



HAL
open science

Influence de la nutrition azotée sur la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à *Alternaria brassicicola* aux stades plantule et rosette

Thibault Barrit

► **To cite this version:**

Thibault Barrit. Influence de la nutrition azotée sur la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à *Alternaria brassicicola* aux stades plantule et rosette. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2022. Français. NNT : 2022NSARC163 . tel-04634706

HAL Id: tel-04634706

<https://theses.hal.science/tel-04634706>

Submitted on 4 Jul 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 Agro Rennes-Angers

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : *Biologie et physiologie végétales*

Par

Thibault BARRIT

**Influence de la nutrition azotée sur la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana*
à *Alternaria brassicicola* aux stades plantule et rosette**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 11/07/2022

Unité de recherche : UMR 1345 IRHS

Rapporteurs avant soutenance :

Claire NEEMA Professeure à L'Institut Agro Montpellier

Loïc RAJJOU Professeur à AgroParisTech - Université Paris-Saclay

Composition du Jury :

Président : Olivier LEPRINCE

Examineurs : Alia DELLAGI

Antoine GRAVOT

Dir. de thèse : Béatrice TEULAT

Professeur à L'Institut Agro Rennes-Angers

Professeure à AgroParisTech - Université Paris-Saclay

Maître de conférences à l'Université de Rennes 1

Maître de conférences à L'Institut Agro Rennes-Angers

Remerciements

Je voudrais dans un premier temps remercier ma directrice de thèse, Béatrice Teulat, et mes deux co-encadrantes, Elisabeth Planchet et Claire Campion, pour leur encadrement, pour leurs conseils, pour leurs corrections (malgré des timings parfois un peu serrés), pour toute l'aide qu'elles m'ont apporté tout au long de cette thèse. Merci également pour la mise en place de ce projet de thèse, au cours duquel j'ai beaucoup appris, sur tous les plans.

Je voudrais également remercier Olivier Leprince, Claire Neema, Loïc Rajjou, Alia Dellagi et Antoine Gravot d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci en particulier aux deux rapporteurs Claire Neema et Loïc Rajjou pour la relecture de ce manuscrit.

Merci aux membres de mon comité de suivi individuel de thèse, Alain Bouchereau, Muriel Viaud et Jérôme Verdier, pour leur intérêt dans ce travail, et pour leurs retours avisés qui ont permis de l'améliorer.

Merci également aux organismes qui ont financé ces travaux de thèse menés dans le cadre du projet FuSioN soutenu par le programme du conseil régional « Objectif Végétal, Recherche, Éducation et Innovation en Pays de la Loire » soutenu par la Région Pays de la Loire, Angers Loire Métropole. Merci à l'École Nationale Agronomique « Institut Agro - Agrocampus Ouest » pour l'attribution de ma bourse doctorale, cofinancée par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation et le Conseil Régional des Pays de la Loire dans le cadre d'un Contrat de Plan Etat-Région (CPER).

Je voudrais aussi mettre en avant dans ces remerciements les collaborations, qui nous ont permis d'obtenir des résultats précieux. Merci donc à Aurélie Rolland et Fabienne Simonneau du plateau IMAC (SFR Quasav) pour l'aide apportée dans l'utilisation du microscope électronique à balayage. Merci également à Othmane Merah et Muriel Cerny du laboratoire de Chimie Agroindustrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA de Toulouse, pour les dosages des huiles et des acides gras dans les graines. Enfin, merci à David Guilet et à Dimitri Bréard du plateau PHYTO de la SFR Quasav et du SONAS pour les dosages de camalexine et de glucosinolates effectués dans les graines. Cette dernière collaboration a également fait l'objet d'un projet, BRAF (BRassicacées, Alternaria, défenses - financement SFR QuaSav), ayant pour but de mettre au point une méthode de dosage simultanée des glucosinolates et de la camalexine. Un article détaillant la méthode est en cours de révision dans la revue *Journal of Chromatography* (Bréard *et al.*), et je souhaiterais remercier tous les membres de ce projet : Dimitri Bréard, Daniel Sochard, Sophie Aligon, Elisabeth Planchet, Béatrice Teulat, Josiane Le Corff, Claire Campion et David Guilet.

Je voudrais également remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidé dans les manip, que je n'aurais pas pu faire sans eux. Merci à Jérémy Lothier et Caroline Cukier pour les dosages effectués en GC-MS, merci à Pascale Satour pour les dosages effectués en HPLC et le dosage

d'ammonium sur les graines, merci à Julie Lalande pour le dosage effectué en IRMS. Merci à Alexis Porcher pour le dosage d'ammonium sur rosette, et pour la mise au point de la culture hydroponique des rosettes d'*A. thaliana*. Merci à Sophie Aligon pour la gestion des cultures et l'aide technique apportée tout au long de ma thèse. Merci à Thibault Clochard pour les conseils sur les PCR et le design d'amorces pour la RT-qPCR. Merci également à Alexia Crézé, stagiaire chez FungiSem, pour sa contribution à la prise de photos de graines inoculées faites au MEB. Merci à David Lalanne de l'équipe SEED de l'IRHS de m'avoir aidé à l'estimation des quantités et de la qualité de mes ARN. Merci à Daniel Sochard de l'équipe ImHorPhen de l'IRHS pour la production des graines qui ont servi pour l'ensemble de mes travaux sur les plantules. Merci aussi à toutes les personnes qui m'ont aidé pour les manip infernales de semis / inoculation et de récolte des échantillons, sans qui il aurait été impossible de les mener à bien : Sophie Aligon, Thibault Clochard, Jean-Baptiste Domergue, Marthe Malécange, Eden Caduc, Justine Colou, Ornella Frati, Cyril Abadie et Béatrice Teulat. Merci enfin à Béatrice Teulat et Elisabeth Planchet, qui m'ont accompagné jusqu'au bout de la nuit pour les cinétiques de germination.

L'interprétation des résultats obtenus ne fut pas toujours aisée, et je voudrais remercier les personnes qui m'y ont aidé, à savoir Anis Limami, Guillaume Tcherkez, Jérémy Lothier, Thomas Guillemette, Alexis Porcher et bien sûr mes trois encadrantes de thèse. Je voudrais également remercier David Rousseau et Julie Bourbeillon de l'équipe ImHorPhen pour l'aide apportée lors du développement de la méthode d'imagerie utilisant Ilastik et Python. Enfin, merci à toutes les autres personnes qui m'ont conseillé au cours de ma thèse, et en particulier à Sophie Aligon, Daniel Beucher, Joseph Ly Vu, Thibault Clochard, Franck Bastide, Justine Colou, Bruno Hamon, Tristan Boureau, Cyril Abadie, Julie Lalande et Jean-Baptiste Domergue.

