morceau *EcoRI*\_MdAGG10\_ *NcoI* a ensuite été cloné dans le plasmide pKGWFS7\_pPPO16, à la suite de ce dernier, par digestion-ligation. Une première digestion a consisté à retirer la portion *EGFP-GUS* se trouvant dans le plasmide pKGWFS7\_pPPO16 à la suite du promoteur (**Figure 56-B**). Pour cela, nous avons utilisé trois enzymes de restriction (*NcoI*, *NruI* et *EcoRI*), afin de couper la portion *EGFP-GUS* en deux morceaux et éviter ainsi qu'elle ne se réinsère. La seconde digestion a consisté à



**Figure 56 : Différentes étapes de la construction de la cassette pPPO16::MdAGG10 dans le plasmide pKGWFS7.** (A) représente le clonage Gateway® LR entre les plasmides de destination pKGWFS7 et d'entrée pENTR™ portant pPPO16\_EcoRI. (B) représente l'ouverture du plasmide et l'élimination en deux parties du gène EGFP-GUS avec les enzymes EcoRI, NruI et NcoI. (C) représente la digestion du plasmide pENTR™ avec les enzymes EcoRI et NcoI afin d'extraire EcoRI\_MdAGG10\_NcoI et (D) l'inclure par ligation dans le plasmide ouvert de (B). C'est cette construction qui sera utilisée pour les différents tests du chapitre 2.

libérer la portion *EcoRI*\_MdAGG10\_*NcoI* du plasmide pENTR\_MdAGG10 en coupant aux sites *EcoRI* et *NcoI* (**Figure 56-C**). La ligation entre pKGWFS7\_pPPO16 et MdAGG10 à ces mêmes sites a permis d'obtenir le plasmide pKGWFS7\_pPPO16::MdAGG10. Pour les deux digestions, nous avons utilisé les quantités suivantes :

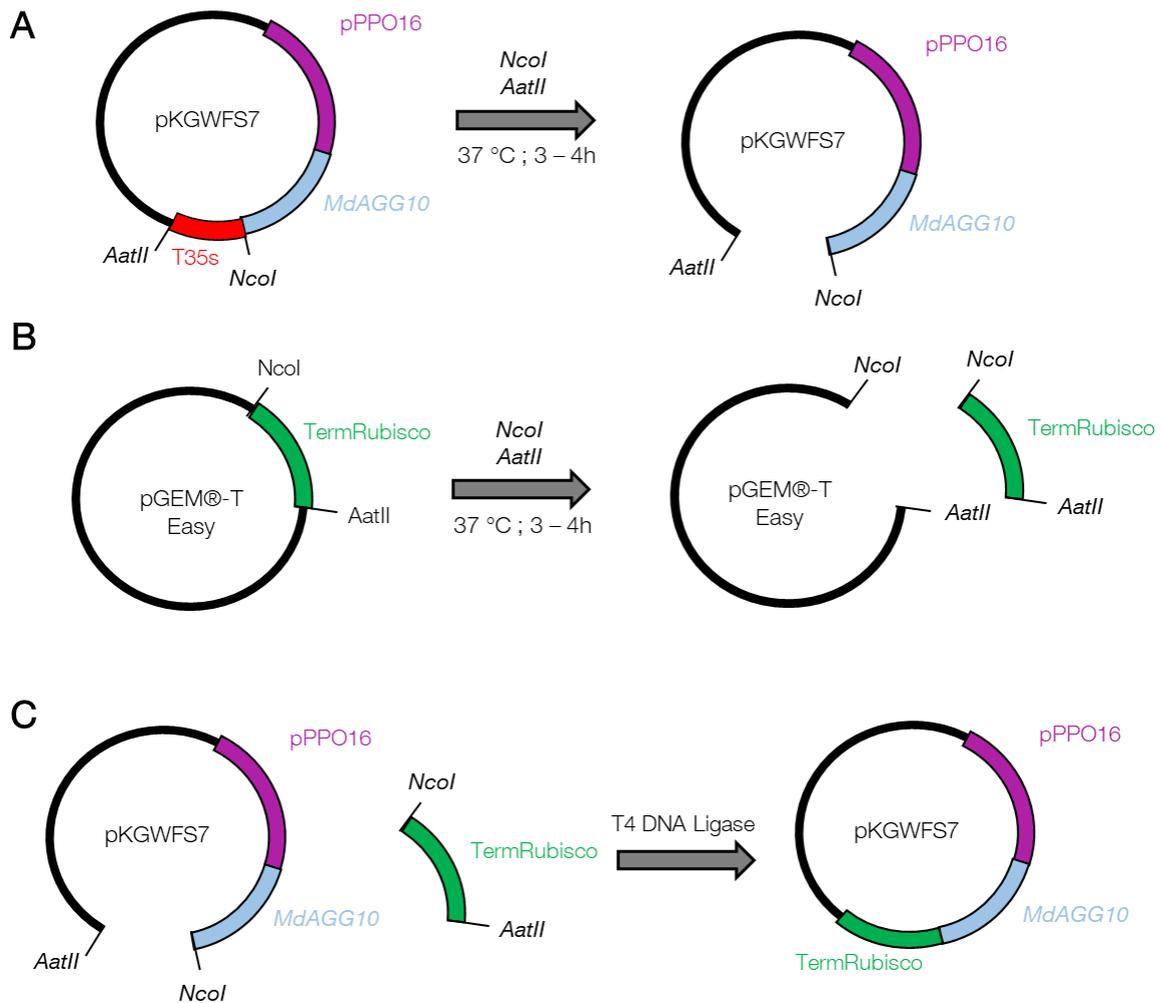
	pKGWFS7- pPPO16	pENTR <sup>TM</sup> - MdAGG10
Plasmide	3600 ng	3600 ng
Tampon	5 µL	5 µL
<i>EcoRI</i>	0,5 µL	0,5 µL
<i>NcoI</i>	0,5 µL	0,5 µL
<i>NruI</i>	0,5 µL	0
Eau	4 µL	4 µL

**Tableau 10 : Quantités utilisées pour la digestion des plasmides pKGWFS7\_pPPO16 et pENTR\_MdAGG10**

Les produits de digestion ont ensuite été directement (pas de passage sur gel) purifiés avec le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System selon les recommandations du fournisseur. Le produit de digestion purifié pKGWFS7\_pPPO16 a ensuite été déphosphorylé avec de la TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Promega, Madison, WI, United States) selon les recommandations du fournisseur, afin d'éviter une éventuelle réinsertion de portion *EGFP-GUS* résiduelles (non scindées par *NruI* et toujours présentes après purification directe, car de grande taille). Après ligation pour former le plasmide pKGWFS7\_pPPO16::MdAGG10 (**Figure 56-D**), une vérification de la présence de la portion pPPO16::MdAGG10 a été réalisée par PCR en utilisant le couple d'amorces F avec la GoTaq® G2 (**Annexe 2**), et par séquençage.

### 5.3.2. Construction de la cassette intragénique pPPO16::MdAGG10::TermRubisco (PAT)

Le terminateur de la Rubisco (TermRubisco) a été amplifié par PCR sur ADN génomique de la variété 'Gala', en utilisant la GoTaq® G2 selon les recommandations du fournisseur et en utilisant le couple d'amorces G (**Annexe 2**). Le couple d'amorces G permet d'ajouter le site de restriction *NcoI* en 5' de la séquence et le site de restriction *AatII* en 3'. L'amplicon est ensuite cloné dans un plasmide pGEM®-T Easy selon les recommandations du fournisseur. La portion TermRubisco a ensuite été insérée à la place du T35s dans le plasmide pKGWFS7\_pPPO16::MdAGG10 par digestion ligation (**Figure 57-A**). Le T35s est éliminé par digestion avec les enzymes *NcoI* et *AatII*, également utilisées pour extraire la séquence TermRubisco de pGEM®-T Easy\_TermRubisco (**Figure 57-B**). Pour la digestion, nous avons utilisé les quantités suivantes :



**Figure 57 : Différentes étapes de la construction de la cassette PAT (pPPO16::MdAGG10::TermRubisco).** (A) représente la digestion du plasmide contenant la cassette pPPO16::MdAGG10 avec les enzymes *NcoI* et *AatII* afin d'éliminer le terminateur T35s. (B) est la digestion du plasmide pGEM@-T Easy avec les enzymes *NcoI* et *AatII* afin d'extraire *NcoI*-*TermRubisco*-*AatII* et de l'inclure par ligation (C) dans le plasmide ouvert (A).

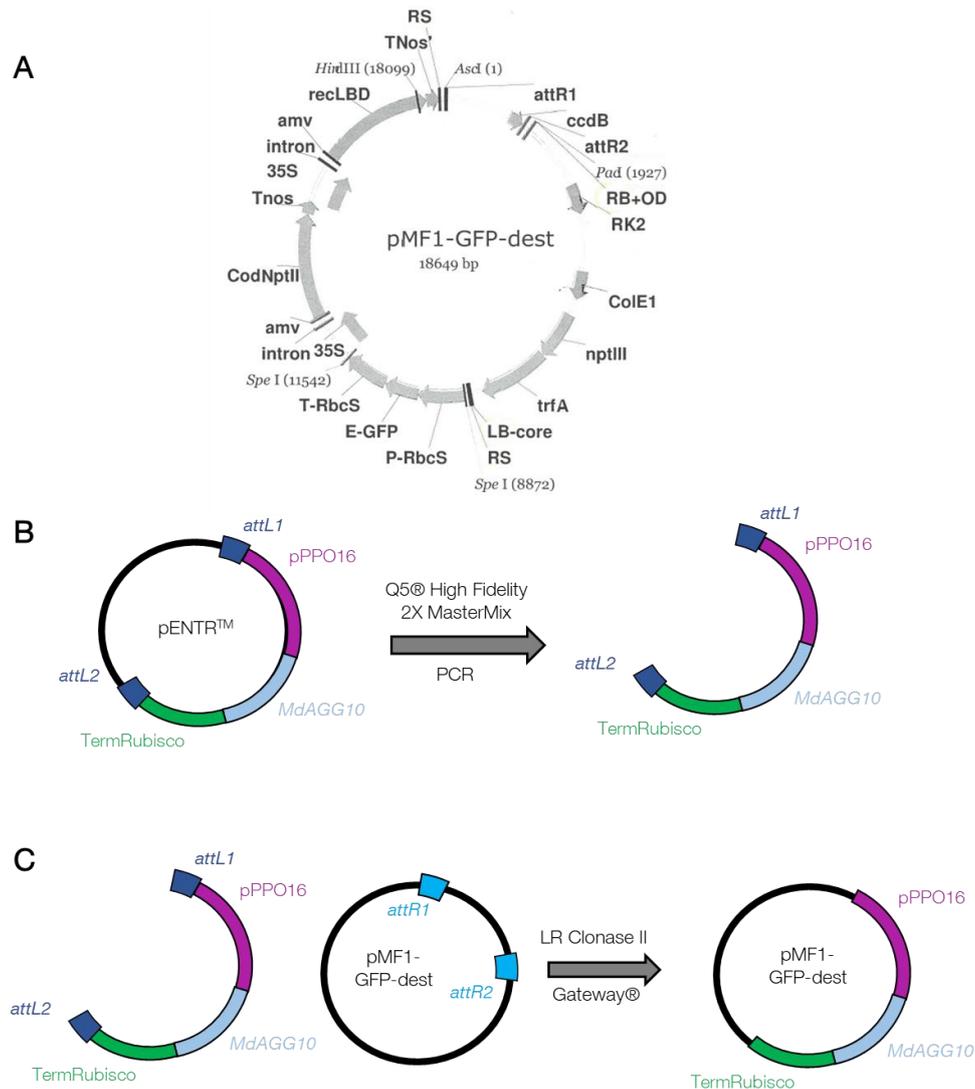
	pKGWFS7_pPPO16::MdAGG10	pGEM®-T Easy_TermRubisco
Plasmide	1000 ng	1000 ng
Tampon	5 µL	5 µL
<i>NcoI</i>	0,5 µL	0,5 µL
<i>AatII</i>	0,5 µL	0,5 µL
Eau	10 µL	11 µL

**Tableau 11 : Quantités utilisées pour la digestion des plasmides pKGWFS7\_pPPO16::MdAGG10 et pGEM®-T Easy\_TermRubisco**

Les produits de digestion ont ensuite été purifiés sur gel avec le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System selon les recommandations du fournisseur. Le produit de digestion purifié pKGWFS7\_pPPO16::MdAGG10 a ensuite été déphosphorylé avec de la TSAP selon les recommandations du fournisseur. Après ligation pour former le plasmide pKGWFS7\_pPPO16::MdAGG10::TermRubisco (pKGWFS7\_PAT, **Figure 57-C**), une vérification de la présence de la portion TermRubisco a été réalisée par PCR en utilisant le couple d'amorces T avec la GoTaq® G2 (**Annexe 2**), et par séquençage. La cassette PAT a ensuite été amplifiée par PCR en utilisant l'enzyme Q5® High Fidelity 2X MasterMix et le couple d'amorce H (**Annexe 2**), purifiée avec le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System puis cloné dans le plasmide pENTR™, le tout selon les recommandations du constructeur. L'insertion de la cassette a été vérifiée par PCR en utilisant l'enzyme GoTaq® G2 et le couple d'amorces J (**Annexe 2**).

Initialement, nous voulions réaliser un clonage Gateway® entre le plasmide d'entrée pENTR\_PAT et le plasmide de destination pMF1-GFP-dest. Ce dernier dérive du plasmide pMF1 (Schaart et al, 2010), auquel a été ajouté par les mêmes auteurs, une cassette *EGFP* au niveau du site *SpeI*, et une zone de recombinaison Gateway® entre les sites *AscI* et *PadI* du site de clonage multiple (**Figure 58-A**). Cependant, les plasmides pENTR™ et pMF1-GFP-dest ayant tous deux une résistance à la kanamycine pour la sélection bactérienne, le transfert de l'un à l'autre de la cassette PAT par recombinaison Gateway® s'est avéré impossible.

Nous avons donc amplifié la cassette PAT par PCR avec l'enzyme Q5® High Fidelity 2X MasterMix et le couple d'amorces K (**Annexe 2**), situé de part et d'autre des bornes *attL* du pENTR™ (**Figure 58-B**). Cet amplicon a été purifié avec le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System puis intégré dans pMF1-GFP-dest par recombinaison Gateway® avec la LR Clonase™ II (**Figure 58-C**). Nous avons ensuite vérifié l'insertion de la cassette PAT dans le plasmide pMF1-GFP-dest par PCR en utilisant le couple d'amorce V et la GoTaq® G2 (**Annexe 2**).



**Figure 58 : Inclusion de la cassette PAT dans le plasmide pMF1-GFP-dest.** (A) Représentation de pMF1-GFP-dest contenant la recombinase. (B) Amplification de PAT ainsi que des bornes attL du plasmide pENTR™ pour permettre la recombinaison dans le plasmide pMF1-GFP-dest. (C) Clonage Gateway® entre le plasmide pMF1-GFP-dest et l'amplikon de PAT délimité par les bornes attL du plasmide pENTR™.

#### 5.4. Transformation des bactéries compétentes et stockage

Lors de chaque clonage pour l'obtention des différentes cassettes détaillées ci-dessus, il y a une étape de transformation bactérienne d'une souche thermocompétente d'*E. coli*, le protocole correspondant est détaillé dans l'**annexe 3**.

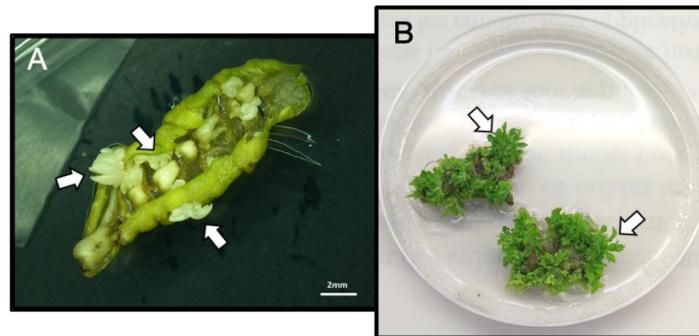
Une fois les plasmides finaux obtenus dans *E. coli*, ils sont transférés dans la souche EHA105 d'*A. tumefaciens* contenant le plasmide ternaire pbbR-MCS5, utilisée pour transformer le pommier. L'étape de transformation d'*A. tumefaciens* par électroporation est également détaillée dans l'**annexe 3**.

Les souches d'*E. coli* et d'*A. tumefaciens* contenant les plasmides intermédiaires et finaux sont conservées à -80°C dans une solution glycérolée à 80%. Le protocole correspondant est également présenté dans l'**annexe 3**.

## 6. Obtention des lignées transgéniques

### 6.1. Obtention des lignées transgéniques de pommiers

Des feuilles de vitroplants de la variété ‘Gala’ sont prélevées puis mis sur un milieu de régénération F5 (4,4 g.L<sup>-1</sup> de milieu Murashige et Skoog – Duchefa Biochemie, BH Harlem, Netherlands -, 30 g.L<sup>-1</sup> de saccharose - Duchefa Biochemie, BH Harlem, Netherlands -, 5 mg.L<sup>-1</sup> de thidiazuron (TDZ), 0,2 mg.L<sup>-1</sup> d’acide acétique de naphthalène (ANA), solidifié avec 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel TM - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, United States -, ajusté au pH 5,75) avec la face supérieure (adaxiale) contre le milieu. Les feuilles sont laissées au repos à l’obscurité en chambre de culture à 22 °C pendant 24 heures. Le lendemain, les feuilles sont infiltrées avec une suspension d’*A. tumefaciens* contenant le plasmide d’intérêt à 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> et 0,002% de Silwet L-77® (De Sangosse Ltd, Cambridge, United Kingdom), pendant 1 minute, sous vide à -0,9 Pa, à l’aide d’une pompe CF69PR 60/4 Leroy-Somer (Leroy-Somer, Angoulême, France). La concentration de l’inoculum est ajustée en utilisant le spectrophotomètre Biophotometer Model 6131 (Eppendorf, Hamburg, Germany) et est préparée dans une solution contenant 1,95 g.L<sup>-1</sup> de MES (Duchefa Biochemie, BH Harlem, Netherlands), 2,03 g.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> (Duchefa Biochemie, BH Harlem, Netherlands), 20 g.L<sup>-1</sup> de saccharose ajusté à pH 5,6 puis complémenté extemporanément avec 4,66 mL d’une solution de 6,42 g.L<sup>-1</sup> d’acétosyringone (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI, United States). Cette suspension est incubée à température ambiante sous agitation pendant 3 heures avant d’être utilisée. Après l’infiltration, les feuilles sont incisées à plusieurs reprises avec un scalpel, transversalement par rapport à la nervure centrale, puis placées sur un milieu F5, complémenté avec 100 mM d’acétosyringone, avec la face adaxiale contre le milieu. Elles sont ensuite placées à l’obscurité à 22 °C dans une chambre de culture. Au bout de 48 heures, la dernière étape du protocole consiste à transférer ces feuilles, avec la face adaxiale contre le milieu, sur un milieu F5 frais complémenté avec 300 mg.L<sup>-1</sup> de cefotaxime, 150 mg.L<sup>-1</sup> de timentin et 100 mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine. On utilise un témoin positif de transformation : une souche d’*A. tumefaciens* contenant la construction pCambia2301 (gène GUS rapporteur sous le contrôle du promoteur CaMV35s ; Hajdukiewicz et al, 1994) ainsi qu’un témoin positif de régénération où des feuilles non infiltrées mais incisées sont placées sur un milieu de régénération F5 sans antibiotiques. Chaque mois pendant 6 mois, on vérifie la présence de bourgeons sur les feuilles incisées avec une loupe binoculaire Olympus SZ61 (Olympus, Tokyo, Japan). Lorsqu’on obtient un bourgeon (**Figure 59-A**), la feuille correspondante est transférée sur un milieu POM supplémenté avec 300 mg.L<sup>-1</sup> de cefotaxime et 150 mg.L<sup>-1</sup> de timentin et 100 mg.L<sup>-1</sup>, puis placé à 22 °C en chambre de culture sous un éclairage indirect correspondant à une photopériode de 16 heures. Une fois que le bourgeon a verdi, il est isolé de la feuille et placé sur un milieu POM complémenté avec 300 mg.L<sup>-1</sup> de cefotaxime, 150 mg.L<sup>-1</sup> de timentin et 100 mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine mais dépourvu des hormones BAP et AIB, jusqu’à ce qu’il puisse être multiplié (**Figure 59-B**). Le clone est ensuite transféré en pots comme présenté sur la figure MM1 sur un milieu POM complémenté avec 300 mg.L<sup>-1</sup> de cefotaxime, 150 mg.L<sup>-1</sup> de timentin et 100 mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine.