Je ne peux pas en finir avec les remerciements « sérieux » sans remercier Eden Caduc qui m'a aidé lors de son stage, et notamment pour la mesure des racines de plantules avec ImageJ. Merci également à Mathieu Marc et à Maria-Dolores Pérez-Garcia pour l'aide apportée lors des vacances d'enseignement que j'ai effectuées à Agrocampus Ouest.

Et enfin, évidemment, merci aux deux équipes qui m'ont accueilli au cours de cette thèse : l'équipe SMS (Seedling, Metabolism & Stress) et l'équipe FungiSem (Pathologies fongiques des semences). Merci également à l'équipe SEED avec qui les locaux sont partagés.

Je souhaiterais, pour commencer ces remerciements moins scientifiques, remercier les autres thésards avec qui j'ai vécu cette expérience qu'est la thèse, pour leur bonne humeur et leur sympathie : Elise Réthoré, Elise Bizouerne, Lili Zang, Douae Ben Hdech, Zhijuan Chen, Wilfried Chevalier, Alexis Porcher et Mathieu Marc pour les anciens, Xabi Cazenave, Julie Mallet et Guillaume Chesneau pour les contemporains, et enfin Benjamin Hubert et Abdulsatar Mohammad pour les petits nouveaux. Je voudrais aussi remercier tous les postdocs et stagiaires

que j'ai eu la chance de croiser au cours de ma thèse, en particulier Ousmane Séne et Lukasz Tarkowski, ainsi que la dernière fournée de stagiaires SMS (et assimilés) : Owen Kentish, Félix Rétif et Quentin Marcou. Merci à tous les membres du Doctoberfest et de l'association Greenyd pour tous les bons moments passés, en particulier mes collègues du pôle vulgarisation scientifique de Greenyd (le meilleur de loin, tout le monde en conviendra) : Justine Colou et Guillaume Chesneau. Merci aussi à toutes les personnes avec qui j'ai pu avoir des discussions, sérieuses comme moins sérieuses, au laboratoire, notamment Jérôme Verdier, Joseph Ly Vu, Pascale Satour, Thibault Clochard, Cyril Abadie, etc.

Pour finir, merci aux djeuns de FungiSem qui m'ont intégré à leur groupe quand j'ai commencé la thèse : Justine Colou, Ophélie Dubreu, Corentin Chateau, Franck Bastide, Marie-Anne Le Moigne, Julia Courtial et Anthony Kwasiborski. Merci à Laure Boeglin pour tous les bons moments passés ensemble, je te dois un café je crois. Et enfin, merci aux deux crocos, Jean Bernard et Marth.

Table des matières

Remerciements	1
Table des Figures.....	11
Table des Tableaux.....	15
Liste des abréviations	19
Introduction générale.....	23
Contexte	23
Objectifs	27
Chapitre I. Synthèse Bibliographique.....	29
I.1. Le pathosystème <i>Alternaria brassicicola</i> / <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
I.1.1. Description du pathosystème	29
I.1.2. Les mécanismes du pouvoir pathogène d' <i>A. brassicicola</i>	31
I.2. L'azote, un élément essentiel au développement des plantules	33
I.2.1. L'azote présent dans le sol, source exogène d'azote.....	35
I.2.2. La mobilisation des réserves de la graine, source endogène d'azote et de carbone.....	43
I.3. Le rôle de l'azote lors d'un stress biotique chez les plantes	47
I.3.1. Généralités sur la défense des plantes.....	47
I.3.2. Le rôle du métabolisme primaire de l'azote dans les défenses des plantes.....	49
I.3.3. Le rôle des composés du métabolisme secondaires dérivant d'acides aminés dans les défenses : GSL, camalexine et polyamines	51
I.3.4. Le rôle de l'azote dans la nutrition et la pathogénicité des champignons	61
Chapitre II. Effet de la nutrition azotée sur la sensibilité des plantes au stade rosette et sur la modulation de leur métabolisme primaire en réponse au champignon	67
II.1. Introduction.....	67
II.2. Article numéro 1: Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of <i>Arabidopsis thaliana</i> to the necrotrophic fungus, <i>Alternaria brassicicola</i>	67
II.3. Conclusion	103
Chapitre III. Développement d'un dispositif expérimental pour l'étude au stade plantule et influence de la nutrition azotée et du génotype sur la sensibilité des plantules	105
III.1 Introduction	105
III.2. Article numéro 2 : A new <i>in vitro</i> device reveals a specific influence of <i>Arabidopsis</i> nitrogen nutrition on its susceptibility to <i>Alternaria brassicicola</i> at the seedling stage.....	105
III.3. Résultat complémentaire : la germination des graines est influencée par le génotype et le milieu nutritif azoté mais pas par la présence du champignon.....	153
III. 4. Conclusion.....	155
Chapitre IV. Variations du métabolisme primaire et secondaire des graines et des plantules associées aux différences de sensibilité révélées au stade plantule.....	157
IV.1. Introduction.....	157

IV. 2 Matériel et Méthodes.....	159
IV.2.1 Matériel biologique	159
IV.2.2 Culture des plantules et inoculation par le champignon.....	159
IV.2.3 Analyse d'images pour l'évaluation de la surface verte et de l'impact du champignon sur le développement de la partie aériennes des plantules	161
IV.2.4 Dosages de métabolites dans les graines.....	161
IV.2.5 Dosages de métabolites dans les plantules	165
IV.2.6 Mesure de l'expression des gènes de plante et de champignon par RT-qPCR	169
IV.2.7 Statistiques	169
IV.3 Résultats	171
IV.3.1. Influence du milieu azoté et du génotype sur le développement des plantules et l'impact du champignon	171
IV.3.2. Analyse de la composition des graines des deux génotypes Col-0 et <i>Ler</i>	173
IV.3.3. Influence du champignon, de la nutrition azotée et du génotype sur la composition métabolique des plantules.....	181
IV.3.4. Analyse de l'expression de gènes du métabolisme d' <i>A. thaliana</i> et d' <i>A. brassicicola</i> en lien avec les résultats de dosages métaboliques	195
IV.4 Discussion	203
IV.4.1. La composition des graines de Col-0 et de <i>Ler</i> peut-elle expliquer la plus grande sensibilité de <i>Ler</i> à <i>A. brassicicola</i> ?.....	203
IV.4.2. Rôle du métabolisme primaire du N, du C et du S et des voies de défense sur la sensibilité des plantules à <i>A. brassicicola</i>	211
IV.4.3. Impact des polyamines sur les différences de sensibilité observées entre conditions azotées et génotypes	219
IV.4.4. Impact des composés de défense dérivant du tryptophane sur les différences de sensibilité observées entre conditions azotées et génotypes.....	227
Annexes	232
IV.5. Conclusion.....	235
Conclusion générale et perspectives.....	239
Références bibliographiques	247

Table des Figures

Chapitre I.