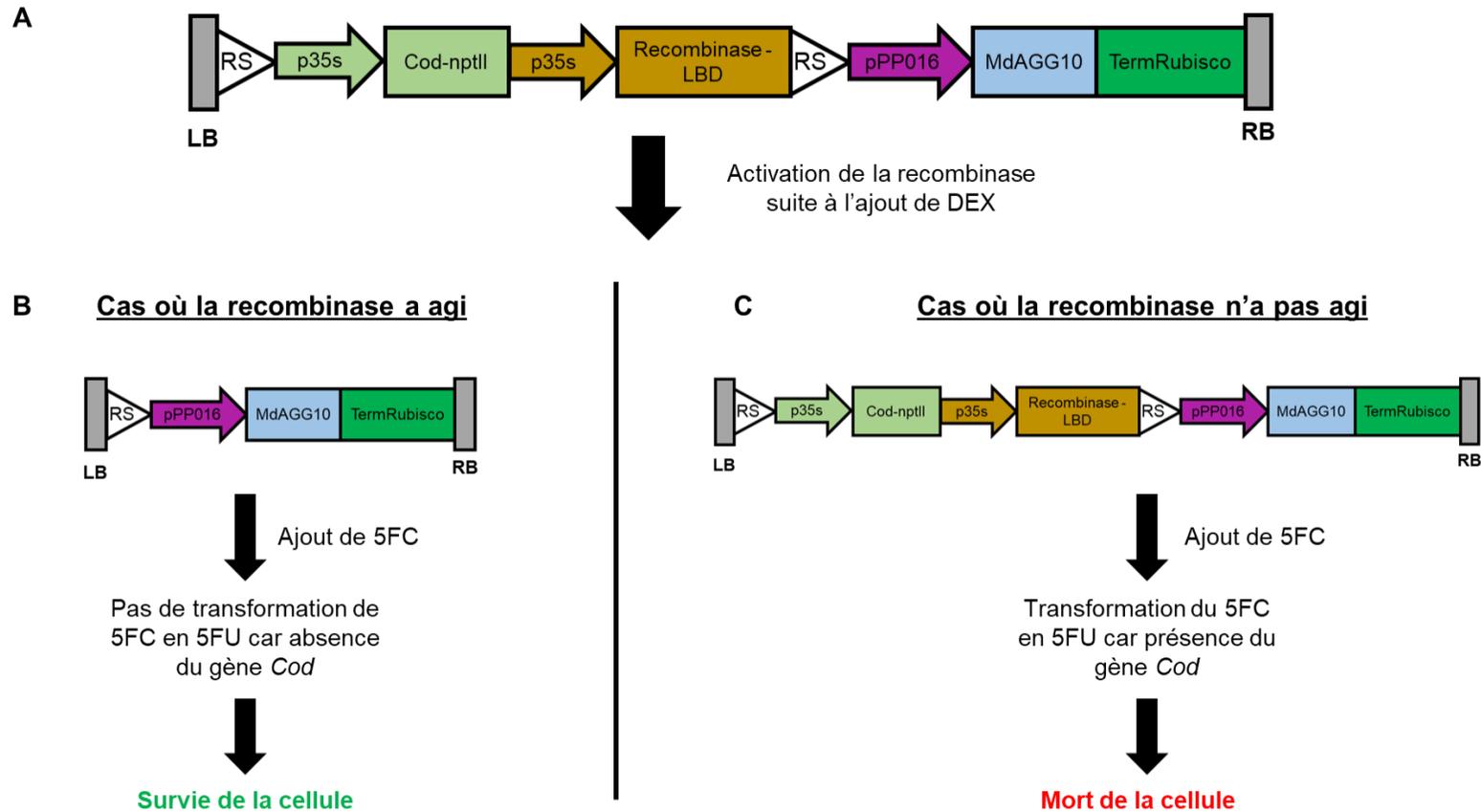


**Figure 59 :** Photographie de bourgeons de pommier régénérant sur une feuille agroinfiltrée et placée sur un milieu F5 (A) et des bourgeons commençant à se différencier après transfert sur un milieu POM CTK (B). Les flèches blanches pointent les bourgeons.

Les feuilles dépourvues de bourgeons sont transférées sur milieu de régénération F5 frais complété avec  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de cefotaxime,  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  de timentin et  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de kanamycine, jusqu'à la nouvelle lecture du mois suivant.

## 6.2. Etape de recombinaison

Pour l'induction de la recombinaison et l'obtention de lignées PAT sans aucuns marqueurs de sélection, et ainsi intragéniques, nous avons suivi le protocole publié par Righetti et al (2014). L'obtention de lignées sans marqueurs de sélection se déroule en deux étapes : 1) une première étape de production de lignées transgénique avec un protocole de transformation "classique" (décrit dans la partie ci-dessus), avec une sélection positive des cellules ayant intégré le T-DNA du plasmide contenant la recombinaison; 2) la seconde étape consiste à éliminer les marqueurs de sélections des lignées transgéniques obtenues grâce à l'activation de la recombinaison et la sélection négative des cellules non recombinées. Dans notre cas, des feuilles de lignées PAT sont prélevées et trempées une nuit dans du dexaméthasone (DEX - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, United States) à  $25 \mu\text{M}$ . Le DEX va s'associer avec le Ligand Binding Domain (LBD) de la recombinaison et ainsi l'activer, elle va alors couper l'ADN au niveau des sites RS (**Figure 60-A**). Les feuilles sont ensuite placées sur un milieu F5 contenant du 5-fluorocytosine. Le gène de sélection du plasmide pMF1-GFP-dest, situé entre les bornes RS est la fusion de deux gènes : le gène de résistance à la kanamycine *nptII* et le gène *CodA*, qui transforme le 5FC en 5FU (5-fluorouracile), toxique pour les cellules. L'ajout du 5FC n'aura pas d'impact sur les cellules chez lesquelles la recombinaison a éliminé la portion contenant le gène *CodA*. Elles pourront continuer à se multiplier pour à terme donner des plantes sans marqueurs de sélections (**Figure 60-B**). Les cellules chez lesquelles le gène *CodA* est présent, donc non recombinées, seront elles empoisonnées par le 5FC et mourront (**Figure 60-C**).



**Figure 60 : Activation de la recombinase avec du DEX pour obtenir des lignées de pommiers comportant la construction PAT sans marqueurs de sélection. (A)** Schéma simplifié des séquences importantes pour comprendre le fonctionnement de la recombinase dans le plasmide pMF1-GFP-dest. **(B) & (C)** Sélection négative par le 5FC des cellules chez lesquelles la recombinase n'a pas agi.

LB (respectivement RB) correspond à la limite gauche (respectivement droite) du T-DNA du plasmide pMF1-GFP-dest ; RS correspond au site de reconnaissance de la recombinase ; p35s : CaMV35S ; *Cod-nptII* : Gène fusionné pour la sélection positive (*nptII*) et négative (*Cod*) des cellules ; pPP016::MdAGG10::TermRubisco : Construction PAT.

### 6.3. Transformation d'*A. thaliana*

Les plantes d'*A. thaliana* sont transformées par immersion des boutons floraux, comme décrit par Zhang et al, (2006). Les fleurs sont trempées dans une suspension à une concentration de  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> d'*A. tumefaciens* contenant la construction d'intérêt, réalisée dans une solution de saccharose à 5% ainsi que du Silwet L-77® (De Sangosse Ltd, Cambridge, United Kingdom) à 0,002%. On agite l'erenmeyer contenant la suspension d'*A. tumefaciens* et les fleurs d'*A. thaliana* immergées pendant quelques secondes afin de mettre en contact les bactéries et les fleurs. Après stérilisation, les graines issues des fleurs mises en contact avec la souche sont sélectionnées sur un milieu MS (4,3 g.L<sup>-1</sup> de milieu Murashige & Skoog – Duchefa Biochemie, BH Harlem, Netherlands -, 10 g.L<sup>-1</sup> de saccharose et solidifié avec 8,9 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel™ ajusté au pH 5,9) complétement avec de la kanamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>). Les boîtes de Pétri correspondantes sont placées à 20 °C en chambre de culture avec une photopériode de 16 heures.

### 6.4. Génotypage des lignées

#### 6.4.1. Vérification de l'insertion du T-DNA

L'insertion du T-DNA dans les lignées transformées a été vérifiée par PCR sur ADNg de feuilles de vitroplants, comme présenté dans la partie 9.1. Pour chaque construction et pour chaque lignée, on vérifie par PCR : 1) la qualité de l'ADN en amplifiant le gène de référence *EF-1α* chez le pommier et le gène de référence *AtCop1* chez *A. thaliana* ; 2) la présence du T-DNA *via* celle du gène de sélection *nptII* (hormis pour le plasmide pMF1-GFP-dest où le gène de sélection est *CodAnptII*) et de la cassette d'intérêt ; 3) l'absence d'*A. tumefaciens* en amplifiant la petite sous-unité ribosomique 23s de la bactérie. L'enzyme utilisée pour la PCR est la GoTaq® G2 et l'ensemble des couples d'amorces utilisé pour la génotypage est récapitulé dans l'**annexe 2**.

#### 6.4.2. Analyse des éditions des séquences codantes des MdAGGs

L'action du CRISPR/Cas9 a été vérifiée par séquençage. Pour cela, sur ADNg, nous avons amplifié en masse les zones génomiques ciblés par PCR en utilisant la Q5® High Fidelity 2X MasterMix et le couple d'amorces Q (**Annexe 2**). Ce dernier est un couple d'amorces encadrant la zone cible et fonctionnant pour l'ensemble des agglutinines (**Figure 61**). Les PCR sont ensuite purifiées, pour éliminer les amorces restantes, avec le Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System selon les recommandations du constructeur. Les amplicons purifiés sont ensuite clonés en masse dans le vecteur pGEM®-T Easy selon les recommandations du constructeur.



**Figure 61 : Positionnement des amorces permettant l'amplification des zones visées par le système d'édition du génome CRISPR/Cas9.** La zone **en bleu** représente la séquence codante d'une MdAGG, les zones **en vert** sont les PAM des gRNAs (représentés **en marron** et **en jaune**). Les zones **en violets** sont les amorces du couple Q (Tableau MM1) utilisées pour amplifier par PCR les zones visées par CRISPR/Cas9. On remarque qu'elles sont positionnées de part et d'autre des zones ciblées par les gRNAs.

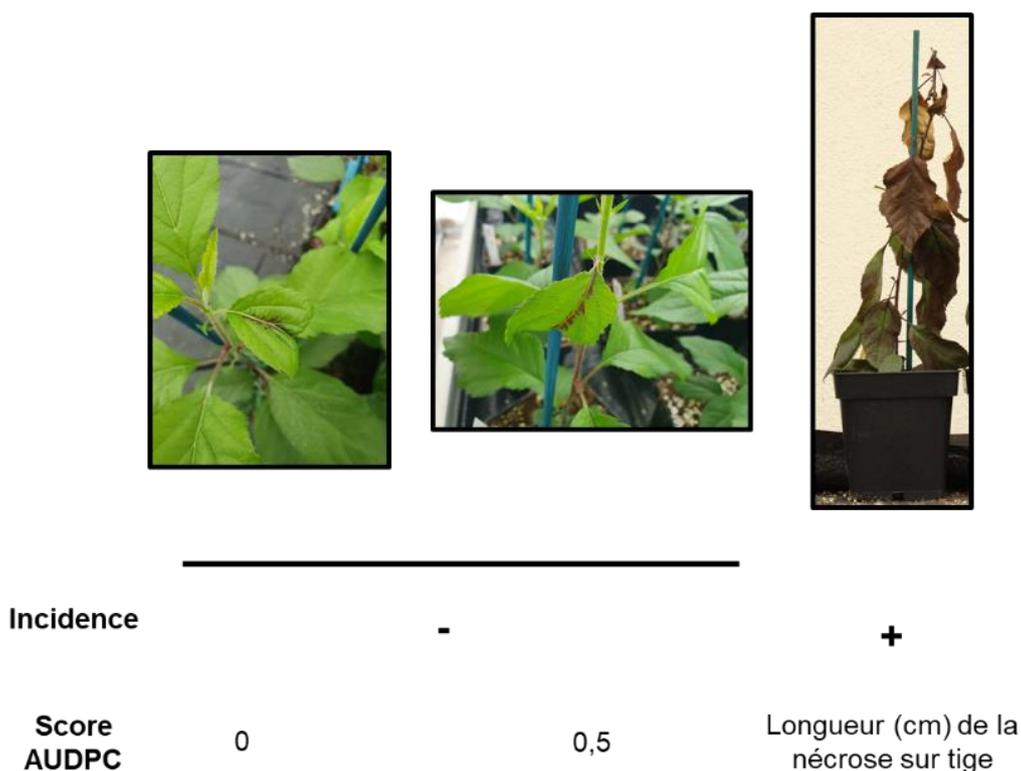
Après l'incubation de 24 heures à 37 °C, on prélève sur boîte de Pétri à l'aide d'un cône de pipette P10, une petite partie d'une colonie bactérienne que l'on re-suspend dans 100 µL d'eau nucléase free (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, United States). On vérifie la bonne intégration de l'amplicon dans le plasmide pGEM®-T Easy par PCR, en utilisant l'enzyme GoTaq® G2 et le couple d'amorces R. Les colonies positives ; c'est-à-dire dont l'amplicon de PCR est à la taille attendue (1) en cas d'édicions ponctuelles (taille équivalente à l'allèle natif) ou (2) en cas d'élimination de la partie entre les deux gRNA ; sont sélectionnées et mises en culture dans du milieu Luria-Bertani Broth liquide pendant 15 heures à 37 °C. Un volume de 3 mL de culture bactérienne est prélevé pour extraire l'ADN plasmidique avec le kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI, United States), selon les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique est ensuite dosé par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop® One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) puis envoyé à séquencer, auprès de l'entreprise Azenta Life Science (Burlington, MA, United States) avec l'amorce sens du couple R (**Annexe 2**).

## 7. Méthode de phénotypage des bioagresseurs

Pour la mesure d'incidence du feu bactérien sur les plantes inoculées, on a considéré que la plante était infectée par le feu bactérien lorsque des symptômes de la maladie étaient visibles au-delà du pétiole de la feuille infectée (**Figure 62**).

Nous avons utilisé la méthode de l'Area Under Disease Progression Curve (AUDPC) décrite par Shaner (1977) pour caractériser la sévérité du feu bactérien. Cependant, les notes utilisées pour le calcul de l'AUDPC sont différentes selon que les plantes notées soient des plantes acclimatées en serre ou que les plantes soient des vitroplants. Pour les plantes acclimatées en serre, les scores suivant sont donnés (**Figure 62**) :

- 0 en absence de symptômes ou si les symptômes visibles sont en amont du pétiole de la feuille inoculée,
- 0,5 si les symptômes ne sont visibles que sur le pétiole de la feuille inoculée,
- **X** où **X** correspond à la taille (en cm) des symptômes visibles sur la tige.

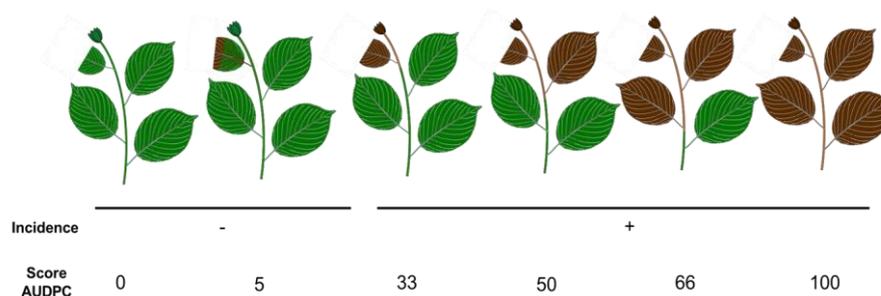


**Figure 62 : Echelle de notation de l'incidence et de la sévérité du feu bactérien pour des plantes acclimatées en serre.** On considère une plante malade lorsque des symptômes sont observés au-delà de la feuille inoculée. Pour le calcul de l'AUDPC, on attribue 0,5 si les symptômes ne sont visibles que sur le pétiole de la feuille inoculée ou on attribue la taille des symptômes visibles (en cm) présents sur la tige. Les photos sont personnelles.

Concernant les vitroplants, les scores suivants sont donnés (**Figure 63**) :

- 0 en absence de symptômes ou si les symptômes visibles sont en amont du pétiole de la feuille inoculée,
- 5 si les symptômes ne sont visibles que sur le pétiole de la feuille inoculée,
- 33 si les symptômes sont visibles sur moins d'un tiers de la taille totale du vitroplant,
- 50 si les symptômes représentent entre un et deux tiers de la taille totale du vitroplant,
- 66 si les symptômes représentent plus de deux tiers de la taille totale du vitroplant,
- 100 si le vitroplant est totalement atteint.

L'incidence et la sévérité du feu bactérien ont été notées 4 ; 7 ; 11 ; 14 ; 19 et 21 jours après inoculation pour les plantes acclimatées en serre et 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 10 et 12 jours après inoculation pour les vitroplants.



**Figure 63 : Echelle de notation des symptômes du feu bactérien sur des vitroplants.** Un score de 0 correspond à une absence de symptômes au-delà du pétiole de la feuille inoculée, 5 correspond à des symptômes présents uniquement sur le pétiole de la feuille inoculée, 33 correspond à des symptômes présents sur moins de 33% de la taille de la plante, 50 correspond à une plante infectée entre 33 et 66% de sa taille totale, 66 correspond à une plante infectée entre 66 et 99% de sa taille et 100 correspond à une plante totalement infectée.