Figure 1. : Installation des plantules, et sensibilité à leur environnement.

Figure 2 : Symptômes provoqués par *Alternaria brassicicola* sur Brassicacées.

Figure 3 : Cycle infectieux d'*Alternaria brassicicola* sur les Brassicacées.

Figure 4 : Schéma bilan de l'assimilation de l'azote chez les plantes.

Figure 5 : Voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques et de la camalexine.

Figure 6 : Voie de biosynthèse des polyamines (Put, Spd, Spm) chez les plantes.

Chapitre II.

Figure 1: Shoot fresh and dry weights of 8 weeks old *Arabidopsis thaliana* plants (Col-0 ecotype) grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- hydroponic medium after 7 days after treatment for the control conditions.

Figure 2: Area of fungal lesions in Col-0 plants grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, measured on leaves 7 days after treatment with Abra43.

Figure 3: Transcriptional levels of defence genes in the leaves of Col-0 plants, grown on NH_4^+ or NO_3^- conditions.

Figure 4: Soluble sugar contents in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, determined by HPLC, 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43.

Figure 5: Nitrate and ammonium contents in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, measured at 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43.

Figure 6: Transcriptional levels of nitrate and ammonium transporter genes in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium.

Figure 7: Nitric oxide fluorescence around symptoms, observed by fluorescent microscopy, in leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium

Figure 8: Amino acid (A) and organic acid (B) contents in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, determined by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43.

Figure 9: Expression of genes linked to glutamate metabolism in the leaves of NH_4^+ or NO_3^- -fed plants.

Figure S1: Gene expressions of *AMT1.2*, *GLN1.1*, *GLN1.5*, *P5CS* and *ProDH* in leaves of NH_4^+ or NO_3^- -fed plants after H_2O treatment or fungal inoculation (Abra43).

Figure S2: Amino (A) and organic (B) acid contents in leaves of Col-0 plants, grown in presence of NH_4^+ or NO_3^- medium after treatment with sterile water (H_2O) or fungal inoculation (Abra43).

Chapitre III.

Figure 1: Pictures of 14 days old Col-0 seedlings in vertical square plates filled with MS modified agar medium supplemented with 5 mM KNO₃.

Figure 2: Seed contamination percentage observed 3 DAI for the immersion and droplet methods at different *A. brassicicola* conidial suspension concentrations (10³, 10⁴ and 10⁵ conidia per mL).

Figure 3: Scanning electron microscopy observations showing the heterogeneity of *A. thaliana* seed contamination with the immersion method compared to the droplet method, white circles highlighting *A. brassicicola* conidia.

Figure 4: Overview of the semi-automated pipeline used to detect and calculate the green and necrotic areas per square plate, using the ilastik software.

Figure 5: Correlation between the Ilastik-based indexes and the visual rating scale (VRS).

Figure 6: Primary root length (PRL) variation between H₂O and Abra43 seedlings at 8 and 14 DAI, expressed as a percentage and calculated as follows: $100 * ((PRL_{Abra43} - PRL_{H2O}) / PRL_{H2O})$.

Figure 7 : Courbes de germination simulées (selon le modèle Gompertz) des trois géotypes (Col-0 trait foncé, *Ler* trait clair, *Ws* trait intermédiaire) dans trois condition nutritives azotées (0,1mM NO₃⁻ trait vert, 5mM NO₃⁻ trait bleu, 5mM NH₄⁺ trait rouge), en présence (Abra43 ; trait pointillé et point rond) ou en absence (H₂O ; trait plein et point carré) du champignon.

Chapitre IV.

Figure 1 : Analyse en Composantes Principales des métabolites détectés dans les graines.

Figure 2 : Analyse en Composantes Principales des teneurs en métabolites (AA, AO, sucres, polyamines) (a) en fonction du géotype ; (b) en fonction de l'inoculation par le champignon ; (c) en fonction du milieu azoté.

Figure 3 : Heatmap (carte de chaleur) des métabolites significativement différents entre les conditions de milieu, de géotype et d'inoculation.

Figure 4 : OPLS (Orthogonal Projections to Latent Structures) des teneurs en métabolites (AA, AO, sucres, polyamines, ions) dans les plantules.

Figure 5 : OPLS (Orthogonal Projections to Latent Structures) présentée en Figure 4, représentant la structuration de chaque métabolites chez les plantules.

Figure 6 : Volcano plot représentant la corrélation entre chaque métabolite dosé et l'impact du champignon sur les plantules.

Figure 7 : Voie de biosynthèse des polyamines (Put, Spd, Spm) chez les plantes.

Figure 8 : Voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques et de la camalexine.

Figure 9 : Expression de gènes d'*A. brassicicola*, associés au métabolisme azoté, au transport de N et à la pathogénicité du champignon.

Figure S1 : Analyse en Composantes Principales des teneurs en métabolites (AA, AO, sucres, polyamines) comparant les conditions d'inoculation et de géotype au sein des différents milieux azotés.

Table des Tableaux

Chapitre II.

Table 1: Average values of amino acids ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW} \pm \text{SEM}$) in *Arabidopsis thaliana* leaves after H₂O treatment or Abra43 inoculation from plants grown on two nutritive media (NH₄⁺ or NO₃⁻) at 7 dpi.

Table 2: Average values of organic acids ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW} \pm \text{SEM}$) in *Arabidopsis thaliana* leaves after H₂O treatment or Abra43 inoculation from plants grown on two nutritive media (NH₄⁺ or NO₃⁻) at 7 dpi.

Table S1: Primer sequences for real-time quantitative PCR amplification.

Chapitre III.

Table 1: Illustration and description of the visual rating scale (VRS) used to evaluate the symptoms observed on the aerial parts of the seedlings.

Table 2: (a) Average values of green area, in square millimetres (per square plate), for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻), 14 DAI with sterile H₂O. (b) Average values of green area ratio between seedlings treated with H₂O and seedlings inoculated with Abra43, for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻), 14 DAI.

Table 3: Average values of fungal lesions for Col-0, *Ler* or *Ws* adult plants grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻) in a hydroponic system, 7 DAI.

Table S1: (a) Average values of primary root length 8 DAI, in centimetres, for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings after H₂O treatment or Abra43 inoculation, grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻). (b) Average values of primary root length 14 DAI, in centimetres, for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings after H₂O treatment or Abra43 inoculation, grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻).

Tableau 4 : Temps nécessaire aux graines pour atteindre 50% de germination (T50), en h pour les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler* semées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻) après traitement par H₂O stérile ou inoculation par Abra43.

Chapitre IV.

Tableau 1 : Valeurs moyennes de la surface verte (en mm² carrés \pm SEM, et par boîte), pour les plantules Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻), traitées avec de l'eau, 14 jours après la date de traitement.

Tableau 2 : Valeurs moyennes de l'impact du champignon sur le développement des plantules, exprimées en tant que ratio (en pourcentage \pm SEM) de surface verte entre plantules traitées avec H₂O et plantules inoculées avec Abra43, pour les plantules Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻), 14 jours après inoculation (JAI).

Tableau 3 : Masse moyenne des graines sèches pour les deux génotypes Col-0 et *Ler* (en $\mu\text{g} \pm \text{SEM}$).

Tableau 4 : Teneurs en acides aminés et en acides organiques dosés dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler* (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$).

Tableau 5 : Teneurs en sucres solubles dosés dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler* (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$).

Tableau 6 : Teneurs en ions inorganiques dosés dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler* (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$).

Tableau 7 : Teneurs en huiles (en pourcentage massique $\pm \text{SEM}$) dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler*, et composition en acides gras (en pourcentage massique $\pm \text{SEM}$).

Tableau 8 : Composition en glucosinolates (en pourcentage massique) et teneurs totales en glucosinolates (en $\text{mg} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$) dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler*.

Tableau 9 : Proportions atomiques de carbone, d'azote et de soufre (en pourcentage massique $\pm \text{SEM}$) dans les plantules des deux génotypes Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH_4^+ , 0,1 mM NO_3^- ou 5 mM NO_3^-) après traitement par H_2O ou inoculation par Abra43, 14 JAI.

Tableau 10 : Teneurs en ions inorganiques (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$) dans les plantules des deux génotypes Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH_4^+ , 0,1 mM NO_3^- ou 5 mM NO_3^-) après traitement par H_2O ou inoculation par Abra43, 14 JAI.

Tableau 11 : Effet de l'inoculation sur l'expression de gènes de défense, des voies de synthèse et de dégradation des composés de défense dérivant du tryptophane, des polyamines et de transporteurs de N en fonction du milieu azoté et du génotype, 14 JAI.

Tableau 12 : Effet du milieu azoté sur l'expression de gènes de défense, des voies de synthèse et de dégradation des composés de défense dérivant du tryptophane, des polyamines et de transporteurs de N en fonction du génotype et de l'inoculation, 14 JAI.

Tableau 13 : Effet du génotype sur l'expression de gènes de défense, des voies de synthèse et de dégradation des composés de défense dérivant du tryptophane, des polyamines et de transporteurs de N en fonction du milieu azoté et de l'inoculation, 14 JAI.

Tableau S1 : Séquence des amorces pour l'amplification par RT-qPCR.

Liste des abréviations

1OH13M : 1-hydroxy-3-indolylméthyl glucosinolate

4OH13M : 4-hydroxy-3-indolylméthyl glucosinolate

AA : acide aminé

ABA : acide abscissique

ACP : analyse en composantes principales

ADC : arginine décarboxylase

AO : acide organique

Arg : arginine

C : carbone

Cad : cadavérine

Cit : citrulline

DAI : day after inoculation

DAO : diamine oxydase

DSC : Dice Sørensen coefficient

DW : Dry weight

GA : gibbérellines

GABA : acide γ -aminobutyrique

GLS : glucosinolate

GST : glutathion S-transférase

HAI : healthy area index

JA : acide jasmonique

JAI : jour après inoculation

MS : matière sèche

N : azote

NAI : necrosis area index

NH₄⁺ : ammonium

NMR : nitrogen metabolite repression

NO₃⁻ : nitrate

NO : monoxyde d'azote

NR : nitrate réductase

OPLS : orthogonal projections to latent structures

Orn : ornithine

PAO : polyamines oxydase

PR : pathogenesis-related
PRL : primary root length
Put : putrescine
RH : réponse hypersensible
S : soufre
SEM : standard error of the mean
Spd : spermidine
SPDS : spermidine synthase
Spm : spermine
SPMS : spermine synthase
SSP : protéine de stockage spécialisée
TGG : thioglucoside glucohydrolase
Tspm : thermospermine
VRS : visual rating scale

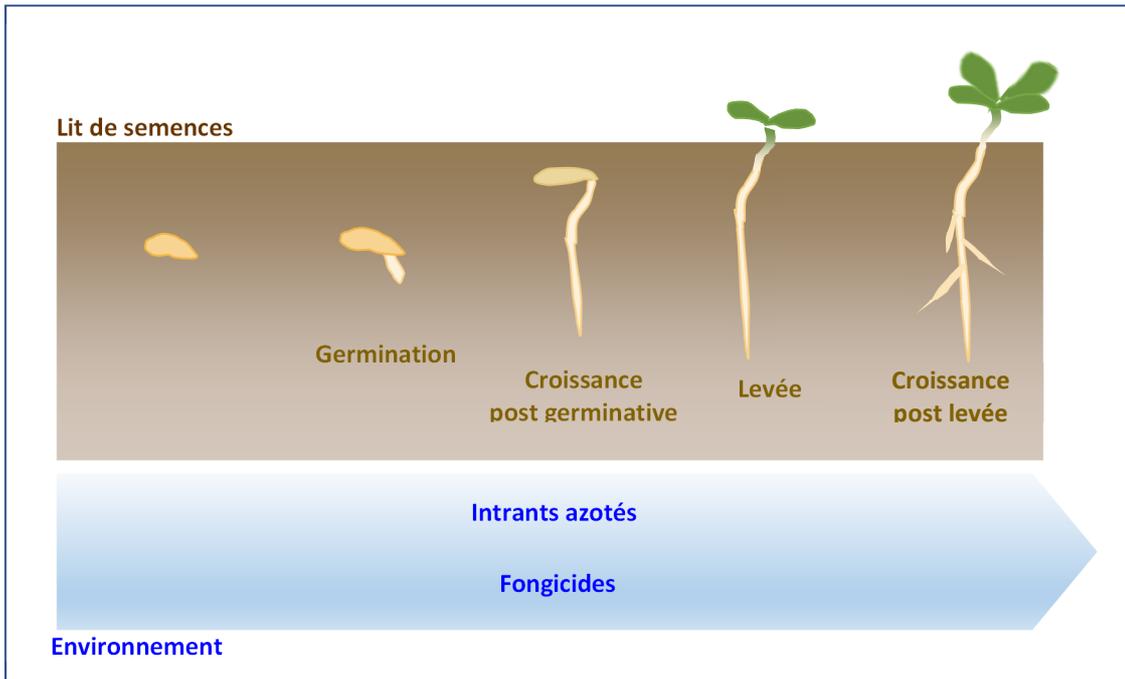


Figure 1. : Installation des plantules, et sensibilité à leur environnement. (source : B. Teulat)