La notation des symptômes de la pourriture bactérienne causée par *R. solanacearum* a été réalisée quotidiennement entre 3 et 7 jours suivant l'inoculation. Chaque plante a été notée selon l'échelle décrite par Morel et al, (2018 - **Figure 64**).



**Figure 64 : Echelle de notation des symptômes de *R. solanacearum* sur *A. thaliana*.** 0 correspond à une absence de symptômes de la maladie; 1 correspond à l'apparition du premier symptôme de la pourriture bactérienne; 2 correspond à des symptômes présents sur la moitié de la plante ; 3 correspond à des symptômes présents sur la plupart de la plante et 4 correspond à une plante complètement atteinte par la maladie (Morel et al, 2018).

La sévérité de l'infestation par les pucerons correspond au nombre de pucerons présent sur la plante 10 jours après dépôt du premier puceron.

## 8. Echantillonnage pour les analyses moléculaires et biochimiques

Lors des inoculations d'*Ea* par coupure, les morceaux de feuilles coupés sont groupés par deux pour former un échantillon, ensuite utilisé pour extraire l'ADN, l'ARN total (ARNt) ou des protéines. Lors des inoculations par infiltration sous vide, pour les plantes acclimatées en serre, les plus jeunes feuilles développées infiltrées de deux plantes sont groupées pour former un échantillon, ensuite utilisé pour extraire des protéines. Pour les vitroplants, l'ensemble des feuilles de deux vitroplants sont groupées pour former un échantillon, ensuite utilisé pour extraire l'ADN, ou l'ARNt. Les échantillons sont mis dans l'azote liquide dès le prélèvement et stockés à -80 °C en attendant d'être traités.

## 9. Analyses des acides nucléiques

### 9.1. Extraction d'ADNg

Les échantillons de feuilles sont broyés à l'aide de 3 billes en métal et d'un broyeur à billes (Retsch, Haan, Germany) deux fois 20 secondes à 30 Hz. Pour la suite de l'extraction d'ADN, nous avons suivi le protocole détaillé de Fulton et al, (1995), hormis la dernière étape d'élution où l'ADN est élué dans de l'eau ultra pure (Thermo Fisher Scientific, Woodward St Austin, TX, United States) au lieu du tampon Tris-EDTA (TE) conseillé dans le protocole de Fulton et al, (1995). La quantité d'ADNg extraite est mesurée par spectrophotométrie avec un Nanodrop® One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Les ADNg sont stockées à -20 °C lorsqu'ils sont utilisés régulièrement et à -80 °C pour des conservations sur de plus longues durées.

### 9.2. Extraction d'ARNt

Les échantillons foliaires sont broyés à l'aide de billes en métal et d'un broyeur à bille (Retsch, Haan, Germany) deux fois 20 secondes à 30 Hz. L'ARNt est extrait à l'aide du kit Nucleospin RNA Plant® (Macherey-Nagel, Düren, Germany) selon les recommandations du fournisseur. L'ARNt est mesuré par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop® One. Les ARN sont stockées à -20 °C lorsqu'ils sont utilisés régulièrement et à -80 °C pour des conservations sur de plus longues durées.

### 9.3. Retrotranscription (RT)

La RT est réalisée avec 2000 ng d'ARNt. Une solution contenant (1:9 v:v) d'oligo-dT15 (Promega, Madison, WI, United States) / eau nucléase free (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, United States) est ajoutée à la solution contenant les 2000 ng d'ARNt et les oligo-dT15 sont fixés à l'ARN par choc thermique (5 minutes à 75 °C puis 5 minutes sur glace). Les ADN complémentaires (ADNc) sont polymérisés grâce à la rétrotranscriptase M-MLV RT (200 U.µL<sup>-1</sup>, Promega, Madison, WI, United States), selon les recommandations du fournisseur. L'ensemble est incubé à 42 °C pendant 75 minutes. L'absence d'ADNg et la présence d'ADNc est vérifiée par PCR avec la GoTaq® G2 en amplifiant le gène de référence EF-1α chez le pommier (couple P) ou le gène de référence *AtCop1* chez *A. thaliana* (couple S) (**Annexe 2**).

### 9.4. PCR

L'ensemble des PCRs ont été faites avec deux enzymes : soit la GoTaq® G2, soit la Q5® High Fidelity 2X MasterMix. L'enzyme Q5® High Fidelity 2X MasterMix est une enzyme « proof-reading », c'est à dire qu'elle ne fait pas d'erreur de lecture lors de l'amplification de l'ADN. Son utilisation est donc nécessaire lors des étapes d'amplification de constituants d'une construction ou de séquençage.

L'enzyme GoTaq® G2 est utilisée dans les autres cas. Chaque enzyme est utilisée dans les proportions recommandées par le fournisseur et est associée à un programme d'amplification spécifique. Pour la GoTaq® G2, le programme comprend :

- Une étape initiale de 5 minutes à 95 °C,
- 40 cycles comprenant 30 secondes à 95 °C, 45 secondes à **Tm** °C et **Y** secondes à 72 °C,
- Une étape finale de 5 minutes à 72 °C

Pour la Q5® High Fidelity 2X MasterMix, le programme comprend :

- Une étape initiale de 30 secondes à 98 °C,
- 40 cycles comprenant 10 secondes à 98 °C, 30 secondes à **Tm** °C et **Y** secondes à 72 °C,
- Une étape finale de 2 minutes à 72 °C

Le **Tm** correspond à la température d'hybridation spécifique du couple d'amorces utilisé, que l'on retrouve dans le tableau de présentation des amorces (**Annexe 2**) et **Y** correspond au temps d'élongation, qui dépend de la taille de l'amplicon. Pour un amplicon d'une taille inférieure à 1000 pb, le temps d'élongation est de 60 secondes. Tous les 500 pb supplémentaires, on ajoute 30 secondes de temps d'élongation. Par exemple, un amplicon ayant une taille attendue comprise entre 1000 et 1500 pb sera amplifié avec un temps d'élongation de 90 secondes, *etc.*

Toutes les PCR ont été réalisées avec le thermocycleur Bio-Rad T100™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, United States).

### **9.5. Migration sur gel des amplicons de PCR et des produits de digestions enzymatiques**

Les amplicons de PCR ont été mis à migrer sur un gel d'agarose (Eurobio Scientific, Les Ulis, France) de 2% (w:v) préparé dans du tampon Tris-Acetate-EDTA (Eurobio Scientific, Les Ulis, France) à 0,5X (v:v) et complété avec 3,3% (v:v) de Midori Green (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland). La migration des digestions enzymatiques se fait sur le même gel que les amplicons hormis que le gel est à 1% d'agarose (w:v).

La migration des amplicons et des digestions enzymatiques se fait sur un système d'électrophorèse Mupid®-One (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland), à 100 V pendant 20 minutes pour les premiers et 30 minutes pour les secondes. La révélation des gels se fait sous UV avec le système d'imagerie Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### **9.6. PCR quantitative (qPCR)**

Le niveau d'expression des gènes étudiés est mesuré par RT-qPCR en triplicats en utilisant des plaques de 96 puits (Hard-Shell® PCR Plates 96-well thin wall, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA).

Les ADNc dilués 100 fois sont ajoutés à un mix comprenant 7,5  $\mu\text{L}$  de MesaBlue MasterMix (Eurogentec, Liege, Belgium), 4,35  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure et 3  $\mu\text{L}$  de la solution d'amorces à la concentration d'efficacité optimale (**Annexe 2**). Les qPCR sont réalisées avec le CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) en utilisant un programme comprenant une première étape à 95 °C pendant 5 minutes, 35 cycles avec 3 secondes à 95 °C et 45 secondes à 60 °C. A la fin de chaque cycle, les courbes de fusion sont faites pour vérifier l'absence de dimères d'amorces et d'amplicons aspécifiques. Les cycles de quantifications (Cq) sont obtenus avec le logiciel Bio-Rad CFX Maestro 2.0 et l'expression relative des gènes est calculée avec la méthode  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  soit  $2^{(Cq_{\text{calibrateur}} - Cq_{\text{échantillon}})}$ . Cette expression relative est normalisée par la moyenne géométrique (Vandesompele et al, 2002) de trois gènes de ménage : *TuA*, *Actine* et *GAPDH* chez le pommier et *AtCop1*, *Actine* et *Cla* chez *A. thaliana*. Les résultats des expressions relatives sont présentés en  $\log_2$  (sauf cas contraire précisé) et le calibrateur est précisé dans chaque expérience.

Dans certains cas, nous avons quantifié la présence de séquences de *MdAGGs* non éditées par qPCR. Le protocole est identique en tout point à celui décrit ci-dessus, hormis que 0,15 ng d'ADNg est ajouté au mix.

## 10. Analyses protéiques

### 10.1. Extraction protéique

Les échantillons au préalable refroidis à -80 °C avec de l'azote liquide sont broyés au pilon et mortier jusqu'à obtenir une poudre fine. 200 mg de poudre est utilisée pour extraire les protéines des tissus via une extraction phénolique. Après le broyage, on ajoute une pointe de polyvinylpyrrolidone puis 900  $\mu\text{L}$  de SDS-dense Buffer (saccharose 30% ; SDS 2% ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 5% - ajouté extemporanément - ; Tris 0,1 M ; pH 8), puis on vortexe à température ambiante jusqu'à obtenir de la mousse en haut des tubes et on centrifuge alors pendant 1 minute à 10 000 g afin de la faire disparaître. On ajoute ensuite 900  $\mu\text{L}$  de phénol puis on vortexe jusqu'à ce que la solution blanchisse. La solution est incubée 5 minutes à température ambiante puis est centrifugée pendant 10 minutes à 16 000 g. La phase supérieure est prélevée et on ajoute un volume du tampon de précipitation acétate d'ammonium – méthanol (1:5 v:v, acétate d'ammonium 0,1 M ; DTT 50 mM ; méthanol 100%) et on incube au minimum une nuit à -20 °C pour faire précipiter les protéines. Une première centrifugation de 10 minutes à 16 000 g permet de culotter les protéines puis d'éliminer le surnageant. On centrifuge à nouveau 10 minutes à 16 000 g pour éliminer les résidus de surnageant qui n'auraient pas été éliminés par le pipetage. On laisse incubé une minute à température ambiante pour que les dernières traces de surnageant s'évaporent. On ajoute alors jusqu'à solubilisation du culot, du tampon de Laemmli modifié (SDS 0,125% ; glycérol 10% ; Tris 62,5 mM ; DTT 5 mM ; pH 7,5). Les échantillons peuvent être conservés à 4 °C pour du court terme et -20 °C pour du long terme.

### 10.2. Dosage protéique et migration SDS-page

Les protéines extraites sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) au bleu de Coomassie à la DO<sub>595</sub> avec un spectrophotomètre  $\mu$ Quant (Bio-Tek, Colmar, France) en calibrant la mesure avec du tampon de Laemmli modifié seul. Avant d'ajouter le bleu de Coomassie, une dilution au 1:9 (v:v) des échantillons est réalisée afin de rester dans les conditions de la droite d'étalonnage. Le calcul de la concentration protéique (Cp) est fait en utilisant une gamme d'étalonnage faite à partir d'albumine de sérum bovin (BSA, Cp = DO<sub>595</sub>\*696,41 - 3,3087). On prépare ensuite une solution protéique à la concentration voulue en dénaturant les protéines à l'aide d'un tampon de charge (9:1 v:v, SDS 20% ; bleu de bromophénol 0,1% ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 50%). Les protéines sont séparées sur un gel d'acrylamide par migration SDS-Page pendant 35 minutes à 200 V dans un tampon Trans-Blot Turbo 5X Transfer Buffer (Bio-Rad Industries Inc, Hercules, CA, USA) avec le Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA). La révélation des protéines totale se fait avec le ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) en utilisant le mode « Stain free gel ».

### 10.3. Transfert et immunodétection

Après la migration, les protéines sont transférées (1,5 mA.cm<sup>-2</sup> ; 1 h ; < 30 V) sur une membrane polyvinylidène difluorure (PVDF - immobilon-P, Milli-pore Corp., Bedford, MA, États-Unis) préparée selon les recommandations du fabricant, prises en sandwich entre des papiers filtres Western Pierce® de 3 mm d'épaisseur (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Le sandwich est composé, en partant de l'anode à la cathode, d'une première couche de 2 papiers filtres trempée dans une solution « anode 1 » contenant 10 % de méthanol, 300 mM de Tris et tamponnée à pH 10,4, d'un papier filtre et de la membrane PVDF trempée dans une solution « anode 2 » contenant 10 % de méthanol ; 25 mM de Tris et tamponnée à pH 10,4, du gel d'acrylamide, et d'une couche de 3 papiers filtre trempée dans une solution « cathode » contenant 10 % de méthanol ; 0,1 % de SDS ; 40 mM de glycine ; 25 mM de Tris et tamponnée à pH 9,4. Chaque partie du sandwich trempe dans sa solution respective pendant 15 minutes.

Après le transfert, la membrane est bloquée dans la solution EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad Industries Inc, Hercules, CA, USA) pendant une heure. On prépare 30 mL de cette solution pour chaque membrane à bloquer. La membrane est ensuite incubée sur la nuit à 4 °C dans une solution EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad Industries Inc, Hercules, CA, USA) contenant deux anticorps de lapin anti MdAGGs dilués chacun au 1:1000 (v:v). Les anticorps de lapins ont été obtenus au cours de programmes d'immunisation avec des peptides synthétiques ayant les séquences suivantes : NKYLRYLDAESDLN et TEKPNNEDYADKNYV. Le lendemain matin, la solution est lavée 5 fois 5 minutes dans une solution de TBSt (Tris 20 mM ; NaCl 150 mM ; Tween®20 ; 0,05% (v:v) ; pH 7.6) puis incubée 1 heure dans une solution de EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad Industries Inc, Hercules,

CA, USA) avec des anticorps de chèvre anti anticorps de lapins avec un groupement HRP (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La membrane est ensuite révélée par chemiluminescence avec le kit Clarity™ Western ECL Substrates Kit (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur et en utilisant le ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA).

## **11. Analyse des données statistiques**

Le logiciel R a été utilisé pour la représentation graphique ainsi que les tests de significativité. Les graphiques ont été générés avec le package ‘ggplot2’ (Wickman et Wickman, 2016) associé au package ‘ggpubr’ (Kassambara, 2020). Les données de bootstrap ont été générées en utilisant le package ‘boot’ (Davison et Hinkley, 1997 ; Canty, 2021). Hormis pour les tests statistiques concernant l’incidence du feu bactérien où un test de comparaison de Student est effectué, l’ensemble des tests statistiques sont des tests de rang de Wilcoxon. Pour l’ensemble des tests effectués, le calibrateur est précisé dans la légende des figures.

## ANNEXES

**Annexe 1 : Tableau des souches utilisées au cours de la thèse ainsi que leur milieu et les caractéristiques de leur culture.**

Code d'identification	Espèces bactériennes	Pathogène de	Temperature	Atmosphere	Milieu de culture utilisé
<b>Gram negative</b>					
CFBP4716	<i>Agrobacterium sp. biovar 1</i>	Plante	26 °C	aérobie	Luria-Bertani Broth
CFBP5493	<i>Agrobacterium sp. biovar 1</i>				
Life Technologies (Carlsbad, Ca, United States)	<i>Agrobacterium tumefaciens EHA105</i>				
CFBP2227	<i>Burkholderia cepacia</i>				
CFBP2228	<i>Burkholderia cepacia</i>				
CFBP4794	<i>Burkholderia pyrocinia</i>				
CFBP7086	<i>Dickeya chrysanthemi</i>				
CFBP1270	<i>Dickeya chrysanthemi biovar parthenii</i>				
CFBP6715	<i>Mesorhizobium loti</i>				
13516	<i>Pantoea agglomerans</i>				
CFBP3517	<i>Pantoea stewartii subsp. stewartii</i>				
CFBP8637	<i>Pectobacterium aquaticum</i>				
CFBP7370	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. Actinidiae</i>				
CFBP2634	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis</i>				
CFBP6070	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i>				
CFBP3296	<i>Pectobacterium carotovorum subsp. odoriferum</i>				
CFBP8603	<i>Pectobacterium polaris</i>				
CFBP8652	<i>Pectobacterium versatile</i>				
CFBP2101	<i>Pseudomonas cichorii</i>				
CFBP2102	<i>Pseudomonas fluorescens biovar 1</i>				
CFBP1390	<i>Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola</i>				
CFBP2443	<i>Pseudomonas stutzeri</i>				
CFBP1657	<i>Pseudomonas syringae pv. maculicola</i>				
CFBP5092	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>				
CFBP7438	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>				
CFBP8283	<i>Ralstonia solanacearum</i> (KO mutant in LPS and EPS synthesis)				
CFBP6924	<i>Ralstonia solanacearum GMI 1000</i>				
CFBP5251	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>				
CFBP2054	<i>Xanthomonas translucens pv. translucens</i>				
CFBP1430	<i>Erwinia amylovora</i>				
CFBP7939	<i>Erwinia amylovora</i> (KO dans la synthèse d'amylovorane)				
Life Technologies (Carlsbad, Ca, United States)	<i>E. coli TOP10</i>	-	37 °C		Luria-Bertani Broth + Antibiotique associé
2054266	<i>Enterobacter cloacae</i>	Humain	35 °C		sheep blood Colombia CNA agar (bioMérieux, Craponne, France)
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>				
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
2054609	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
2051551	<i>Pseudomonas stutzeri</i>				
2053927	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				
<b>Gram positive</b>					
CFBP4999	<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	Plante	26 °C	aérobie	Luria-Bertani Broth
CFBP2049	<i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i>				
ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i> (SASM)	Humain	35 °C	aérobie	sheep blood Colombia CNA agar (bioMérieux, Craponne, France)
ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i>				
BAA 750	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>				
ATCC 13124	<i>Clostridium perfringens</i>				
1950531	<i>Streptococcus pneumoniae serotype 3</i>			anaérobie	

**Annexe 2 : Couples d'amorces utilisées en PCR et qPCR dans l'ensemble de la thèse pour la construction des plasmides, et le génotypage des lignées obtenues, chez le pommier et chez Arabidopsis. Or indications contraires, les accessions pour le pommier proviennent du génome de *Malus domestica* GDDH13 v1.1 et les accessions d'Arabidopsis proviennent du génome de référence d'*A. thaliana* TAIR10. "pb" signifie "paire de base"**