Introduction générale

Contexte

L'azote (N) n'est pas seulement un des macronutriments les plus importants pour les plantes, crucial pour leur croissance et leur développement, il a également un rôle central dans les interactions entre plantes et pathogènes. Bien qu'un apport élevé en azote puisse entraîner une plus grande sensibilité des plantes aux maladies, aucune règle générale ne peut en réalité être établie quant à l'effet global de la nutrition azotée sur les processus d'infection (Fagard *et al.*, 2014). En effet, un apport important en N exogène améliore la nutrition et les défenses de la plante mais peut aussi promouvoir le développement de la maladie, en augmentant la disponibilité des composés azotés assimilables par le pathogène (Huber & Haneklaus, 2007 ; Tavernier *et al.*, 2007). Il a été montré que l'application trop importante d'un fertilisant azoté pouvait favoriser la maladie (Solomon *et al.*, 2003), c'est le cas de l'oïdium des céréales sur orge par exemple (Jensen & Munk, 1997). Cependant, la fertilisation azotée peut aussi augmenter la résistance de l'hôte, comme dans l'interaction entre *Botrytis cinerea* et la tomate (Hoffland *et al.*, 2000). Ceci suggèrerait que le rôle de N dans l'interaction plante - pathogène est complexe et spécifique de l'interaction entre une plante hôte et un pathogène donné (Dordas, 2008), c'est-à-dire du pathosystème, et dépend entre autres du mode de vie du pathogène. En plus de la quantité de N présente dans le milieu, il a également été montré que la forme de N (ammonium (NH₄⁺), nitrate (NO₃⁻), acides aminés (AA)) a une influence sur la sensibilité des plantes aux maladies (Huber & Haneklaus, 2007). Il a par exemple été montré que la taille des symptômes causés par *Fusarium* sp. sur tomate (Borrero *et al.*, 2012) ou de pourriture noire des racines (*Rhizoctonia solani*) sur betterave (Afanasiev & Carlson, 1942), augmentait en présence de NH₄⁺. Ce résultat pourrait être lié à une disponibilité plus importante des nutriments pour le pathogène, le NH₄⁺ entraînant une augmentation de la quantité de sucres et d'acides aminés dans les cellules des plantes (Gupta *et al.*, 2013). Des résultats similaires ont été obtenus sur le pathosystème *Nicotiana tabacum* - *Pseudomonas syringae*, où un régime de nutrition riche en NO₃⁻ augmentait la résistance au pathogène. Cette résistance accrue a été corrélée à une augmentation des teneurs en polyamines dans la plante (putrescine, spermidine, spermine ; Gupta *et al.*, 2013), les polyamines étant des molécules pouvant avoir un rôle dans l'augmentation de la résistance des plantes aux pathogènes (Cowley & Walters, 2002). Il existe aussi des cas où NH₄⁺ diminue l'intensité de la maladie, par exemple celles causées par *Sclerotium rolfsii* ou *Gibberella zeae* (Dordas, 2008). L'acquisition de nutriments à partir de cellules végétales et leur absorption efficace sont essentielles pour l'infection et la colonisation réussie des phytopathogènes dans les plantes hôtes (Divon & Fluhr, 2007). L'état nutritionnel des plantes joue donc un rôle dans le développement des maladies (Mur *et al.*, 2017).

L'installation des plantules est une phase cruciale du développement d'une culture. Cette phase repose sur le succès de trois étapes : la germination des graines, la croissance hétérotrophe des plantules (à l'obscurité) jusqu'à leur sortie hors du sol (levée) et leur croissance post-levée accompagnée du passage à l'autotrophie (Figure 1). Le déroulement des processus conduisant à la germination et à l'installation des plantules dépend fortement de facteurs internes à la semence (teneurs et mobilisation des composés de réserves), de facteurs environnementaux (température, humidité, etc.) et du génotype. Les stades précoces de développement de la plante sont notamment très sensibles aux variations de disponibilité en N du sol (Paul and Stitt, 1993 ; Martin *et al.*, 2002 ; Ben Hdech *et al.*, 2020) et aux maladies, généralement causées par des pathogènes transmis par les semences ou le sol (Neergaard, 1977 ; Maude and Humpherson-Jones, 1980). Des apports élevés d'engrais azotés inorganiques et de produits agrochimiques conventionnels sont largement utilisés depuis de nombreuses années, afin de protéger les semences et les plantules des différents stress qu'elles pourraient subir et de faciliter l'établissement des plantules. Cependant, ces intrants contribuent également à la formation d'oxyde nitreux (N₂O), un important gaz à effet de serre (Vitousek *et al.*, 1997 ; McSwiney and Robertson, 2005), et de grandes quantités d'engrais non utilisés se retrouvent dans les écosystèmes aquatiques, les affectant par eutrophisation et pollution (Vitousek *et al.*, 1997 ; Dobermann and Cassman, 2002 ; Howarth *et al.*, 2002), pouvant entraîner des problèmes de santé humaine. La surutilisation des pesticides, et en particulier des fongicides, a également des effets néfastes sur la biodiversité, affectant un large panel d'organismes non cibles (Helling *et al.*, 2000 ; Pozzebon *et al.*, 2010 ; Brühl *et al.*, 2013) et provoquant l'apparition de champignons pathogènes résistants (Sierotzki *et al.*, 2000 ; Russell, 2005 ; Cools and Fraaije, 2008 ; Bosch *et al.*, 2014). Dans le contexte actuel de développement de l'agriculture durable et d'évolution des exigences réglementaires du secteur semences, une limitation de l'approvisionnement en engrais azotés et une réduction substantielle du traitement des semences par des fongicides sont requises (plan français de réduction des pesticides « Ecophyto 2018 », repoussé à 2025). Toutefois, réduire les applications de fongicides pourrait favoriser l'apparition d'agents pathogènes transmis par les semences, tels que des champignons nécrotrophes, sur les semences et les plantules. De plus, l'application d'engrais azotés n'affecte pas seulement la croissance des plantules mais a également des effets sur le développement des maladies, comme montré à d'autres stades de développement de la plante (Solomon *et al.*, 2003 ; Mur *et al.*, 2017). Le rôle du N dans ces interactions n'a été, à notre connaissance, que très peu étudié lors de la germination des graines et du développement des plantules, stades pour lesquels il existe des spécificités à souligner. En effet, le stade plantule se distingue du stade adulte de par son accès à deux sources de N : une source endogène provenant de la mobilisation des réserves de la graine et une source exogène provenant de l'absorption de l'azote présent dans le milieu (sous forme de NO₃⁻ principalement). Le NO₃⁻ est également une molécule signal, impliquée dans la croissance de la racine primaire, dans le métabolisme et dans les réponses de défense de la plante (Richard-Molard *et al.*, 1999 ; Zang *et al.*, 2020). Dans ce contexte, l'impact de la fertilisation azotée sur l'interaction entre les plantes et les agents pathogènes lors de l'installation des plantules nécessite d'être davantage étudié. Par ailleurs, à notre connaissance,

aucune étude n'a jusqu'alors abordé la comparaison entre stade précoce et stade adulte sur un même pathosystème.

Objectifs

Ce travail de thèse, mené dans les deux équipes « Seedling, Metabolism and Stress » (SMS) et « Pathologies fongiques des Semences » (FungiSem) de l'UMR 1345 IRHS, avait pour objectif de décrypter le rôle de N dans les interactions plante - pathogène fongique aux stades adultes et plantules, en utilisant le pathosystème *Arabidopsis thaliana* - *Alternaria brassicicola*. *Alternaria brassicicola* est un agent pathogène nécrotrophe transmis à et par les semences, provoquant des fontes des semis chez les plantules entraînant des pertes économiques importantes. A notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise pour étudier l'effet du régime de nutrition azotée de la plante sur la sensibilité d'*A. thaliana* à *A. brassicicola*. La première partie de ce travail a donc consisté à étudier (1) comment la forme de nutrition azotée (NH_4^+ vs NO_3^-) affecte la sensibilité de la plante au champignon au stade adulte (rosette), et (2) comment la plante module son métabolisme primaire en réponse à l'infection du pathogène nécrotrophe, en fonction de sa nutrition azotée. Une étude a également été réalisée au stade plantule en cherchant à élucider (1) (comment la forme et la concentration en N (5 mM NH_4^+ vs 0,1 mM NO_3^- vs 5 mM NO_3^-) apportée affecte la sensibilité de plantules de différents génotypes au champignon, et (2) si cet effet dépend du stade de développement de la plante en le comparant au stade adulte. Nous avons, pour cette étude, développé un nouveau dispositif expérimental permettant d'évaluer le développement aérien et racinaire des plantules et de quantifier la sévérité de la maladie, dans un environnement stérile, contrôlé d'un point de vue nutritif et permettant une contamination homogène des plantules. Enfin, la dernière partie de ce travail a pour but d'expliquer l'effet de N sur l'interaction au stade plantule, et les différences éventuelles de cet effet avec celui trouvé au stade adulte. Pour cela, l'étude s'est concentrée sur les questions suivantes (1) est-ce que la composition métabolique initiale des graines pourrait affecter l'interaction au stade plantule, et (2) comment est modulée l'abondance en métabolites, et l'expression des gènes qui leur sont associés, dans la plantule, en réponse à l'infection par le champignon en fonction du génotype et de la condition azotée.

Ce manuscrit se divise donc en cinq parties : une synthèse bibliographique présentant l'état de l'art est suivie de trois chapitres de résultats présentés sous forme d'article, et enfin d'une conclusion générale et perspectives. Les trois chapitres comprennent respectivement (1) l'effet de la nutrition N sur la sensibilité des plantes au stade rosette et sur la modulation de leur métabolisme primaire en réponse au champignon, (2) le dispositif expérimental développé pour l'étude au stade plantule ainsi que les résultats de l'influence de la nutrition N et du génotype sur la sensibilité des plantules au champignon, et (3) les variations du métabolisme primaire et secondaire des graines et des plantules associé aux différences de sensibilité révélées au stade plantule.

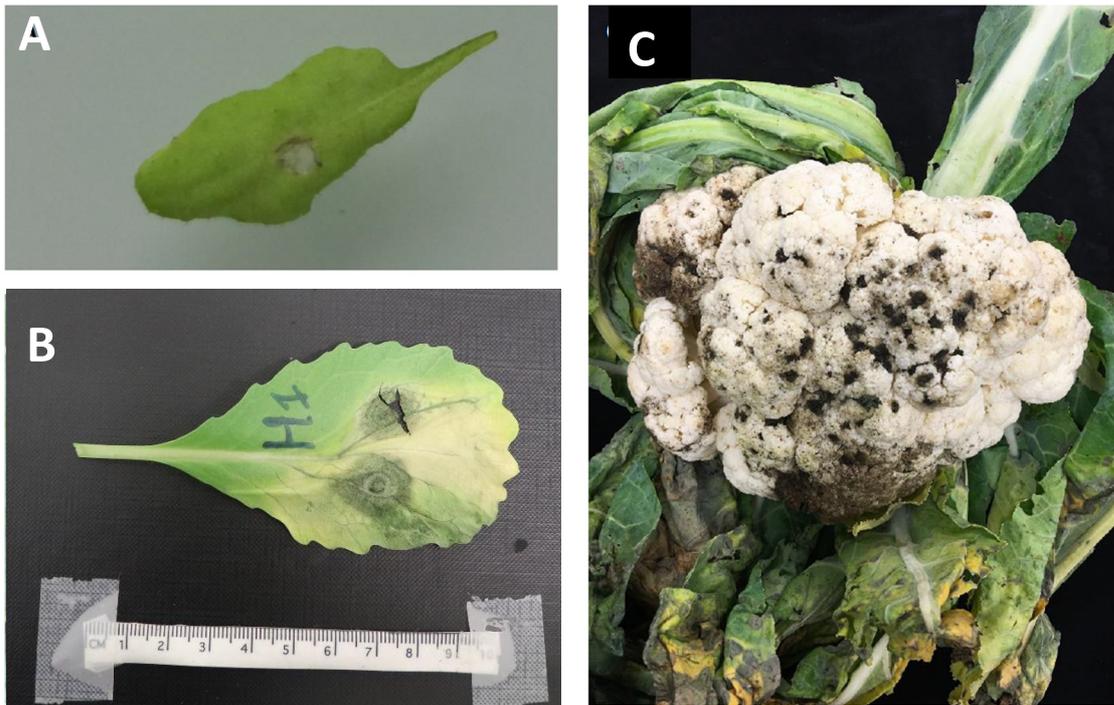


Figure 2 : Symptômes provoqués par *Alternaria brassicicola* sur Brassicacées.