Amorces pour la construction de p35s::MdAGG10							
Plante	Code Amorce	Gène (Accession)	Séquence		Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)	Rôle
Commun au pommier et à <i>Arabidopsis</i>	A	<i>MdAGG10</i> (MD10G1027210)	Forward	CACCATGGCTCCACCTGTACTAC	498	58	Amplification de <i>MdAGG10</i> chez le pommier ou les <i>Arabidopsis</i> surexprimeur et dans le plasmide pGW2B
			Reverse	TCAACATCTGACTTGAAAGACT			
Amorces pour la construction des lignées CRISPR/Cas9							
Plante	Code Amorce	Gène (Accession)	Séquence		Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)	Rôle
Pommier	B	pDONR207 <sup>TM</sup> (Invitrogen, Waltham, MA, United States)	Forward	TGCGGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Taille des guides (500 pb) + 200 pb, soit <b>700</b> pb	60	Vérification de l'insertion des guides U3 et U6 dans le plasmide pDON
			Reverse	GTAAACATCAGAGATTTTGAGACAC			
	C	pDECas9Kr (Charier et al, 2019)	Forward	AGCTCCCTAGGCCTGTTATC	Tailles des guides (2 fois 500 pb) + 200 pb soit <b>1200</b> pb	60	Vérification de l'insertion des guides U3 et U6 dans le plasmide pDECas9Kr
			Reverse	CTAGGCTGGATCGGAATTATCG			
Amorces pour la construction de pPPO16::MdAGG10::TermRubisco							
Plante	Code amorce	Gène (Accession)	Séquence		Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)	Rôle
Pommier	D	<i>pPPO16</i> (MD10G1299400)	Forward	CACCCACCGTTTCTTCATCCTGCTG	2219	58	Amplification de <i>pPPO16</i> en ajoutant le site de restriction <i>EcoRI</i> en position 3'
			Reverse	GAATTCGGCTTAGCTCTCTGGTTTTG			
	E	<i>MdAGG10</i> (MD10G1027210)	Forward	GAATTCATGGCTCCACCTGTACTAC	498	58	Amplification du CDS de <i>MdAGG10</i> en ajoutant le site de restriction <i>EcoRI</i> coté 5' et <i>NcoI</i> coté 3'
			Reverse	CCATGGTCAACATCTGACTTGAAAGACT			
	F	<i>pPPO16::MdAGG10</i> (MD10G1299400::MD10G1027210)	Forward	CTGCGGGGTATCTACATGGT	577	60	Vérification de la présence de la construction <i>pPPO16::MdAGG10</i>
			Reverse	CCTCCAGCATCAGGTGTTTT			
	G	<i>TermRubisco</i> (HM222641.1 - Schaart et al, 2011b)	Forward	CCATGGATTTGGACGAGTAATGTATTATA	899	58	Amplification de <i>TermRubisco</i> et ajout coté 5' du site <i>NcoI</i> et coté 3' du site <i>AttII</i>
			Reverse	GACGTCCACTAGTGATTCAACCCGAA			
	H	Plasmide pENTR <sup>TM</sup> (Invitrogen, Waltham, MA, United States)	Forward	CACCGTTTCTTCATCCTGCT	3640	58	Amplification de la cassette <i>pPPO16::MdAGG10::TermRubisco</i> pour l'insertion dans le plasmide pENTR <sup>TM</sup>
			Reverse	GACGTCACATTGAGTAACACT			
	J	pENTR <sup>TM</sup> _pPPO16 (MD10G1299400)	Forward	GTA AACACGACGGCCAG	661	54	Vérification de la présence de la cassette <i>pPPO16::MdAGG10::TermRubisco</i> dans le pENTR <sup>TM</sup>
			Reverse	ATCGTGACATACCATCAGG			
	K	pENTR <sup>TM</sup>	Forward	GTA AACACGACGGCCAG	Taille de PAT (3640 pb) + 354 pb soit <b>3994</b> pb	58	Amorces pour amplifier au delà des attL du plasmide pENTR <sup>TM</sup>
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC			
T	<i>MdAGG10::TermRubisco</i> (MD10G1027210::HM222641)	Forward	AATGGGCTTGCACATTGTT	509	60	Amorces à cheval entre <i>MdAGG10</i> et <i>TermRubisco</i>	
		Reverse	TGGGATTCAAGCATTTACA				
V	pMF1-GFP-dest:: <i>TermRubisco</i> (Schaart et al, 2011b::HM222641)	Forward	CGTATTCTTTTCATCAACGTCCA	660	58	Amorces à cheval entre pMF1-GFP-dest et <i>TermRubisco</i>	
		Reverse	TGACATACCATCAGGACCTTTG				

**Amorces pour le génotypage des différentes lignées, des éditions des séquences codantes des MdAGGs et du bon fonctionnement de la RT**

Plante	Code amorce	Gène (Accesion)	Séquence	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)	Rôle	
Commun au pommier et à <i>Arabidopsis</i>	L	<i>nptII</i> (Karimi et al, 2002) ou (Xu et al, 2020)	Forward	ATACTTTCTCGGCAGGAGCA	470	58	Vérification de la présence du gène de sélection dans le T-DNA inséré
			Reverse	GCGTTCAAAAGTCGCCTAAG			
	M	ARN ribosomique 23s d' <i>Agrobacterium</i>	Forward	GTAAGAAGCGCAACCGAGGAACT	187	58	Vérification de l'absence de contamination par <i>Agrobacterium</i> dans les plantes transformées
			Reverse	GACAATGACTGTCTACGCGTAA			
	N	<i>p35s::MdAGG10</i> (Karimi et al, 2002::MD10G1027210) ou (Xu et al, 2020::MD10G1027210)	Forward	TTCTTGTCGGCGTAGTCCTC	500	58	Vérification de la présence de la cassette <i>p35s::MdAGG10</i> dans les lignées de pommiers ou d' <i>Arabidopsis</i>
			Reverse	CTCCACTGACGTAGGGATGA			
Pommier	P	<i>EF 1-α</i> (MD03G1103900)	Forward	CTCTTGGTGTCCAGGCAAATG	400	58	Amplification du gène de référence <i>EF 1-α</i> afin de vérifier la qualité de l'extraction d'ADN
			Reverse	TCAAGGTGGTGGACCTCTC			
	X	pDECas9Kr (Charrier et al, 2019)	Forward	TGAGTTGGTGAAGGTGATGGG	1000	60	Amplification du gène codant la Cas9
			Reverse	TAACGATGTTACCTGTGGCA			
	C	pDECas9Kr (Charrier et al, 2019)	Forward	AGCTCCCTAGGCCCTGTATC	Tailles des guides (2 fois 500 pb) + 200 pb soit <b>1200 pb</b>	60	Vérification de l'insertion des guides U3 et U6 dans le T-DNA inséré
			Reverse	CTAGGCTGGATCGGAATTATCG			
	F	<i>pPPO16::MdAGG10</i> (MD10G1299400::MD10G1027210; Karimi et al, 2002)	Forward	CTCGGGGTATCTACATGGT	577	60	Vérification de la présence de la construction <i>pPPO16::MdAGG10</i> au sein du T-DNA inséré
			Reverse	CCTCCAGCATCAGGTGTTTT			
	Q	MdAGG1 à MdAGG16 (MD10G1026610; MD10G1026620; MD10G1026810; MD10G1026820; MD10G1027010; MD10G1027020; MD10G1027030; MD10G1027110; MD10G1027210; MD10G1027220; MD10G1027230; MD10G1027240; MD10G1027250; MD10G1027260; MD10G1232610)	Forward	CCAATGAGATCAGCCATGTT	672	55	Amorces dégénérées de part et d'autre des deux gRNAs visant les <i>MdAGGs</i>
			Reverse	CCTCCAGCATCAGGTGTTTT			
	R	Plasmide pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, United States)	Forward	GTTTTCCAGTCACGAC	252 pb + Taille de l'amplicon inséré	54	Amorces pour vérifier l'insertion de l'amplicon obtenu grâce au couple "Q" au sein de pGEM-T Easy
			Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC			
	S	<i>reclBD</i> (Schaart et al, 2011b)	Forward	AGAACCCTCTCCAAAGGAA	462	60	Vérification de la présence de la recombinase présente dans le plasmide pMF1-GFP-dest
			Reverse	TGTATGCGGCCCTTGTGTGA			
T	<i>MdAGG10::TermRubisco</i> (MD10G1027210::HM222641)	Forward	AATTGGGCTTGCACATTGTT	509	60	Amorces à cheval entre <i>MdAGG10</i> et <i>TermRubisco</i>	
		Reverse	TGGGATCAAGCATTTTCCACA				
U	<i>CodNptII</i> (Schaart et al, 2011b)	Forward	TGCTCCTGCCGAGAAAGTAT	478	60	Vérification de la présence du gène fusion de sélection de pMF1-GFP-dest au sein du T-DNA inséré	
		Reverse	CGCTCAGAAGAACTCGTCAA				
V	pMF1-GFP-dest::TermRubisco (Schaart et al, 2011b::HM222641)	Forward	CGTATTCTTTTCATCAACGTCCA	660	58	Amorces à cheval entre pMF1-GFP-dest et <i>TermRubisco</i>	
		Reverse	TGACATACCATCAGGACCTTTG				
<i>Arabidopsis</i>	W	<i>AtCop1</i> (AT2G32950)	Forward	GCTCGGCATGTGTCAAAA	858	58	Amplification du gène de référence <i>AtCop1</i> afin de vérifier la qualité de l'extraction d'ADN
			Reverse	CCACTCAGCGCATCCTTC			

Plante	Code Amorce	Gène (Accession)	Séquence		Tm	Concentration (nM)
Pommier	qA	PR1 (AF507974 MDP0000711379)	Forward	AGCACACGAGTTCGACTCATAA	60	200
			Reverse	CACAAAACACTACGCCAACCAA		
	qB	PR2 (AF494404 MDP0000327191)	Forward	AATGTATTATATCGGAGAGTG	60	400
			Reverse	TGGCAAAGATGTAAGTTTC		
	qC	PR4 (CN877594 MDP0000782085)	Forward	TGGCCGGGAAGATCACAGCA	60	200
			Reverse	GTCCCAATGCACTGCCGACC		
	qD	PR5 (DR998561 MDP0000292031)	Forward	AAAGGGGCTCGCATTGG	60	600
			Reverse	CTTGGCATTGGAGGACACC		
	qE	PR8 (DQ318214 MDP0000217803)	Forward	CCAAGCCCTGTCTAAACCTC	60	200
			Reverse	CAACTTGCCTTGCCTCATCAGC		
	qF	PR14 (CV656658 MDP0000940078)	Forward	AGTGTCTTATTGTGATAGC	60	200
			Reverse	CAACTACAAGCAATTCTCC		
	qG	PR10	Forward	GCCTAAACCCCTCCCCACACTC	60	200
			Reverse	CATCTCCCTTGTCAACACCTTGG		
	qH	PAL (AF494403 MDP0000388769)	Forward	GGATCTCCTCAAAGTTGTCG	60	200
			Reverse	CTCACTCTCGCCATTGTC		
	qi	CHS (AF494401 MDP0000126567)	Forward	ATTGGTGCCGACCCAGTGC	60	100
			Reverse	AATCCAGAAGAGTGAGTTCCAGTCC		
	qJ	DFR (AF494390 MDP0000494976)	Forward	CGTTGGATGTACTTCG	60	200
			Reverse	TGTGAGAAAGGCAGAGG		
	qK	BIS2 (MDP0000208899)	Forward	CCTGATTCTTGTTCGAGTCAC	60	200
			Reverse	TTGGACCTCAGGGTCA		
	qL	PPO (L29450 MDP0000699845)	Forward	TGCCCGCCGCTTCCAC	60	200
			Reverse	GCTCCATCGCTTTGTAGTATTTGTC		
	qM	HMGR (AY043490 MDP0000251253)	Forward	AACAGGTCAAGCAGATTC	60	400
			Reverse	TTGTCAGAGCAGTAGTTG		
	qN	FPPS (AY083165 MDP0000924612)	Forward	TCTGGTGGTGGTGAAG	60	200
			Reverse	CTGCCTCTGTAATCTTGC		
	qP	FAR (EB111255 MDP0000199152)	Forward	GATATTTAGATGAGGCGAAAGC	60	200
			Reverse	GCGTTGATTGGCATTGAC		
	qQ	CSL (AY347795 MDP0000390049)	Forward	CACCCTGTCTTTCCAATCG	60	200
			Reverse	AGCAATCTTTATCTTCTCCCTCTC		
	qR	APOX (CN928974 MDP0000241173)	Forward	GCTTCCAACGACAAGGCTCTTC	60	200
			Reverse	CGCACAGGCATCGGCTTC		
	qS	GST (FE969955 MDP0000266097)	Forward	GAGCCCTTCATATCCCTCAATCC	60	200
			Reverse	GCCTCCACCTCCGACCAC		
	qT	POX (CN913385 MDP0000209189)	Forward	TGTCATTATTATCTTCTTGTGG	60	300
			Reverse	AACCGAAGCATCACATCC		
	qU	CalS (CN496203 MDP0000321472)	Forward	TGCCTTCATGCCAACGGGATG	60	200
			Reverse	CGGAAACAACGGAAACCAAGCC		
	qV	PECT (CV883439 MDP0000276688)	Forward	GGAGGGAGGGTCAACTGG	60	300
			Reverse	CAAACAACCTTCTCCACAACC		
qW	CAD (AF053084 MDP0000157209)	Forward	GGAGCCCAAGACAGACTTCAAC	60	200	
		Reverse	CGCCTTCACAACCTCAACAG			
qX	EDS1 (CN949066 MDP0000479863)	Forward	TGGAGAAAGTGATTTGGAGAAGC	60	200	
		Reverse	AGAACCAGATTGTGACAAACGC			
qY	WRKY (AY347836 MDP0000219647)	Forward	AATATACATTGGGAGCAAAAGAGTC	60	200	
		Reverse	AGAGTTCAGCATGGAAGCG			
qZ	LOX2 (CN941066 MDP0000300321)	Forward	GTTGCGTATGGGAAGGAATGG	60	200	
		Reverse	GGTAGTAGTGGTTACATAGTCAGTG			
qAA	JAR (CN989199)	Forward	CGTCCCTTCTCCACAATCC	60	200	
		Reverse	GGTTCTTGGTGAATGTTGC			
qAB	ACCO (AB086888 MDP0000725984)	Forward	GTTGGTGCTGGGTAGATCAC	60	200	
		Reverse	ACGGAGAGTGGTGTGATGTG			
qAC	EIN3 (CV082047)	Forward	CGTTATGGCGTTGGTTAGG	60	400	
		Reverse	CAGAAATGGAGAGGACTTGC			
qEdC	MdAGG (MD10G1027210)	Forward	CAGCTGCTGACCGAAATGAAAC	60	300	
		Reverse	TCTGACTTGGGAGACTGAGTAGAT			
qAE	TuA (CO065788 MDP0000525934)	Forward	GTTCAATGCTGTGGTGGTG	60	300	
		Reverse	CTGCGGAGAAGGATAGATGG			
qAF	Actin (CV151413 MDP0000239701)	Forward	CAACCTCTCGTCTGTGATAATG	60	100	
		Reverse	GCATCCTTCTGTCCCATCC			
qAG	GAPDH (CN494000)	Forward	CTTGCTCCGCCCTTCC	60	300	
		Reverse	CGTAGTTCACCTCATGTTGC			
qEdABC	MdAGG10 (MD10G1027210)	Forward	TACGATATGGCTCCACCTGT	58	300	
		Reverse	CGGTGGTGAACTTTATGAACC			

Plante	Code Amorce	Gène (Accession)	Séquence		Tm	Concentration (nM)
<i>Arabidopsis</i>	qAH	<i>Actine</i> (AT3G18780)	Forward	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	60	300
			Reverse	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC		
	qAJ	<i>Cla</i> (AT4G24550)	Forward	AGCATACACTGCGTGCAAAG	60	300
			Reverse	TCGCCTGTGTCACATATCTC		
	qAK	<i>AtCopI</i> (AT2G32950)	Forward	GCTCGGCATGTGTCAAAA	60	600
			Reverse	CCACTCAGCGCATCCTTC		
	qAD	<i>MdAGG10</i> (MD10G1027210)	Forward	CAGCTGCTGACCGAAATGAAAC	60	400
			Reverse	TCTGACTTGGGAGACTGAGTAGAT		

**Annexe 3 : Protocoles pour la transformation bactérienne compétente d'*E. coli*, de la transformation par électroporation d'*A. tumefaciens* et du stockage des souches d'*E. coli* et d'*A. tumefaciens* dans une solution de glycérol.**

	<b>Institut de Recherche en Horticulture et Semences</b> <b>Centre INRA Angers-Nantes, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé</b>	<b>Ref :</b> IRHS-MO-RR-0305
	<b>Clonage pENTR™ Directional TOPO®</b> <b>Cloning Kit</b>	<b>Version :</b> A <b>Date de création :</b> 13.03.2015 <b>Page :</b> 1 sur 5

Réf: IRHS-T-0001 / Version: A / Date de création: 13/03/2015

<b>Objectif :</b>	Cloner un gène d'intérêt en utilisant le kit pENTR™ Directional TOPO® Cloning
<b>Lieux :</b>	Laboratoires de bactériologie « OGM » et de biologie moléculaire
<b>Personnel habilité :</b>	Toute personne ayant pris connaissance des consignes de manipulation auprès de la personne compétente au sein de son équipe

### Références :

[https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pentr\\_dtopo\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pentr_dtopo_man.pdf)

### Matériel :

Matériel classique de biologie moléculaire et de bactériologie.

### Réactifs spécifiques et Solutions :

PCR phusion du cDNA d'intérêt (à partir du clone pJET)  
pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit (Life technologies)  
One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life technologies)  
Boite de Pétri milieu Luria-Bertani (LB)-agar + Kanamycine 50 µg/mL final

### Risques et sécurité :

Respecter les consignes d'accès et d'utilisation des congélateurs à -80°C.  
Manipuler les bactéries sous PSM.

### Tri des déchets :

Les « plastiques » (cônes, spatules et râpeaux...) entrés en contact avec les bactéries compétentes doivent être jetés dans les poubelles déchets biologiques, la verrerie et les résidus de culture doivent être autoclavés.

### Organisation :

- Ce clonage se déroule sur deux jours car une des incubations dure une nuit.
- Réserver et préparer un bain marie à 42°C en amont des manipulations du 2<sup>ème</sup> jour.
- Prévoir un bac de glace et les poubelles correspondantes aux déchets.
- pour les manipulations hors PSM.
- Réserver le PSM.

### Méthodologie :

**Rédigé ou révisé le :** 13.03.2015  
**Par :** Clément Joffrion et Aurélie Charrier

**Visa :**




**Vérfié le :** 11.06.15  
**Par :** Emilie Vergne

**Visa :**



**Approuvé le :** 11.06.15  
**Par :** Emilie Vergne

**Visa :**



  	<b>Institut de Recherche en Horticulture et Semences</b> <b>Centre INRA Angers-Nantes, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé</b>	<b>Ref :</b> IRHS-MO-(type d'activité)-0001 <b>Version :</b> A <b>Date de création :</b> 13.03.2015 <b>Page :</b> 2 sur 5
	<b>Clonage pENTR™ Directional TOPO®</b> <b>Cloning Kit</b>	

## Design des amorces

- Inclure les quatre paires de base supplémentaires suivantes en 5' de la séquence de l'amorce forward : CACC qui sera utilisé pour amplifier le fragment à cloner. Elles sont nécessaires pour le clonage directionnel dans le plasmide.

## Amplification du gène d'intérêt

- Amplification du gène d'intérêt par PCR en utilisant la phusion High-fidelity DNA polymerase (cf mode opératoire correspondant).
- Vérification de la taille de l'amplicon sur gel
- Quantification des produits de PCR au Nandrop.