A : *A. thaliana* ; B : chou (source : B. Iacomi) ; C : chou-fleur (source : Ohio State University osu.edu)

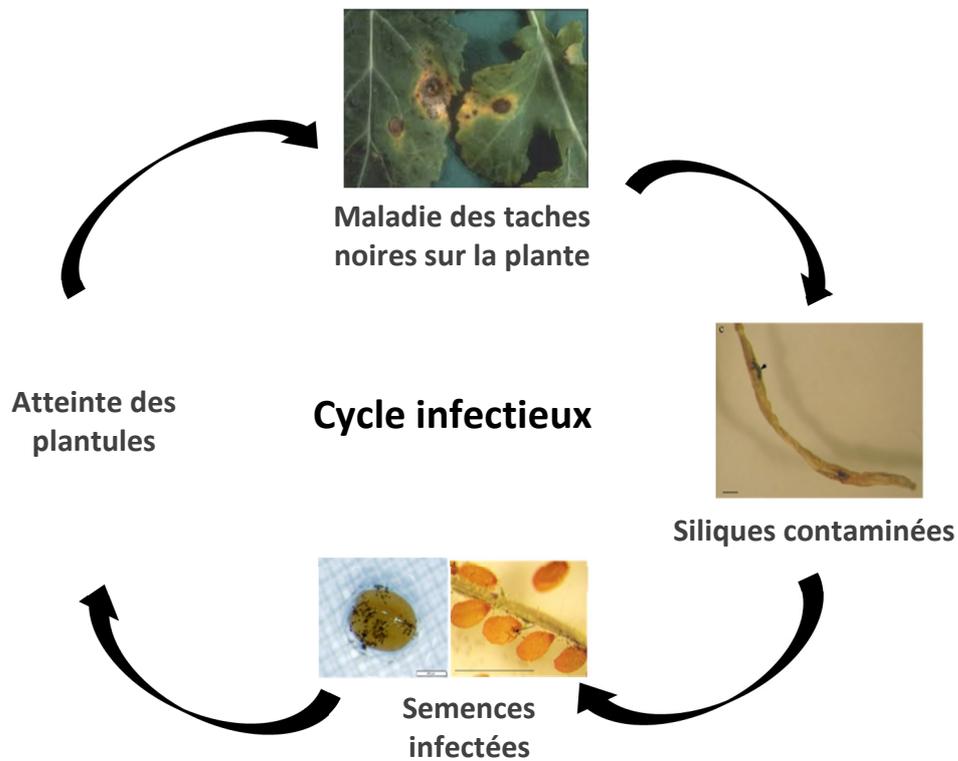


Figure 3 : Cycle infectieux d'*Alternaria brassicicola* sur les Brassicacées (adapté de Pochon *et al.*, 2012).

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

I.1. Le pathosystème *Alternaria brassicicola* / *Arabidopsis thaliana*

I.1.1. Description du pathosystème

Alternaria brassicicola (groupe : Ascomycètes ; famille : Pleosporacées,) est un champignon pathogène nécrotrophe responsable de la maladie des taches noires sur les plantes de la famille des Brassicacées (Köhl *et al.*, 2010). Un pathogène nécrotrophe infecte et tue les tissus de l'hôte avant d'en extraire des nutriments, au contraire d'un pathogène biotrophe qui se nourrit des cellules encore vivantes de l'hôte (Glazebrook, 2005). Comme toutes les alternarioses, le « black spot » apparaît sur les feuilles sous forme de lésions nécrotiques, décrites comme des taches noires entourées chacune d'un halo chlorotique jaune, rendant les feuilles impropres à la consommation (Figure 2) (Rotem, 1994). L'infection par *A. brassicicola* ne se limite cependant pas aux feuilles, elle concerne toutes les parties aériennes de la plante (par exemple, symptômes sur pomme de chou-fleur, Figure 2C). Le champignon peut en particulier contaminer les siliques et semences, qui constituent un mode de conservation et de transmission de l'inoculum fongique, faisant de l'alternariose une maladie transmise à et par la semence importante (Rimmer, 1995) (Figure 3). Le mycélium d'*A. brassicicola* peut pénétrer les siliques par les jonctions cellulaires, le *replum* ou les stomates, et le tégument des graines, soit directement, soit *via* des fissures. Il peut donc être présent de manière superficielle sur, mais aussi de manière interne dans les semences produites par les plantes contaminées. Durant la colonisation des graines, le champignon est exposé à des stress osmotiques et hydriques très sévères, faisant de sa résistance à ces stress un facteur déterminant de sa transmission à la semence (Pochon *et al.*, 2012 ; N'Guyen *et al.*, 2019). Les semences présentes dans les siliques contaminées ont tendance à flétrir et à avoir une viabilité moindre (Maude & Humpherson-Jones, 1980), causant des manques à la levée et des fontes de semis.

La maladie est d'importance économique mondiale et cause des baisses de rendement importantes sur les Brassicacées cultivées telle que le chou, le colza ou la moutarde, pouvant par exemple atteindre 20 à 50% sur le colza (Rotem, 1994). Des analyses de lots de semences ont montré que certains lots contaminés par *A. brassicicola* présentent une diminution du taux de germination pouvant être supérieure à 20% (Köhl *et al.*, 2011). La transmission à la semence d'*Alternaria* sp pose également des problèmes substantiels en agriculture biologique (Lammerts van Buren, 1994). L'interaction entre *A. thaliana*, la plante modèle des Brassicacées, et *A. brassicicola* est un pathosystème modèle de l'interaction plante / champignon nécrotrophe (Lawrence *et al.*, 2008 ; Pochon *et al.*, 2012). Il est à noter qu'il existe des différences de sensibilité entre écotypes d'*A. thaliana*, le génotype Columbia (Col-0) étant par exemple moins sensible au champignon que les génotypes Landsberg *erecta* (Ler) ou Wassilewskija (Ws), au stade rosette (Mukherjee *et al.*, 2009).

I.1.2. Les mécanismes du pouvoir pathogène d'*A. brassicicola*

Les mécanismes du pouvoir pathogène sont variés (toxines, enzymes hydrolytiques, mécanismes de résistance aux stress, etc) et l'importance de chacun dépend du type de pathogène.