**Remarques :** Si la PCR avec la phusion High-fidelity DNA polymerase ne fonctionne pas, il est alors possible d'utiliser la GoTaq G2 flexi. Il faudra cependant être plus vigilant lors des résultats du premier séquençage (fidélité de la polymérase GoTaq G2 flexi moins élevée que celle de la phusion).

## Ligation

- Produit de PCR : 1-4µL (≈20ng )
- Salt solution : 1µL (si le produit de PCR est très « propre » cad ratios >1.8 au nanodrop) ou 0µL
- Eau stérile : qsp 5 µL
- Vecteur : 1µL

?

### Remarques :

**Les produits PCR doivent être les plus propres (ratios 260/208 >1,8 et 260/230 >1,8) et les plus concentrées possibles. NE SURTOUT PAS VORTEXER ou mélanger par pipetage la ligation, rouler le tube sur lui-même pour homogénéiser.**

## Incubation

- Sur la nuit, à température ambiante. Placer le fond du tube eppendorf dans un peu d'eau et mettre le dispositif dans une chambre de culture à température contrôlée.

## Transformation

- Sortir le SOC du réfrigérateur pour qu'il soit à température ambiante.
- Sortir les bactéries compétentes One Shot TOP10 (50µL=1 réaction=1 tube) du congélateur -80°C et les placer tout de suite sur glace.
- Les laisser décongeler tranquillement sur glace.
- Ajouter 2µL de solution de ligation dans un tube de bactéries One Shot TOP10 (50µL) et homogénéiser.
- Incuber 30min dans la glace.
- Choc thermique 30s à 42°C.

<b>Rédigé ou révisé le : 13.03.15</b> <b>Par : Clément Joffrion et Aurélie Charrier</b>	<b>Vérifié le : 11.06.15</b> <b>Par : Emilie Vergne</b>	<b>Approuvé le : 11.06.15</b> <b>Par : Emilie Vergne</b>
<b>Visa :</b>  	<b>Visa :</b> 	<b>Visa :</b> 

  	<b>Institut de Recherche en Horticulture et Semences</b> <b>Centre INRA Angers-Nantes, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé</b>	<b>Ref :</b> IRHS-MO-(type d'activité)-0001 <b>Version :</b> A <b>Date de création :</b> 13.03.2015 <b>Page :</b> 2 sur 5
	<h1 style="color: green;">Clonage pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit</h1>	

- Remettre immédiatement sur glace 5 min.
- Ajout de 250µL de SOC medium (fourni dans le kit) à température ambiante.
- Incubation 1h, à 37°C sous agitation.

## Ensemencement

- Ensemencement de 50 et 200µL de solution bactérienne sur boîtes LBA + kanamycine (50µg/mL).
- Incubation à 37°C sur la nuit.

**Remarque :** Il est possible de tester les bactéries compétentes en utilisant le contrôle positif pUC19 DNA fourni dans le kit. Dans ce cas, ajouter 1 µL de pUC19 DNA à 1 tube de bactéries One Shot TOP10. Etaler 20 µL et 100 µL sur des boîtes LBA + ampicilline (100 µg/µL).

## Analyse des clones recombinants

- Sélectionner et isoler sur de nouvelles boîtes LBA + kanamycine (50 µg/mL) 4 à 6 clones recombinants comme décrits sur le schéma ci-dessous
- Effectuer l'analyse des colonies par PCR (les amorces sont fournies dans le kit)
- Faire une extraction plasmidique et envoyer à séquencer

**Rédigé ou révisé le :** 13.03.15  
**Par :** Clément Joffrion et Aurélie Charrier

**Visa :**




**Vérifié le :** 11.06.15  
**Par :** Emilie Vergne

**Visa :**

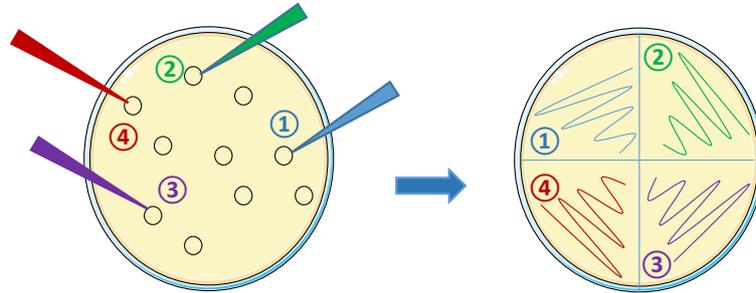


**Approuvé le :** 11.06.15  
**Par :** Emilie Vergne

**Visa :**

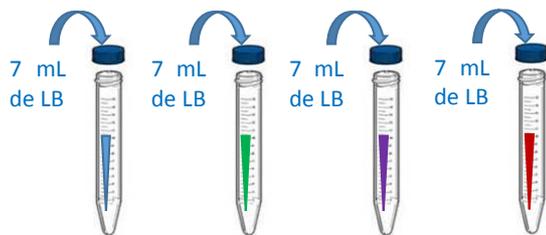


# Clonage pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit



Piquer dans 4 colonies isolées avec un cône et numérotter ces colonies au dos de la boîte

Etaler les colonies sur ¼ de boîte LBA-Kanamycine en notifiant le numéro de la colonie correspondant



Piquer de nouveau dans les 4 colonies isolées avec un cône et mettre le cône dans un tube contenant 7 mL de milieu LB + kanamycine (50 µg/mL). Incuber à 37°C avec agitation.

Extraction plasmidique pour envoi au séquençage  
(cf mode opératoire extraction d'ADN plasmidique)



Piquer légèrement de nouveau dans les 4 colonies isolées avec un cône (P10) et mettre le cône dans un tube contenant 100 µL d'eau (matrice pour la PCR : 1,5 µL)

PCR de vérification de la présence de l'insert  
(cf mode opératoire PCR GoTaq G2 Flexi)

## Carte du vecteur pENTR

Rédigé ou révisé le : 13.03.15  
Par : Clément Joffrion et Aurélie Charrier

Visa :



Vérifié le : 11.06.15  
Par : Emilie Vergne

Visa :

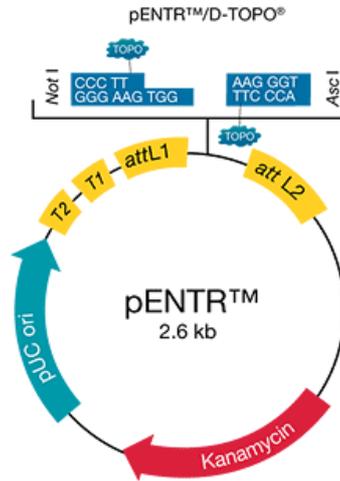


Approuvé le : 11.06.15  
Par : Emilie Vergne

Visa :



# Clonage pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit



Rédigé ou révisé le : 13.03.15  
 Par : Clément Joffrion et Aurélie Charrier

Visa :  

Vérifié le : 11.06.15  
 Par : Emilie Vergne

Visa : 

Approuvé le : 11.06.15  
 Par : Emilie Vergne

Visa : 

	<b>Institut de Recherche en Horticulture et Semences</b> <b>Centre INRA Angers-Nantes, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé</b>	<b>Ref :</b> IRHS-MO-RR-0308
	<b>Electroporation d'agrobacterium tumefaciens compétentes</b>	<b>Version :</b> A <b>Date de création :</b> 10.07.2015 <b>Page :</b> 1 sur 2

Réf: IRHS-T-0001 / Version: A / Date de création: 13/03/2015

<b>Objectif :</b>	transférer un plasmide d'intérêt dans une souche d'agrobacterium
<b>Lieux :</b>	Laboratoires de bactériologie« OGM » et de biologie moléculaire
<b>Personnel habilité :</b>	Toute personne ayant pris connaissance des consignes de manipulation auprès de la personne compétente au sein de son équipe

### Références :

### Matériel :

Matériel classique de biologie moléculaire et de bactériologie.

### Réactifs spécifiques et Solutions :

Miniprep du plasmide d'intérêt  
 Agrobacterium électro-compétentes  
 RMQ : pour le pommier et le Poirier il s'agit de la souche EHA105 disposant du plasmide ternaire ppbr-MCS5 qui porte un gène de résistance à la gentamycine  
 Boite de Pétri milieu Luria-Bertani (LB)-agar + Antibiotiques (celui correspondant au gène de résistance porté par le plasmide d'intérêt + gentamycine 50 µg/mL final).

### Risques et sécurité :

Manipuler les bactéries sous PSM.

### Tri des déchets :

Les « plastiques » (cônes, spatules et râtaux...) entrés en contact avec les bactéries compétentes doivent être jetés dans les poubelles déchets biologiques, la verrerie et les résidus de culture doivent être autoclavés.

### Organisation :

- Prévoir les poubelles correspondantes aux déchets.
- Utiliser des gants pour les manipulations hors PSM.
- Réserver le PSM.

### Méthodologie :

- Sortir les agrobacterium compétentes du congélateur -80°C et les placer tout de suite sur glace. Un tube contient 100 µl de bactéries compétentes.
- Les laisser décongeler tranquillement sur glace.
- Régler les paramètres de l'électroporateur (Multiporator, Eppendorf) pour agrobacterium : tension 1500 V, τ

**Rédigé ou révisé le : 10.07.2015**

**Par : Emilie VERGNE**

Visa : 

**Vérifié le : 10.07.15**

**Par : Aurélie Charrier**

Visa : 

**Approuvé le : 10.07.15**

**Par : Emilie Vergne**

Visa : 

## Clonage réaction LR

- (constante de temps) 5 ms.
- Ajout de 1 à 3  $\mu\text{L}$  de plasmide d'intérêt (150 ng, la miniprep doit être la plus propre possible (dosage au nanodrop) dans un tube de bactéries.
  - Transférer dans une cuve d'électroporation 1 mm.
  - Placer la cuve dans l'électroporateur, LAISSER LE CAPUCHON.
  - Appuyer sur « start ».
  - Noter les paramètres qui s'affichent pour le choc appliqué : tension et constante de temps
  - Sous PSM ajouter 1 ml de LB à température ambiante, SANS ANTIBIOTIQUES.
  - Incubation 1 à 2h, à 28°C sous agitation.
  - Etaler 50 et 500  $\mu\text{l}$  sur deux boîtes LBA + antibiotiques
  - Incuber 48h maximum à 28°C
  - Sélectionner et isoler 4 clones transformés sur de nouvelles boîtes LBA + antibiotiques (diviser la boîte en 4 quarts).
  - Effectuer l'analyse des clones par PCR ou digestion enzymatique.
  - Sélectionner un clone transformé pour le plasmide d'intérêt et en faire un stock glycérol
  - Placer le stock glycérol dans la banque à -80°C et remplir le fichier de suivi des souches

Rédigé ou révisé le : 10.07.2015

Par : Emilie VERGNE



Visa :

Vérifié le : 10.07.2015

Par : Aurélie Charrier



Visa :

Approuvé le : 10.07.2015

Par : Emilie VERGNE



Visa :

	<b>Institut de Recherche en Horticulture et Semences</b> <b>Centre INRA Angers-Nantes, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé</b>	<b>Ref :</b> IRHS-MO-RR-0310 <b>Version :</b> A <b>Date de création :</b> 13.03.15 <b>Page :</b> 1 sur 1
	<h1 style="color: green;">Glycerol stock de bactéries</h1>	

Réf: IRHS-T-0001/ Version: A / Date de création: 13/03/2015

<b>Objectif :</b>	Effectuer un stock glycérol d'une culture bactérienne d'intérêt
<b>Lieux :</b>	Laboratoires de bactériologie « OGM » et de biologie moléculaire
<b>Personnel habilité :</b>	Toute personne ayant pris connaissance des consignes de manipulation auprès de la personne compétente au sein de son équipe

**Référence : NA**

**Matériel :**

Matériel classique de biologie moléculaire et de bactériologie.

**Réactifs spécifiques et Solutions :**

- Glycerol 80%
- Milieu LB liquide
- antibiotiques

**Risques et sécurité : NA**

**Tri des déchets :**

Les « plastiques » (cônes, spatules et râtaux...) entrés en contact avec les bactéries compétentes doivent être jetés dans les poubelles déchets biologiques, la verrerie et les résidus de culture doivent être autoclavés.

**Organisation :**

Lancement d'une culture liquide avec les antibiotiques adéquats la veille ou 48h avant (agrobacterium), au moins 4 ml. Réserver le PSM.

**Méthodologie (sous PSM) :**

- Prélever 2 mL de culture liquide
- Centrifuger 1 min à 10000g à température ambiante.
- Eliminer le surnageant par pipetage
- Ajouter 2mL de culture liquide
- Centrifuger 1min à 10000g à température ambiante.
- Eliminer le surnageant par pipetage.
- Ajouter 800µL de milieu LB liquide et resuspendre le culot
- Ajouter 800µL de glycérol 80%
- Bien mélanger par pipetage
- Transférer dans un cryotube
- Annoter le tube selon la nomenclature suivante :
  - E.Coli (préciser la souche) OU Agro EHA105
  - Nom du vecteur-produit cloné
  - Initiales du manipulateur
  - Date de création du stock
  - Préciser le ou les antibiotiques
- Remplir le fichier de gestion des souches « STOCKS SOUCHES -80 °c EV A PARTIR DE 2014 » sur la partition (smb://angers2/irhs/irhsResPom/Transfroit/activites\_generales/souches-plasmides, 20séquences)
- Placer le tube dans la banque à -80°C, à l'emplacement correspondant au remplissage du fichier

Rédigé ou révisé le : 13.03.2015

Par : Aurélie Charrier

Visa : 

Vérifié le : 11.06.15

Par : Emilie Vergne

Visa : 

Approuvé le : 11.06.15

Par : Emilie Vergne

Visa : 

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aćimović, S. G., Zeng, Q., McGhee, G. C., Sundin, G. W., & Wise, J. C. (2015). Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00016>
- Abdellatef, E., Will, T., Koch, A., Imani, J., Vilcinskas, A., & Kogel, K. (2015). Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), 849–857. <https://doi.org/10.1111/pbi.12322>
- Alexander, C., & Rietschel, E. Th. (2001). Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research*, 7(3), 167–202. <https://doi.org/10.1177/09680519010070030101>
- Alhmedi, A., Bylemans, D., Bangels, E., & Beliën, T. (2022). Cultivar-mediated effects on apple–*Dysaphis plantaginea* interaction. *Journal of Pest Science*, 95(3), 1303–1315. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01460-6>
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., et al. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Alston, F. H., & Briggs, J. B. (1970). Inheritance of hypersensitivity to rosy aphid *Dysaphis plantaginea* in apple. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 12(2), 257–258. <https://doi.org/10.1139/g70-037>
- Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(9), 1593. <https://doi.org/10.1039/b414350g>
- Amiard, S., Charbonnel, C., Allain, E., Depeiges, A., White, C. I., & Gallego, M. E. (2010). Distinct roles of the ATR kinase and the *Mre11-Rad50-Nbs1* complex in the maintenance of chromosomal stability in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(9), 3020–3033. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078527>
- Asensio, J. L., Cañada, F. J., Siebert, H.-C., Laynez, J., Poveda, A., Nieto, P. M., et al. (2000). Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chemistry & Biology*, 7(7), 529–543. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00136-8)
- Ayers, A. R., Ayers, S. B., & Goodman, R. N. (1979). Extracellular polysaccharide of *Erwinia amylovora* : a correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(4), 659–666. <https://doi.org/10.1128/aem.38.4.659-666.1979>
- Baker, A. C., & Turner, W. F. (1916). *Rosy apple aphid*. Department of Agriculture.
- Baldo, A., Norelli, J. L., Farrell, R. E., Bassett, C. L., Aldwinckle, H. S., & Malnoy, M. (2010). Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus × domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-1>

- Barbieri, L., Battelli, M. G., & Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1154(3–4), 237–282. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(93\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0304-4157(93)90002-6)
- Barre, A., Van Damme, Ejm., Peumans, W. J., & Rouge, P. (1996). Structure-Function relationship of monocot mannose-binding Lectins. *Plant Physiology*, 112(4), 1531–1540. <https://doi.org/10.1104/pp.112.4.1531>
- Bauer-Panskus, A., Miyazaki, J., Kawall, K., & Then, C. (2020). Risk assessment of genetically engineered plants that can persist and propagate in the environment. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00301-0>
- Baulcombe, D. C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current opinion in plant biology*, 2(2), 109–113.
- Bayer, P. E., Valliyodan, B., Hu, H., Marsh, J. I., Yuan, Y., Vuong, T. D., et al. (2022). Sequencing the USDA core soybean collection reveals gene loss during domestication and breeding. *The Plant Genome*, 15(1), e20109. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20109>
- Bayot, R. G., & Ries, S. M. (1986). Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology*, 76(4), 441–445.
- Bellande, K., Bono, J.-J., Savelli, B., Jamet, E., & Canut, H. (2017). Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1164. <https://doi.org/10.3390/ijms18061164>
- Bernhard, F., Coplin, D. L., & Geider, K. (1993). A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to cps genes in *Erwinia stewartii*. *Molecular and General Genetics MGG*, 239(1–2), 158–168. <https://doi.org/10.1007/BF00281614>
- Berry, M. C., McGhee, G. C., Zhao, Y., & Sundin, G. W. (2009). Effect of a *waaL* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Letters*, 291(1), 80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01438.x>
- Bertaux, C., Daelemans, D., Meertens, L., Cormier, E. G., Reinus, J. F., Peumans, W. J., et al. (2007). Entry of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus is selectively inhibited by carbohydrate-binding agents but not by polyanions. *Virology*, 366(1), 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.008>
- Bewley, C. A. (2001). Solution Structure of a Cyanovirin-N:Man<sub>1</sub>-2Man<sub>2</sub> Complex: Structural Basis for High-Affinity Carbohydrate-Mediated Binding to gp120.
- Blommers, L. H. M., Helsen, H. H. M., & Vaal, F. W. N. M. (2004). Life history data of the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea* (Pass.) (Homopt., Aphididae) on plantain and as migrant to apple. *Journal of Pest Science*, 77(3). <https://doi.org/10.1007/s10340-004-0046-5>
- Bockus, W. W., Appel, J. A., Bowden, R. L., Fritz, A. K., Gill, B. S., Martin, T. J., et al. (2001). Success Stories: Breeding for Wheat Disease Resistance in Kansas. *Plant Disease*, 85(5), 453–461. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.5.453>

- Bocsanczy, A. M., Nissinen, R. M., Oh, C., & Beer, S. V. (2008). HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 425–434. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00471.x>
- Bodelot, A., Chavonet, E., Brisset, M. N., Dousset, N., Ravon, E., Heintz, C., et al. (2023). Overexpression of an apple broad range agglutinating lectin does not promote *in planta* resistance to fire blight and bacterial wilt. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01479-x>
- Bogdanove, A. J., Kim, J. F., Wei, Z., Kolchinsky, P., Charkowski, A. O., Conlin, A. K., et al. (1998). Homology and functional similarity of an *hrp*-linked pathogenicity locus, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avrE* of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 1325–1330. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1325>
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C., & Geider, K. (1998). Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*®, 88(5), 416–421. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.5.416>
- Bonasera, J. M., Kim, J. F., & Beer, S. V. (2006). PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-23>
- Botos, I., O’Keefe, B. R., Shenoy, S. R., Cartner, L. K., Ratner, D. M., Seeberger, P. H., et al. (2002). Structures of the complexes of a potent Anti-HIV protein cyanovirin-N and high mannose oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34336–34342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205909200>
- Boureau, T., Siamer, S., Perino, C., Gaubert, S., Patrit, O., Degrave, A., et al. (2011). The HrpN effector of *Erwinia amylovora*, which is involved in type III translocation, contributes directly or indirectly to callose elicitation on apple leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 24(5), 577–584. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0212>
- Boyd, M. R., Gustafson, K. R., McMahon, J. B., Shoemaker, R. H., O’Keefe, B. R., Mori, T., et al. (1997). Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1521–1530. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1521>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
- Brar, D., & Virk, P. (2010). How a modern rice variety is bred. *Rice Today*, 9(1), 11–2.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., & Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6–7), 524–538. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.04.001>
- Brisset, M.-N., Bernonville, T. D. D., & Loire, S.-S. (2011). (54) Device for determining or studying.
- Broggini, G. A. L., Wöhner, T., Fahrentrapp, J., Kost, T. D., Flachowsky, H., Peil, A., et al. (2014). Engineering fire blight resistance into the apple cultivar ‘Gala’ using the *FB\_MR5* CC-NBS-LRR

- resistance gene of *Malus × robusta* 5. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 728–733. <https://doi.org/10.1111/pbi.12177>
- Buendia, L., Girardin, A., Wang, T., Cottret, L., & Lefebvre, B. (2018). LysM receptor-like kinase and LysM receptor-like protein families: An update on phylogeny and functional characterization. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01531>
- Bugert, P., & Geider, K. (1995). Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Molecular Microbiology*, 15(5), 917–933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02361.x>
- Bürger, J., Darmency, H., Granger, S., Guyot, S. H. M., Messéan, A., & Colbach, N. (2015). Simulation study of the impact of changed cropping practices in conventional and GM maize on weeds and associated biodiversity. *Agricultural Systems*, 137, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2015.03.009>
- Burrows, P. R., Barker, A. D. P., Newell, C. A., & Hamilton, W. D. O. (1998). Plant-derived enzyme inhibitors and lectins for resistance against plant-parasitic nematodes in transgenic crops. *Pesticide Science*, 52(2), 176–183. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199802\)52:2<176::AID-PS680>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199802)52:2<176::AID-PS680>3.0.CO;2-T)
- Burse, A., Weingart, H., & Ullrich, M. S. (2004). The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 17(1), 43–54. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.43>
- Büttner, D., & He, S. Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, 150(4), 1656–1664. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>
- Cahenzli, F., Sigsgaard, L., Daniel, C., Herz, A., Jamar, L., Kelderer, M., et al. (2019). Perennial flower strips for pest control in organic apple orchards - A pan-European study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 278, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.03.011>
- Calenge, F., Drouet, D., Denancé, C., Van de Weg, W. E., Brisset, M.-N., Paulin, J.-P., & Durel, C.-E. (2005). Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(1), 128–135. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2002-z>
- Canty, A. (2021). Ripley B. boot: Bootstrap R (S-Plus) functions. 2020. R package version 1.3–27.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C. T., Jedrzejczak, R. P., Joachimiak, A., & Stacey, G. (2014). The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife*, 3, e03766. <https://doi.org/10.7554/eLife.03766>
- Caroff, M., & Novikov, A. (2019). LPS structure, function, and heterogeneity. In K. L. Williams (Ed.), *Endotoxin Detection and Control in Pharma, Limulus, and Mammalian Systems* (pp. 53–93). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-17148-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-17148-3_3)
- Carotenuto, G., Chabaud, M., Miyata, K., Capozzi, M., Takeda, N., Kaku, H., et al. (2017). The rice LysM receptor-like kinase *Os* CERK 1 is required for the perception of short-chain chitin oligomers in

arbuscular mycorrhizal signaling. *New Phytologist*, 214(4), 1440–1446.  
<https://doi.org/10.1111/nph.14539>

- Carretero, C. L., Cantos, M., García, J. L., & Troncoso, A. (2007). In vitro–ex vitro salt (NaCl) tolerance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(4), 364–369. <https://doi.org/10.1007/s11627-006-9022-5>
- Carrizo, M. E., Capaldi, S., Perduca, M., Irazoqui, F. J., Nores, G. A., & Monaco, H. L. (2005). The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10614–10623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411989200>
- Cesbron, S., Paulin, J.-P., Tharaud, M., Barny, M.-A., & Brisset, M.-N. (2006). The alternative  $\sigma$  factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 257(2), 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00172.x>
- Charrier, A., Vergne, E., Dousset, N., Richer, A., Petiteau, A., & Chevreau, E. (2019). Efficient targeted mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 System. *Frontiers in Plant Science*, 10, 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>
- Chavonet, E., Gaucher, M., Warneys, R., Bodelot, A., Heintz, C., Juillard, A., et al. (2022). Search for host defense markers uncovers an apple agglutination factor corresponding with fire blight resistance. *Plant Physiology*, 188(2), 1350–1368. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab542>
- Checker, V. G., Kushwaha, H. R., Kumari, P., & Yadav, S. (2018). Role of phytohormones in plant defense: signaling and cross talk. In A. Singh & I. K. Singh (Eds.), *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 159–184). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_7)
- Chen, A.-S., Taguchi, T., Okamoto, H., Danjo, K., Sakai, K., Matahira, Y., et al. (2005). Pharmacokinetics of chitobiose and chitotriose administered intravenously or orally to rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(3), 545–548. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.545>
- Cheng, X., Wu, Y., Guo, J., Du, B., Chen, R., Zhu, L., & He, G. (2013). A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. *The Plant Journal*, 76(4), 687–698. <https://doi.org/10.1111/tpj.12328>
- Chizzali, C., Gaid, M. M., Belkheir, A. K., Hänsch, R., Richter, K., Flachowsky, H., et al. (2012a). Differential expression of biphenyl synthase gene family members in fire-blight-infected apple ‘Holsteiner Cox.’ *Plant Physiology*, 158(2), 864–875. <https://doi.org/10.1104/pp.111.190918>
- Chizzali, C., Khalil, M. N. A., Beuerle, T., Schuehly, W., Richter, K., Flachowsky, H., et al. (2012b). Formation of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins in the transition zones of fire blight-infected stems of *Malus domestica* cv. ‘Holsteiner Cox’ and *Pyrus communis* cv. ‘Conference.’ *Phytochemistry*, 77, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.01.023>

- Choi, H. J., Kim, Y. J., & Park, D. H. (2022). Extended longevity of *Erwinia amylovora* vectored by honeybees under in vitro conditions and its capacity for dissemination. *Plant Pathology*, 71(3), 762–771. <https://doi.org/10.1111/ppa.13489>
- Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 16(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>
- Commission Européenne, Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16, Commission staff working document (2021) [SWD\(2021\) 92 final](#)
- Commission Européenne, Proposition de RÈGLEMENT DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL concernant les végétaux obtenus au moyen de certaines nouvelles techniques génomiques et les denrées alimentaires et aliments pour animaux qui en sont dérivés, et modifiant le règlement (UE) 2017/625, (2023) [2023/0226 \(COD\)](#)
- Cornille, A., Giraud, T., Smulders, M. J. M., Roldán-Ruiz, I., & Gladieux, P. (2014). The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends in Genetics*, 30(2), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.10.002>
- Cristofolletti, P. T., Mendonça de Sousa, F. A., Rahbé, Y., & Terra, W. R. (2006). Characterization of a membrane-bound aminopeptidase purified from *Acyrtosiphon pisum* midgut cells: A major binding site for toxic mannose lectins. *FEBS Journal*, 273(24), 5574–5588. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05547.x>
- Cross, J. V., Cubison, S., Harris, A., & Harrington, R. (2007). Autumn control of rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Passerini), with aphicides. *Crop Protection*, 26(8), 1140–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.10.007>
- Dall’Agata, M., Pagliarani, G., Padmarasu, S., Troglio, M., Bianco, L., Dapena, E., et al. (2018). Identification of candidate genes at the Dp-fl locus conferring resistance against the rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea*. *Tree Genetics & Genomes*, 14(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1227-3>
- Dang, L., Rougé, P., & Van Damme, E. J. M. (2017). Amaranthin-like proteins with aerolysin domains in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1368. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01368>
- Davison, A. C., & Hinkley, D. V. (1997). *Bootstrap methods and their application*. Cambridge ; New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- De Coninck, T., & Van Damme, E. J. M. (2021). Review: The multiple roles of plant lectins. *Plant Science*, 313, 111096. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111096>
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M. P., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., et al. (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 18(9), 923–937. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0923>
- DeRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.-B., Nomura, K., & He, S. Y. (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), 9927–9932.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0401601101>

- Degrave, A., Siamer, S., Boureau, T., & Barny, M.-A. (2015). The AvrE superfamily: ancestral type III effectors involved in suppression of pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: The AvrE superfamily of type III effectors. *Molecular Plant Pathology*, 16(8), 899–905.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.12237>
- Dellagi, A., Brisset, M.-N., Paulin, J.-P., & Expert, D. (1998). Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 11(8), 734–742.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.8.734>
- Delorme, R., Auge, D., Touton, P., & Villatte, F. (1997). Insecticide resistance in *Dysaphis plantaginea* in France. (pp. 45–52). Presented at the Fourth international conference on pests in agriculture, 6-7-8 January 1997, le Corum, Montpellier, France, Volume 1., Association Nationale pour la Protection des Plantes (ANPP).
- Delporte, A., Holle, S., Lannoo, N., & Van Damme, E. (2015). The tobacco lectin, prototype of the family of nictaba-related proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 16(1), 5–16.  
<https://doi.org/10.2174/1389203716666150213154107>
- DeYoung, B. J., & Innes, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology*, 7(12), 1243–1249. <https://doi.org/10.1038/ni1410>
- Dhugga, K. S. (2022). Gene editing to accelerate crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, 13, 889995.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.889995>
- Din, S. ud, Azam, S., Rao, A. Q., Shad, M., Ahmed, M., Gul, A., et al. (2021). Development of broad-spectrum and sustainable resistance in cotton against major insects through the combination of Bt and plant lectin genes. *Plant Cell Reports*, 40(4), 707–721. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02669-6>
- Döring, T. F., & Chittka, L. (2007). Visual ecology of aphids—a critical review on the role of colours in host finding. *Arthropod-Plant Interactions*, 1(1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11829-006-9000-1>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dow, J. M., Osbourn, A. E., Wilson, T. G., & Daniels, M. J. (1995). A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 8(5), 768–777.
- Dreher, K., Morris, M., Khairallah, M., Ribaut, J.-M., Pandey, S., & Srinivasan, G. (2009). Is marker-assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods.
- Dugé De Bernonville, T., Gaucher, M., Flors, V., Gaillard, S., Paulin, J.-P., Dat, J. F., & Brisset, M.-N. (2012). T3SS-dependent differential modulations of the jasmonic acid pathway in susceptible and resistant genotypes of *Malus* spp. challenged with *Erwinia amylovora*. *Plant Science*, 188–189, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.02.009>

- Dugé de Bernonville, T., Guyot, S., Paulin, J.-P., Gaucher, M., Loufrani, L., Henrion, D., et al. (2010). Dihydrochalcones: implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry*, 71(4), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.11.004>
- Durel, C.-E., Denancé, C., & Brisset, M.-N. (2009). Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes ‘Evereste’ and *Malus floribunda* clone 821. *Genome*, 52(2), 139–147. <https://doi.org/10.1139/G08-111>
- Ebinuma, H., & Komamine, A. (2001). Mat (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(2), 103–113. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0021-2>
- Elieh Ali Komi, D., Sharma, L., & Dela Cruz, C. S. (2018). Chitin and its effects on inflammatory and immune responses. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 54(2), 213–223. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8600-0>
- Ellis, R. J. (1979). The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, 4(11), 241–244. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90212-3)
- Emeriewen, O. F., Flachowsky, H., & Peil, A. (2021). Characterization of genomic DNA sequence of the candidate gene for FB\_Mfu10 associated with fire blight resistance in *Malus* species. *BMC Research Notes*, 14(1), 291. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05709-2>
- Emeriewen, O. F., Richter, K., Hanke, M.-V., Malnoy, M., & Peil, A. (2015). The fire blight resistance QTL of *Malus fusca* (*Mfu10*) is affected but not broken down by the highly virulent Canadian *Erwinia amylovora* strain E2002A. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), 631–635. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0565-8>
- Emeriewen, O. F., Richter, K., Piazza, S., Micheletti, D., Broggini, G. A. L., Berner, T., et al. (2018). Towards map-based cloning of *FB\_Mfu10*: identification of a receptor-like kinase candidate gene underlying the *Malus fusca* fire blight resistance locus on linkage group 10. *Molecular Breeding*, 38(8), 106. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0863-5>
- Emeriewen, O. F., Wöhner, T., Flachowsky, H., & Peil, A. (2019). *Malus* hosts–*Erwinia amylovora* interactions: strain pathogenicity and resistance mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 10, 551. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00551>
- European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection & European Commission. Joint Research Centre. Institute for Prospective Technological Studies. (2011). *New plant breeding techniques: state-of-the-art and prospects*. LU: Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2791/60346>. Accessed 20 September 2023.
- Fahrentrapp, J., Broggini, G. A. L., Kellerhals, M., Peil, A., Richter, K., Zini, E., & Gessler, C. (2013). A candidate gene for fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 is coding for a CC–NBS–LRR. *Tree Genetics & Genomes*, 9(1), 237–251. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0550-3>

- Faize, M., Malnoy, M., Dupuis, F., Chevalier, M., Parisi, L., & Chevreau, E. (2003). Chitinases of *Trichoderma atroviride* Induce Scab Resistance and Some Metabolic Changes in Two Cultivars of Apple. *Phytopathology*®, 93(12), 1496–1504. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.12.1496>
- FAO, (2004) *La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture 2003-04*. (2004). Rome: FAO.
- FAO, (2022). *The State of Food Security and Nutrition in the World 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0639en>
- Fenning, T. M., & Gershenzon, J. (2002). Where will the wood come from? Plantation forests and the role of biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 20(7), 291–296. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01983-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01983-2)
- Fisher, D. B., Wright, J. P., & Mittler, T. E. (1984). Osmoregulation by the aphid *Myzus persicae*: A physiological role for honeydew oligosaccharides. *Journal of Insect Physiology*, 30(5), 387–393. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(84\)90096-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(84)90096-9)
- Fitches, E., Wiles, D., Douglas, A. E., Hinchliffe, G., Audsley, N., & Gatehouse, J. A. (2008). The insecticidal activity of recombinant garlic lectins towards aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10), 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.07.002>
- Flachowsky, H., Riedel, M., Reim, S., & Hanke, M.-V. (2008). Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol11-issue1-fulltext-10>
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- Fouquaert, E. (2008). *Identification and molecular characterization of mannose-binding nucleocytoplasmic plant and fungal lectins* (Doctoral dissertation, PhD thesis).
- Fouquaert, E., Peumans, W. J., Smith, D. F., Proost, P., Savvides, S. N., & Van Damme, E. J. M. (2008). The “old” *Euonymus europaeus* agglutinin represents a novel family of ubiquitous plant proteins. *Plant Physiology*, 147(3), 1316–1324. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116764>
- Fulton, T. M., Chunwongse, J., & Tanksley, S. D. (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13(3), 207–209. <https://doi.org/10.1007/BF02670897>
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Boot, R. G., et al. (2002). Structure of human chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25537–25544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201636200>
- Gadaleta, A., Giancaspro, A., Blechl, A. E., & Blanco, A. (2008). A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1Dy10. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.11.005>
- García-Almodóvar, R. C., Clemente-Moreno, M. J., Díaz-Vivancos, P., Petri, C., Rubio, M., Padilla, I. M. G., et al. (2015). Greenhouse evaluation confirms *in vitro* sharka resistance of genetically engineered h-

- UTR/P1 plum plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(2), 791–796. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0629-7>
- Gaucher, M., Dugé de Bernonville, T., Guyot, S., Dat, J. F., & Brisset, M.-N. (2013). Same ammo, different weapons: Enzymatic extracts from two apple genotypes with contrasted susceptibilities to fire blight (*Erwinia amylovora*) differentially convert phloridzin and phloretin in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.012>
- Gaucher, M., Righetti, L., Aubourg, S., Dugé de Bernonville, T., Brisset, M.-N., Chevreau, E., & Vergne, E. (2022a). An *Erwinia amylovora* inducible promoter for improvement of apple fire blight resistance. *Plant Cell Reports*, 41(7), 1499–1513. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02869-8>
- Gaucher, M., Heintz, C., Cournol, R., Juillard, A., Bellevaux, C., Cavaignac, S., et al. (2022b). The use of potassium phosphonate (KHP) for the control of major apple pests. *Plant Disease*, 106(12), 3166–3177. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0183-RE>
- Gayder, S., Kammerecker, S., & Fieseler, L. (2023). Biological control of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* using bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01478-y>
- Geider, K. (2000). Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. In J. L. Vanneste (Ed.), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. (1st ed., pp. 117–140). UK: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851992945.0117>
- Geider, K. (2006). Twenty years of molecular genetics with *Erwinia amylovora*: answers and new questions about EPS-synthesis and other virulence factors. *Acta Horticulturae*, (704), 397–402. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.62>
- Geier, G., & Geider, K. (1993). Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42(6), 387–404.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Gómez, G., Torres, H., & Pallás, V. (2004). Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system: RNA-binding phloem proteins from melon. *The Plant Journal*, 41(1), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02278.x>
- Gouhier-Darimont, C., Schmiesing, A., Bonnet, C., Lassueur, S., & Reymond, P. (2013). Signalling of *Arabidopsis thaliana* response to *Pieris brassicae* eggs shares similarities with PAMP-triggered immunity. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 665–674. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers362>
- Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H. D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., et al. (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in

- Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32338–32348.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704886200>
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M., & Nürnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science*, 17(8), 495–502.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.003>
- Habert, R., & Chevalier, N. (2021). Les perturbateurs endocriniens : définitions, sources et enjeux: *Actualité et dossier en santé publique*, N° 115(3), 13–22. <https://doi.org/10.3917/aedesp.115.0013>
- Haesaert, G., Vossen, J. H., Custers, R., De Loose, M., Haverkort, A., Heremans, B., et al. (2015). Transformation of the potato variety Desiree with single or multiple resistance genes increases resistance to late blight under field conditions. *Crop Protection*, 77, 163–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.018>
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., & Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 25(6), 989–994.  
<https://doi.org/10.1007/BF00014672>
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 285–302.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>
- Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I. J., & Wright, C. S. (1995). Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2(6), 472–479. <https://doi.org/10.1038/nsb0695-472>
- Hoehn, H., Graf, B., & Hoepfli, H. (2003). Control of rosy apple aphid (*Dysaphis plantaginea*) in fall—preliminary results. *IOBC WPRS BULLETIN*, 26(11), 59–64.
- Holst, O., Ulmer, A. J., Brade, H., Flad, H.-D., & Rietschel, E. T. (1996). Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.
- Hopkins, T. L., & Harper, M. S. (2001). Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(2), 100–109. <https://doi.org/10.1002/arch.1040>
- Huet, G. (2014). Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00715>
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2022). *Climate Change 2022 – Impacts, Adaptation and Vulnerability: Working Group II Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (1st ed.). Cambridge University Press.  
<https://doi.org/10.1017/9781009325844>
- Jiang, J.-F., Xu, Y.-Y., & Chong, K. (2007). Overexpression of OsJAC1, a lectin gene, suppresses the coleoptile and stem elongation in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 230–237.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00428.x>

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jolly, L., Gouleau, A., Bakan, B., Bertoux, V., Cordeau, S., Enjalbert, J., et al. (2022). Saisine du Comité Scientifique CTPS.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, A. L., & Schnabel, E. L. (2000). The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, 235–251.
- Joshi, S. G., Schaart, J. G., Groenwold, R., Jacobsen, E., Schouten, H. J., & Krens, F. A. (2011). Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology*, 75(6), 579–591. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9749-1>
- Kachadourian, R., Dellagi, A., Laurent, J., Bricard, L., Kunesch, G., & Expert, D. (1996). Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP1430: cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR. *Biometals*, 9(2). <https://doi.org/10.1007/BF00144619>
- Kanrar, S., Venkateswari, J. C., Kirti, P. B., & Chopra, V. L. (2002). Transgenic expression of hevein, the rubber tree lectin, in Indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*. *Plant Science*, 162(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00588-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00588-X)
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Takahashi, Y., Berberich, T., Ito, A., Kamoun, S., & Terauchi, R. (2008). NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta*, 228(6), 977–987. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0797-y>
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Kassambara, A. (2020). ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots. R package version 0.4. 0.
- Kaur, A., Kaur, S., Kaur, A., Kaur Sarao, N., & Sharma, D. (2022). Pathogenesis-related proteins and their transgenic expression for developing disease-resistant crops: strategies progress and challenges. In *Plant Breeding - New Perspectives [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106774>
- Kaur, N., Dhuna, V., Kamboj, S. S., Agrewala, J., & Singh, J. (2006). A novel antiproliferative and antifungal lectin from *Amaranthus viridis* linn seeds. *Protein & Peptide Letters*, 13(9), 897–905. <https://doi.org/10.2174/092986606778256153>
- Kharadi, R. R., Schachterle, J. K., Yuan, X., Castiblanco, L. F., Peng, J., Slack, S. M., et al. (2021). Genetic dissection of the *Erwinia amylovora* disease cycle. *Annual Review of Phytopathology*, 59(1), 191–212. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-095540>

- Klumpp, J., Dunne, M., & Loessner, M. J. (2023). A perfect fit: bacteriophage receptor-binding proteins for diagnostic and therapeutic applications. *Current Opinion in Microbiology*, *71*, 102240. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102240>
- Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao, Y., & Sundin, G. W. (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology*, *99*(11), 1237–1244. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-11-1237>
- Kost, T. D., Gessler, C., Jansch, M., Flachowsky, H., Patocchi, A., & Broggini, G. A. L. (2015). development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *PLOS ONE*, *10*(12), e0143980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143980>
- Krens, F. A., Schaart, J. G., van der Burgh, A. M., Tinnenbroek-Capel, I. E. M., Groenwold, R., Kodde, L. P., et al. (2015). Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Frontiers in Plant Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00286>
- Kruijt, M., De Kock, M. J. D., & De Wit, P. J. G. M. (2005). Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular Plant Pathology*, *6*(1), 85–97. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00264.x>
- Labbé, J., Muchero, W., Czarnecki, O., Wang, J., Wang, X., Bryan, A. C., et al. (2019). Mediation of plant–mycorrhizal interaction by a lectin receptor-like kinase. *Nature Plants*, *5*(7), 676–680. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0469-x>
- Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume lectins: proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
- Lal, J. P., & Tomer, A. K. (2009). Genetic enhancement of lentil (*Lens culinaris* Medikus) for drought tolerance through induced mutations. *Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 151–154.
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *48*(1), 251–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>
- Lannoo, N., & Van Damme, E. J. M. (2010). Nucleocytoplasmic plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1800*(2), 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.021>
- Lee, J., Chin, J. H., Ahn, S. N., & Koh, H.-J. (2015). Brief history and perspectives on plant breeding. In H.-J. Koh, S.-Y. Kwon, & M. Thomson (Eds.), *Current Technologies in Plant Molecular Breeding* (pp. 1–14). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9996-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9996-6_1)
- Lerouge, I., & Vanderleyden, J. (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(1), 17–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x>
- Leybourne, D. J., Preedy, K. F., Valentine, T. A., Bos, J. I. B., & Karley, A. J. (2021). Drought has negative consequences on aphid fitness and plant vigor: Insights from a meta-analysis. *Ecology and Evolution*, *11*(17), 11915–11929. <https://doi.org/10.1002/ece3.7957>

- Li, B., Li, Y., Qiu, M., Dong, H., Li, X., Liu, X., et al. (2022). *OsSRK1, a Lectin receptor-like kinase, controls plant height by mediating internode elongation in Oryza sativa L.* (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2179218/v1>
- Li, H.-M., Sun, L., Mittapalli, O., Muir, W. M., Xie, J., Wu, J., et al. (2009). Transcriptional signatures in response to wheat germ agglutinin and starvation in *Drosophila melanogaster* larval midgut. *Insect Molecular Biology*, 18(1), 21–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00844.x>
- Li, Y., Li, W., & Li, J. (2021). The CRISPR/Cas9 revolution continues: From base editing to prime editing in plant science. *Journal of Genetics and Genomics*, 48(8), 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.05.001>
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B., & Mezzetti, B. (2017). New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1418. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01418>
- Linthorst, H. J. M., & Van Loon, L. C. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(2), 123–150. <https://doi.org/10.1080/07352689109382309>
- Liu, Lu, Liu, J., & Xu, N. (2023). Ligand recognition and signal transduction by lectin receptor-like kinases in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1201805. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1201805>
- Liu, Lun, Zhang, J., Xu, J., Li, Y., Guo, L., Wang, Z., et al. (2020). CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of SILBD40, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato. *Plant Science*, 301, 110683. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110683>
- Lu, H., Luo, T., Fu, H., Wang, L., Tan, Y., Huang, J., et al. (2018). Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis. *Nature Plants*, 4(6), 338–344. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0152-7>
- Luo, F., Evans, K., Norelli, J. L., Zhang, Z., & Peace, C. (2020). Prospects for achieving durable disease resistance with elite fruit quality in apple breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 16(1), 21. <https://doi.org/10.1007/s11295-020-1414-x>
- Luo, X., Xu, N., Huang, J., Gao, F., Zou, H., Boudsocq, M., et al. (2017). A lectin receptor-like kinase mediates pattern-triggered salicylic acid Signaling. *Plant Physiology*, 174(4), 2501–2514. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00404>
- Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., & Rodriguez-Cerezo, E. (2011). *New plant breeding techniques: state-of-the-art and prospects for commercial development*. Luxembourg: Publications Office.
- Ma, L., Haile, Z. M., Sabbadini, S., Mezzetti, B., Negrini, F., & Baraldi, E. (2023). Functional characterization of *MANNANOSE-BINDING LECTIN 1*, a G-type lectin gene family member, in response to fungal pathogens of strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 74(1), 149–161. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac396>
- Ma, Q.-H., Zhen, W.-B., & Liu, Y.-C. (2013). Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance. *Biochimie*, 95(2), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.014>

- Macedo, M. L. R., Freire, M. das G. M., da Silva, M. B. R., & Coelho, L. C. B. B. (2007). Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 486–498. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.020>
- Madden, L. V., Hughes, G., & Van Den Bosch, F. (2007). *The study of plant disease epidemics*.
- Maeda, S., Ackley, W., Yokotani, N., Sasaki, K., Ohtsubo, N., Oda, K., & Mori, M. (2023). Enhanced resistance to fungal and bacterial diseases due to overexpression of *BSR1*, a Rice RLCK, in sugarcane, tomato, and torenia. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3644. <https://doi.org/10.3390/ijms24043644>
- Malabarba, J., Chevreau, E., Dousset, N., Veillet, F., Moizan, J., & Vergne, E. (2020). New strategies to overcome present CRISPR/Cas9 limitations in apple and pear: efficient dechimerization and base editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 319. <https://doi.org/10.3390/ijms22010319>
- Mammadov, J., Aggarwal, R., Buyyarapu, R., & Kumpatla, S. (2012). SNP markers and their impact on plant breeding. *International Journal of Plant Genomics*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/728398>
- Manova, V., & Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00885>
- Marolleau, B., Gaucher, M., Heintz, C., Degrave, A., Warneys, R., Orain, G., et al. (2017). When a plant resistance inducer leaves the lab for the field: integrating ASM into routine apple protection practices. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1938. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01938>
- Meins, F. (2000). RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. In M. A. Matzke & A. J. M. Matzke (Eds.), *Plant Gene Silencing* (pp. 141–153). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4183-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4183-3_10)
- Metzger, M., Bellemann, P., Bugert, P., & Geider, K. (1994). Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 450–459. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.450-459.1994>
- Miles, P. W. (2007). Aphid saliva. *Biological Reviews*, 74(1), 41–85. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00181.x>
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1–2), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.005>
- Mongkolrob, R., Taweechaisupapong, S., & Tungpradabkul, S. (2015). Correlation between biofilm production, antibiotic susceptibility and exopolysaccharide composition in *Burkholderia pseudomallei* bps I, *ppk*, and *rpo S* mutant strains: Biofilm components and drug resistance. *Microbiology and Immunology*, 59(11), 653–663. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12331>

- Moosa, A., Farzand, A., Sahi, S. T., & Khan, S. A. (2017). Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi – 15 years of success. *Israel Journal of Plant Sciences*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/07929978.2017.1288407>
- Morel, A., Peeters, N., Vailleau, F., Barberis, P., Jiang, G., Berthomé, R., & Guidot, A. (2018). Plant pathogenicity phenotyping of *Ralstonia solanacearum* Strains. In C. Medina & F. J. López-Baena (Eds.), *Host-Pathogen Interactions* (Vol. 1734, pp. 223–239). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_18)
- Morel, J.-B., Mourrain, P., Béclin, C., & Vaucheret, H. (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis. *Current Biology*, 10(24), 1591–1594. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00862-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00862-9)
- Morgan, J., & Richards, A. (2003). The new book of apples brogdale horticultural trust.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mysore, K. S., & Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.12.005>
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., et al. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 34–41. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.34>
- Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Kuno, A., & Hirabayashi, J. (2006). Evidence that Agaricus bisporus agglutinin (ABA) has dual sugar-binding specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(1), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.073>
- Nalam, V., Louis, J., & Shah, J. (2019). Plant defense against aphids, the pest extraordinaire. *Plant Science*, 279, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.027>
- Nimtz, M., Mort, A., Domke, T., Wray, V., Zhang, Y., Qiu, F., et al. (1996). Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydrate Research*, 287(1), 59–76. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00070-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00070-5)
- Nissinen, R. M., Ytterberg, A. J., Bogdanove, A. J., Van Wijk, K. J., & Beer, S. V. (2007). Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), 55–67. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00370.x>
- Nsimba-Lubaki, M., & Peumans, W. J. (1986). Seasonal fluctuations of lectins in barks of Elderberry (*Sambucus nigra*) and Black Locust (*Robinia pseudoacacia*). *Plant Physiology*, 80(3), 747–751. <https://doi.org/10.1104/pp.80.3.747>
- Ogata, T., Ishizaki, T., Fujita, M., & Fujita, Y. (2020). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *OsERA1* confers enhanced responses to abscisic acid and drought stress and increased primary root growth under

- nonstressed conditions in rice. *PLOS ONE*, 15(12), e0243376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243376>
- Oh, C.-S., & Beer, S. V. (2005). Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.051>
- Okuzaki, A., Ogawa, T., Koizuka, C., Kaneko, K., Inaba, M., Imamura, J., & Koizuka, N. (2018). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.025>
- Pacak, F., & Kocourek, J. (1975). Studies on ptohemagglutinins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 374-386.
- Pallas, V., & Gómez, G. (2013). Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00130>
- Parker, M. W., van der Goot, F. G., & Buckley, J. T. (1996). Aerolysin - the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Molecular Microbiology*, 19(2), 205–212. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.355887.x>
- Parravicini, G., Gessler, C., Denancé, C., Lasserre-Zuber, P., Vergne, E., Brisset, M.-N., et al. (2011). Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar ‘Evereste’: Candidate fire blight resistance genes. *Molecular Plant Pathology*, 12(5), 493–505. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00690.x>
- Passricha, N., Saifi, S. K., Kharb, P., & Tuteja, N. (2020). Rice lectin receptor-like kinase provides salinity tolerance by ion homeostasis. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(2), 498–510. <https://doi.org/10.1002/bit.27216>
- Patel, R. (2013). The long green revolution. *Journal of Peasant Studies*, 40(1), 1–63. <https://doi.org/10.1080/03066150.2012.719224>
- Patil, A., Taware, S., & Rao, V. (2009). Development of a high oleic soybean mutant and its stability across the environments (p. 200-202). Presented at the Induced plant mutations in the genomics era. Proceedings of an International Joint FAO/IAEA Symposium. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J., & Ryan, C. A. (2001). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*, 411(6839), 817–820. <https://doi.org/10.1038/35081107>
- Pedras, M. S. C., & Yaya, E. E. (2015). Plant chemical defenses: are all constitutive antimicrobial metabolites phytoanticipins? *Natural Product Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000142>
- Peil, A., Garcia-Libreros, T., Richter, K., Trognitz, F. C., Trognitz, B., Hanke, M.-V., & Flachowsky, H. (2007). Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breeding*, 126(5), 470–475. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01408.x>

- Peil, Andreas, Emeriewen, O. F., Khan, A., Kostick, S., & Malnoy, M. (2021). Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *Journal of Plant Pathology*, *103*(S1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00581-8>
- Peiris, R., Wickramasinghe, T., & Indrasena, S. (2008). M 127—a promising tomato variety developed through induced mutation technique (pp. 379–380). Presented at the Induced plant mutations in the genomics era. Proceedings of an International Joint FAO/IAEA Symposium. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Peraro, M. D., & van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(1), 180–201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>
- Petryniak, J., & Goldstein, I. J. (1986). Immunochemical studies on the interaction between synthetic glycoconjugates and  $\alpha$ -L-fucosyl binding lectins. *Biochemistry*, *25*(10), 2829–2838. <https://doi.org/10.1021/bi00358a014>
- Peumans, W. J., Fouquaert, E., Jauneau, A., Rougé, P., Lannoo, N., Hamada, H., et al. (2007). The liverwort *Marchantia polymorpha* expresses orthologs of the fungal *Agaricus bisporus* agglutinin family. *Plant Physiology*, *144*(2), 637–647. <https://doi.org/10.1104/pp.106.087437>
- Peumans, W. J., & Hause, B. (2000). The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Letters*.
- Peumans, W. J., & Van Damme, E. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, *109*(2), 347.
- Pompili, V., Dalla Costa, L., Piazza, S., Pindo, M., & Malnoy, M. (2020). Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnology Journal*, *18*(3), 845–858. <https://doi.org/10.1111/pbi.13253>
- Powell, G., Tosh, C. R., & Hardie, J. (2006). Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annual Review of Entomology*, *51*(1), 309–330. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151107>
- Powell, K. S., Spence, J., Bharathi, M., Gatehouse, J. A., & Gatehouse, A. M. R. (1998). Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Journal of Insect Physiology*, *44*(7–8), 529–539. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00054-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00054-7)
- Puchta, H. (2004). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri025>
- Puchta, Holger, & Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal*, *78*(5), 727–741. <https://doi.org/10.1111/tpj.12338>
- Pyott, D. E., Sheehan, E., & Molnar, A. (2016). Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants: CRISPR/Cas9-induced potyvirus resistance. *Molecular Plant Pathology*, *17*(8), 1276–1288. <https://doi.org/10.1111/mpp.12417>

- Qubbaj, T., Reineke, A., & Zebitz, C. P. W. (2005). Molecular interactions between rosy apple aphids, *Dysaphis plantaginea*, and resistant and susceptible cultivars of its primary host *Malus domestica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1), 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00255.x>
- Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y. A., et al. (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology*, 16(4), 426–433. <https://doi.org/10.1038/ni.3124>
- Rawat, N., Pumphrey, M. O., Liu, S., Zhang, X., Tiwari, V. K., Ando, K., et al. (2016). Wheat *Fhb1* encodes a chimeric lectin with agglutinin domains and a pore-forming toxin-like domain conferring resistance to Fusarium head blight. *Nature Genetics*, 48(12), 1576–1580. <https://doi.org/10.1038/ng.3706>
- Reidling, J. C., Miller, M. A., & Steele, R. E. (2000). Sweet Tooth, a novel receptor protein-tyrosine kinase with C-type lectin-like extracellular domains. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10323–10330. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10323>
- Rey, T., Nars, A., Bonhomme, M., Bottin, A., Huguet, S., Balzergue, S., et al. (2013). NFP, a Lys M protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytologist*, 198(3), 875–886. <https://doi.org/10.1111/nph.12198>
- Righetti, L., Djennane, S., Berthelot, P., Cournol, R., Wilmot, N., Loridon, K., et al. (2014). Elimination of the nptII marker gene in transgenic apple and pear with a chemically inducible R/Rs recombinase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(3), 335–348. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0443-2>
- Rinderle, S. J., Goldstein, I. J., Matta, K. L., & Ratcliffe, R. M. (1989). Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or Cryptic T)-antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 264(27), 16123–16131. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71595-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71595-0)
- Rodríguez, N. V., Kowalski, B., Rodríguez, L. G., Carabaloso, I. B., Suárez, M. A., Pérez, P. O., et al. (2007). *In vitro* and *ex vitro* selection of potato plantlets for resistance to early blight. *Journal of Phytopathology*, 155(10), 582–586. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01282.x>
- Rodríguez-Romero, A., Ravichandran, K. G., & Soriano-García, M. (1991). Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Letters*, 291(2), 307–309. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81308-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81308-U)
- Romeiro, R., Karr, A., & Goodman, R. (1981a). Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*, 68(3), 772–777. <https://doi.org/10.1104/pp.68.3.772>
- Romeiro, R. dS., Karr, A. L., & Goodman, R. N. (1981b). *Erwinia amylovora* cell wall receptor for apple agglutinin. *Physiological Plant Pathology*, 19(3), 383–390. [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(81\)80071-9](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(81)80071-9)
- Rommens, C. M., Haring, M. A., Swords, K., Davies, H. V., & Belknap, W. R. (2007). The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in Plant Science*, 12(9), 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.001>

- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., et al. (2014). Resistance to phytopathogens *e tutti quanti* : placing plant quantitative disease resistance on the map: Quantitative disease resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 427–432. <https://doi.org/10.1111/mpp.12138>
- Roy, S. (2014). Maintenance of genome stability in plants: repairing DNA double strand breaks and chromatin structure stability. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00487>
- Rulten, S. L., Fisher, A. E. O., Robert, I., Zuma, M. C., Rouleau, M., Ju, L., et al. (2011). PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Molecular Cell*, 41(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.006>
- Sadeghi, A., Smagghe, G., Proost, P., & Van Damme, E. J. M. (2008). Ferritin acts as a target site for the snowdrop lectin (GNA) in the midgut of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Insect Science*, 15(6), 513–519. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00240.x>
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., et al. (2002). Genome sequence of the plant pathogen, 415.
- Sarowar, S., Zhao, Y., Soria-Guerra, R. E., Ali, S., Zheng, D., Wang, D., & Korban, S. S. (2011). Expression profiles of differentially regulated genes during the early stages of apple flower infection with *Erwinia amylovora*. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4851–4861. <https://doi.org/10.1093/jxb/err147>
- Sastry, M. V., Banarjee, P., Patanjali, S. R., Swamy, M. J., Swarnalatha, G. V., & Surolia, A. (1986). Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1---3)D-GalNAc). *Journal of Biological Chemistry*, 261(25), 11726–11733. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67304-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67304-1)
- Schaart, J. G., Krens, F. A., Pelgrom, K. T. B., Mendes, O., & Rouwendal, G. J. A. (2004). Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnology Journal*, 2(3), 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00067.x>
- Schaart, J. G., Krens, F. A., Wolters, A. A., & Visser, R. G. F. (2010). Transformation methods for obtaining marker-free genetically modified plants. In C. N. Stewart, A. Touraev, V. Citovsky, & T. Tzfira (Eds.), *Plant Transformation Technologies* (1st ed., pp. 229–242). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470958988.ch15>
- Schaart, J. G., Tinnenbroek-Capel, I. E. M., & Krens, F. A. (2011). Isolation and characterization of strong gene regulatory sequences from apple, *Malus × domestica*. *Tree Genetics & Genomes*, 7(1), 135–142. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0320-z>
- Schaart, J. G., van de Wiel, C. C. M., Lotz, L. A. P., & Smulders, M. J. M. (2016). Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends in Plant Science*, 21(5), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.006>
- Schellenbauer, A., Guilly, M.-N., Grall, R., Le Bars, R., Paget, V., Kortulewski, T., et al. (2021). Phospho-Ku70 induced by DNA damage interacts with RNA Pol II and promotes the formation of phospho-

- 53BP1 foci to ensure optimal cNHEJ. *Nucleic Acids Research*, 49(20), 11728–11745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab980>
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., & Métraux, J.-P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>
- Seyran, E., & Craig, W. (2018). New breeding techniques and their possible regulation.
- Shaner, G. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*, 77(8), 1051. <https://doi.org/10.1094/Phyto-67-1051>
- Sharon, N., & Lis, H. (1990). Legume lectins—a large family of homologous proteins. *The FASEB journal*, 4(14), 3198–3208.
- Shen, C., Que, Z., Lu, Q., Liu, T., Li, S., Zou, J., & Chen, G. (2020). *The rice annexin gene OsAnn5 is a positive regulator of cold stress tolerance at the seedling stage* (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-21726/v1>
- Shen, C., Que, Z., Xia, Y., Tang, N., Li, D., He, R., & Cao, M. (2017). Knock out of the annexin gene *OsAnn3* via CRISPR/Cas9-mediated genome editing decreased cold tolerance in rice. *Journal of Plant Biology*, 60(6), 539–547. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0400-1>
- Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., & Peumans, W. J. (1987). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac( $\alpha$ -2-6)Gal/GalNAc sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 262(4), 1596–1601. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)75677-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75677-4)
- Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Dow, J. M., Parrilli, M., Lanzetta, R., et al. (2010). Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*, 20(4), 406–419. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp201>
- Singh, L., Sinha, A., Gupta, M., Xiao, S., Hammond, R., & Rawat, N. (2023). Wheat pore-forming toxin-like protein confers broad-spectrum resistance to fungal pathogens in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 36(8), 489–501. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-22-0247-R>
- Sohn, S.-H., Choi, M. S., Kim, K.-H., & Lomonossoff, G. (2011). The epigenetic phenotypes in transgenic *Nicotiana benthamiana* for CaMV 35S-GFP are mediated by spontaneous transgene silencing. *Plant Biotechnology Reports*, 5(3), 273–281. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0182-3>
- Steinberger, E. M., & Beer, S. V. (1988). Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 1, 135–144.
- Stillmark, H. (1888). Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceen. *MD Thesis, University of Dorpat, Dorpat, Estonia*.
- Sun, Y., Qiao, Z., Muchero, W., & Chen, J.-G. (2020). Lectin receptor-like kinases: The Sensor and Mediator at the Plant Cell Surface. *Frontiers in Plant Science*, 11, 596301. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.596301>
- Suryadi, H., Irianti, M. I., & Septiarini, T. H. (2022). Methods of random mutagenesis of aspergillus strain for increasing kojic acid production. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 23(4), 486–494. <https://doi.org/10.2174/1389201022666210615125004>

- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, *147*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., et al. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, *346*(6213), 1256688. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Teh, S. L., Kostick, S., Brutcher, L., Schonberg, B., Barritt, B., & Evans, K. (2021). Trends in fruit quality improvement from 15 years of Selection in the apple breeding program of Washington State University. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 714325. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.714325>
- Teneberg, S. (2003). Studies on Galalpha3-binding proteins: comparison of the glycosphingolipid binding specificities of *Marasmius oreades* lectin and *Euonymus europaeus* lectin. *Glycobiology*, *13*(6), 479–486. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg049>
- Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A., & Cammue, B. P. A. (2003). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, *24*(11), 1705–1712. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.09.014>
- Thomson, S. V. (2000). Epidemiology of fire blight. In J. L. Vanneste (Ed.), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. (1st ed., pp. 9–36). UK: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851992945.0009>
- Tilman, D. (1998). The greening of the green revolution.
- Titarenko, E., López-Solanilla, E., García-Olmedo, F., & Rodríguez-Palenzuela, P. (1997). Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *Journal of Bacteriology*, *179*(21), 6699–6704. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6699-6704.1997>
- Toth, I. K., Thorpe, C. J., Bentley, S. D., Mulholland, V., Hyman, L. J., Perombelon, M. C. M., & Salmond, G. P. C. (1999). Mutation in a gene required for lipopolysaccharide and enterobacterial common Antigen Bbiosynthesis affects virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, *12*(6), 499–507. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.6.499>
- Tsaneva, M., & Van Damme, E. J. M. (2020). 130 years of plant lectin research. *Glycoconjugate Journal*, *37*(5), 533–551. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>
- Vaid, N., Macovei, A., & Tuteja, N. (2013). Knights in action: Lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. *Molecular Plant*, *6*(5), 1405–1418. <https://doi.org/10.1093/mp/sst033>
- Vaid, N., Pandey, P. K., & Tuteja, N. (2012). Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology*, *80*(4–5), 365–388. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9952-8>
- Vanblaere, T., Flachowsky, H., Gessler, C., & Broggini, G. A. L. (2014). Molecular characterization of cisgenic lines of apple ‘Gala’ carrying the *Rvi6* scab resistance gene. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(1), 2–9. <https://doi.org/10.1111/pbi.12110>

- Van Damme, E., & Peumans, W. J. (1990). Developmental changes and tissue distribution of lectin in *Galantbus nivalis* L. and *Narcissus cv. Carlton*. *Planta*, 182:605-609
- Van Damme, Els J. M., Smith, D. F., Cummings, R., & Peumans, W. J. (2011). Glycan arrays to decipher the specificity of plant lectins. In A. M. Wu (Ed.), *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3* (Vol. 705, pp. 757–767). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7877-6\\_39](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7877-6_39)
- Van Damme, Els J.M., Culerrier, R., Barre, A., Alvarez, R., Rougé, P., & Peumans, W. J. (2007a). A novel family of lectins evolutionarily related to class V chitinases: An example of neofunctionalization in legumes. *Plant Physiology*, 144(2), 662–672. <https://doi.org/10.1104/pp.106.087981>
- Van Damme, Els J.M., Lannoo, N., & Peumans, W. J. (2008). Plant Lectins. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 48, pp. 107–209). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)
- Van Damme, Els J. M., Nakamura-Tsuruta, S., Smith, D. F., Ongenaert, M., Winter, H. C., Rougé, P., et al. (2007b). Phylogenetic and specificity studies of two-domain GNA-related lectins: generation of multispecificity through domain duplication and divergent evolution. *Biochemical Journal*, 404(1), 51–61. <https://doi.org/10.1042/BJ20061819>
- Vandenborre, G., Smaghe, G., & Van Damme, E. J. M. (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72(13), 1538–1550. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.024>
- Vandesompele, J., Preter, K. D., Roy, N. V., & Paepe, A. D. (n.d.). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.
- Vanneste, Joël L. (Ed.). (2000). *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. Wallingford, Oxon, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub.
- Vaucheret, H., Béclin, C., & Fagard, M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* (114), 3083-3091.
- Venisse, J.-S., Gullner, G., & Brisset, M.-N. (2001). Evidence for the Involvement of an Oxidative Stress in the Initiation of Infection of Pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*, 125(4), 2164–2172. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.2164>
- Vijayan, K., Chakraborti, S. P., & Ghosh, P. D. (2003). In vitro screening of mulberry (*Morus* spp.) for salinity tolerance. *Plant Cell Reports*, 22(5), 350–357. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0695-5>
- Virdi, K. S., Spencer, M., Stec, A. O., Xiong, Y., Merry, R., Muehlbauer, G. J., & Stupar, R. M. (2020). Similar seed composition phenotypes are observed from CRISPR-Generated in-frame and knockout alleles of a soybean KASI Ortholog. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1005. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01005>
- Vogt, I., Wöhner, T., Richter, K., Flachowsky, H., Sundin, G. W., Wensing, A., et al. (2013). Gene-for-gene relationship in the host–pathogen system *Malus × robusta* 5– *Erwinia amylovora*. *New Phytologist*, 197(4), 1262–1275. <https://doi.org/10.1111/nph.12094>
- Voigt, B. (2023). EU regulation of gene-edited plants—A reform proposal. *Frontiers in Genome Editing*, 5, 1119442. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2023.1119442>

- Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., & Valcke, R. (2013). Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in *Rosaceae*: State of the art. *Microbiology*, 159(Pt\_5), 823–832. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>
- Walker, J. R., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), 607–614. <https://doi.org/10.1038/35088000>
- Walters, D., Newton, A. C., & Lyon, G. (Eds.). (2007). *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*. Oxford, UK ; Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Wang, Yanpeng, Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J.-L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32(9), 947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
- Wang, Yong, Chen, B., Hu, Y., Li, J., & Lin, Z. (2005). Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/lox Site-specific recombination system. *Transgenic Research*, 14(5), 605–614. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-0884-9>
- Warneys, R., Gaucher, M., Robert, P., Aligon, S., Anton, S., Aubourg, S., et al. (2018). Acibenzolar-S-Methyl Reprograms Apple Transcriptome Toward Resistance to Rosy Apple Aphid. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01795>
- Webster, B. (2012). The role of olfaction in aphid host location. *Physiological Entomology*, 37(1), 10–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2011.00791.x>
- Wei, Z., Kim, J. F., & Beer, S. V. (2000). Regulation of *hrp* genes and Type III protein Secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 13(11), 1251–1262. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1251>
- Wei, Z.-M., & Beer, S. V. (1995). *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* Gene Transcription and Is a Member of the ECF Subfamily of  $\sigma$ -Factors. *J. BACTERIOL.*, 177.
- Wei, Z.-M., Sneath, B. J., & Beer, S. V. (1992). Expression of *Erwinia amylovora* *hip* Genes in Response to Environmental Stimuli. *J. BACTERIOL.*, 174.
- Wen, G., Xie, Z., Yang, Y., Yang, Y., Guo, Q., Liang, G., & Dang, J. (2023). NpPP2-B10, an F-Box-Nictaba gene, promotes plant growth and resistance to black shank disease incited by *Phytophthora nicotianae* in *Nicotiana tabacum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7353. <https://doi.org/10.3390/ijms24087353>
- Wetzel, S., Demmers, C., & Greenwood, J. S. (1989). Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods. *Planta*, 178(3), 275–281. <https://doi.org/10.1007/BF00391854>
- Wickham, H., & Wickham, H. (2016). *Data analysis*. Springer.

- Wiesmann, U. N., DiDonato, S., & Herschkowitz, N. N. (1975). Effect of chloroquine on cultured fibroblasts: release of lysosomal hydrolases and inhibition of their uptake. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 66(4), 1338–1343. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(75\)90506-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(75)90506-9)
- Wilkaniec, B. (1993). The influence of feeding of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea* (Pass.)(Homoptera: Aphididae) on the growth of apple fruits. *Roczniki Nauk Rolniczych. Seria E, Ochrona Roślin*, 23(1/2), 75–78.
- Will, T., & Vilcinskas, A. (2015). The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 57, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.005>
- Woo, J. Y., Kim, Y. J., & Paek, K.-H. (2020). CaLecRK-S.5, a pepper L-type lectin receptor kinase gene, accelerates Phytophthora elicitor-mediated defense response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(4), 951–956. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.014>
- Wyss, E., & Daniel, C. (2004). Effects of autumn kaolin and pyrethrin treatments on the spring population of *Dysaphis plantaginea* in apple orchards. *Journal of Applied Entomology*, 128(2), 147–149. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00825.x>
- Xin, X.-F., Nomura, K., Ding, X., Chen, X., Wang, K., Aung, K., et al. (2015). *Pseudomonas syringae* effector avirulence protein E localizes to the host plasma membrane and down-regulates the expression of the *NONRACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE1/HARPIN-INDUCED1-LIKE13* gene required for antibacterial immunity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 169(1), 793–802. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00547>
- Xu, R., Yang, Y., Qin, R., Li, H., Qiu, C., Li, L., et al. (2016). Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(8), 529–532. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.07.003>
- Yamaji, Y., Maejima, K., Komatsu, K., Shiraishi, T., Okano, Y., Himeno, M., et al. (2012). Lectin-mediated resistance Impairs plant virus infection at the cellular Level. *The Plant Cell*, 24(2), 778–793. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093658>
- Yu, T.-F., Zhao, W.-Y., Fu, J.-D., Liu, Y.-W., Chen, M., Zhou, Y.-B., et al. (2018). Genome-wide analysis of CDPK family in foxtail millet and determination of SiCDPK24 functions in drought Stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 651. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00651>
- Zafar, K., Khan, M. Z., Amin, I., Mukhtar, Z., Yasmin, S., Arif, M., et al. (2020). Precise CRISPR-Cas9 mediated genome editing in super Basmati Rice for resistance against bacterial blight by targeting the major susceptibility gene. *Frontiers in Plant Science*, 11, 575. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00575>
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>
- Zeng, Q., Puławska, J., & Schachterle, J. (2021). Early events in fire blight infection and pathogenesis of *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology*, 103(S1), 13–24. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00675-3>

- Zhang, Xiaowei, Dong, W., Sun, J., Feng, F., Deng, Y., He, Z., et al. (2015). The receptor kinase *CERK1* has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *The Plant Journal*, 81(2), 258–267. <https://doi.org/10.1111/tpj.12723>
- Zhang, Xiuren, Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
- Zhang, Y., Bak, D. D., Heid, H., & Geider, K. (1999). Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. Edited by M. Yaniv. *Journal of Molecular Biology*, 289(5), 1239–1251. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2846>





---

**Titre :** Caractérisation des agglutinines du pommier : une approche biotechnologique pour la création d'une résistance durable au feu bactérien

**Mots clés :** *Erwinia amylovora*, *Dysaphis plantaginea*, CRISPR/Cas9, Intragénèse, Amaranthin-Like protéines, gènes de défense

**Résumé :** Des alternatives comme les stimulateurs de défenses des plantes peuvent être une solution pour réduire l'usage de pesticides. Parmi eux, l'acibenzolar-S-méthyl (ASM) a montré son efficacité sur le pommier contre le feu bactérien, causé par *Erwinia amylovora* (*Ea*). L'ASM induit, entre autres, l'expression d'une famille multigénique de lectines, les agglutinines (MdAGGs), dont l'une d'elles, MdAGG10, possède *in vitro* un pouvoir d'agglutination vis-à-vis d'*Ea*. Au cours de la thèse, grâce à l'analyse de plantes éditées *via* CRISPR/Cas9 pour les MdAGGs, nous avons démontré *in planta* l'implication de cette famille dans la défense contre *Ea* et un autre bioagresseur, le puceron cendré. La surexpression constitutive de MdAGG10 ne permet cependant pas de conférer une résistance contre ces deux bioagresseurs.

Cette surexpression affecte la croissance de la plante, suggérant qu'une régulation de l'expression des MdAGGs est nécessaire pour éviter un effet pléiotrope sur le phénotype des plantes. Nous avons donc mis en œuvre une stratégie intragénique associant un promoteur induit par *Ea*, *MdpPPO16*, et la séquence codante de *MdAGG10*, afin d'évaluer l'effet d'une expression inductible de cette protéine en présence de la bactérie. Ceci a permis 1) d'induire MdAGG10 plus tôt et plus fortement qu'en conditions normales d'infection et de montrer que cette induction permet 2) de retarder l'apparition des symptômes, sans pour autant protéger la plante sur le long terme. La possible dérégulation européenne de plantes issues de New Breeding Techniques, ouvre la perspective d'une application de ces résultats dans l'amélioration du pommier pour la résistance au feu bactérien.

---

**Title :** Characterisation of apple agglutinins: a biotechnological approach to create a sustainable resistance against fire blight

**Keywords :** *Erwinia amylovora*, *Dysaphis plantaginea*, CRISPR/Cas9, Intragenesis, Amaranthin-Like proteins, defense gene

**Abstract :** In France, apple is the most treated crop. Efficient alternatives to chemical pesticides, like plant resistance inducers, are being studied in order to reduce these treatments on apple. Among them, acibenzolar-S-methyl (ASM) has already been proven to be effective in controlled conditions against fire blight, a *Maloideae* disease caused by *Erwinia amylovora* (*Ea*). ASM strongly induces the expression of a multigenic genes family encoding lectins, termed agglutinins (MdAGGs). Moreover, one of them, MdAGG10, provokes *in vitro* bacterial cell aggregation. During my thesis, I used plants edited by CRISPR/Cas9 to demonstrate that this protein family is involved in the resistance against *Ea* but also against another apple pest, the rosy aphid. However, constitutive overexpression of MdAGG10 does not promote resistance against these pests.

This overexpression has negative consequences on apple growth suggesting that regulation of MdAGGs is necessary to prevent pleiotropic effects on plant phenotype. We therefore set up an intragenic strategy associating the promoter *MdpPPO16*, known to be rapidly and strongly induced upon *Ea* infection, and the coding sequence of *MdAGG10*. This allowed to show that *Ea* can 1) induce MdAGG10 expression earlier and stronger than in standard *Ea* infection conditions and that this induction 2) allows to delay the first fire blight symptoms appearance, although it doesn't confer long term resistance to the plants. Plants coming from NBT (New Breeding Techniques) are likely to be authorized in the European Union and these results open up on a real application of in apple breeding programs against fire blight.