Les toxines sont des facteurs importants du pouvoir pathogène chez les nécrotrophes, permettant de détruire les tissus de l'hôte et donc leur accès aux nutriments. La preuve de l'existence de toxines cruciales pour le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* reste encore à confirmer, malgré leur importance chez les pathogènes nécrotrophes. Elles le sont notamment pour *Alternaria alternata*, un champignon du même genre qu'*A. brassicicola*, qui produit des métabolites secondaires agissant comme des toxines spécifiques de leur hôte, importantes pour le pouvoir pathogène du champignon (Johnson *et al.*, 2000 ; Ito *et al.*, 2004 ; Tsuge *et al.*, 2013). Chez *A. brassicicola*, plusieurs molécules ayant potentiellement un rôle de toxine ont été identifiées, comme la dépudécine (Wight *et al.*, 2009) ou les brassicicènes (Hashimoto *et al.*, 2009). Mais leur rôle toxique n'est pas établi, excepté dans le cas de la brassicoline A, pour laquelle il a été montré qu'elle peut provoquer l'apparition de nécroses sur feuilles de moutarde brune, et pourrait donc être la phytotoxine majeure de cultures liquides d'*A. brassicicola* (Pedras *et al.*, 2009). Cette toxine semble importante mais les gènes responsables de sa production, et leur rôle effectif *in planta* dans le pouvoir pathogène, restent à déterminer (Cho, 2015).

Les champignons peuvent produire des enzymes de dégradation de la cuticule, une couche constituée de cutine (un polyester d'acide gras hydroxylé) et de cires ayant un rôle de défense physique chez les plantes (Thomma, 2003). Le rôle d'une enzyme digérant la cutine, la cutinase Pbc1, sur la pathogénicité a été étudié sur plusieurs champignons pathogènes et son importance a été démontrée, notamment chez *Colletotrichum* spp. ou *Pyrenopeziza brassicae* (Soliday *et al.*, 1984 ; Dickman & Patil, 1986 ; Li *et al.*, 2003). Le gène homologue de *Pbc1* chez *A. brassicicola* est fortement exprimé, que ce soit en condition de croissance saprophytique ou pathogénique (Yao & Köller, 1995 ; Srivastava *et al.*, 2012), mais la perte de fonction par mutation de ce gène ne provoque aucune diminution de l'agressivité du champignon (Yao & Köller, 1995). De la même façon, la lipase Fgl1 est impliquée dans les processus d'infection de *Fusarium graminearum* (Voigt *et al.*, 2005) alors que la délétion de 4 gènes de lipases chez *A. brassicicola*, dont les homologues à Fgl1, ne provoque aucune diminution du pouvoir pathogène du champignon (Cho *et al.*, 2006 ; Lawrence *et al.*, 2008). Le fait que cette cutinase et ces 4 lipases ne jouent pas de rôle dans le pouvoir pathogène ne signifie pas pour autant que ces familles d'enzymes ne participent pas à la pathogénicité d'*A. brassicicola* : il y aurait en effet jusqu'à 9 cutinases et 76 lipases prédites dans le génome du champignon (Ohm *et al.*, 2012), dont l'effet reste à caractériser.

Les pectines sont des polysaccharides structuraux importants des parois pecto-cellulosiques des plantes, qui forment une seconde barrière physique contre les attaques de champignons

pathogènes. Les enzymes pectinolytiques sont donc logiquement importantes pour le pouvoir pathogène de nombreux champignons, tels que *Botrytis cinerea* (ten Have *et al.*, 1998) ou *Claviceps purpurea* (Oeser *et al.*, 2002). Cependant, chez *A. brassicicola*, aucun des gènes étudiés par Cho *et al.* (2006) codant des enzymes dégradant les pectines ne s'est montré important pour le pouvoir pathogène du champignon, même dans le cas d'un gène très fortement exprimé en condition d'infection par le champignon (Srivastava *et al.*, 2012). La cellulose est un autre polysaccharide crucial dans la composition des parois chez les plantes. Là encore, la perte de fonction d'une cellobiohydrolase (CBH7) chez *A. brassicicola*, fortement exprimée en condition de pathogénie, n'affecte pas le pouvoir pathogène du champignon (Cho *et al.*, 2006). C'est également le cas d'autres gènes très exprimés codant des enzymes hydrolytiques, comme la N-acétylglucosaminidase, la glycosyl hydrolase, la sérine protéase ou la chymotrypsine, qui est pourtant surexprimé d'un facteur 1000 chez le champignon en condition de pathogénie par rapport à la croissance saprophytique (Cho *et al.*, 2006).

Le pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* est également dépendant de sa capacité à résister aux stress. Il est notamment soumis à un stress hydrique important lors de la colonisation des semences, celles-ci entamant une phase de dessiccation après leur maturation. Il a été montré par N'Guyen *et al.* (2019) que la résistance au stress hydrique du champignon était liée à l'activité d'hydrophilines, la mutation des gènes codant ces protéines affectant grandement la transmission à la semence du champignon. Le pouvoir pathogène de ces mutants n'est par contre pas affecté sur feuille, démontrant l'importance du stade de développement de la plante sur les facteurs impactant les interactions biotiques. Le champignon est également soumis à des stress biotiques, causés par des composés de défense de la plante infectée, notamment des isothiocyanates dérivant des glucosinolates. Les glutathion transférases (GST) sont une famille de protéines impliquées dans les processus de détoxification et dans la tolérance aux stress oxydatifs, leur activité étant nécessaire à la résistance d'*A. brassicicola* aux isothiocyanates (Calmes *et al.*, 2015).

Malgré de nombreuses études et l'identification de nombreux facteurs du pathogénicité, la nature de ceux qui sont effectivement responsables du pouvoir pathogène d'*A. brassicicola* reste à déterminer (Cho, 2015).

I.2. L'azote, un élément essentiel au développement des plantules

L'azote est un composant majeur de macromolécules (protéines, acides nucléiques), essentiel à tous les organismes vivants. Il est disponible *via* deux sources chez les plantules : une source exogène (azote du sol absorbé par les racines) et une source endogène (mobilisation des réserves de la graine).

I.2.1. L'azote présent dans le sol, source exogène d'azote

L'azote est un élément essentiel à la croissance, au développement et au métabolisme des plantes.

I.2.1.1. Le nitrate, une source essentielle d'azote pour les plantes

Le NO_3^- est la source principale de N disponible pour les plantes dans les sols bien aérés, où la nitrification est rapide et (Krapp *et al.*, 2014). La concentration en NO_3^- du sol est très variable : de 1 μM à 10 mM (Bouguyon *et al.*, 2012). Elle est le plus souvent inférieure à 1 mM dans un habitat naturel, mais elle peut atteindre 70 mM dans un sol fertilisé (Krapp *et al.*, 2014). Le NO_3^- est également le fertilisant azoté le plus utilisé en agriculture, avec le NH_4^+ et l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) (Noguero & Lacombe, 2016). Ces éléments font du NO_3^- un nutriment majeur pour les plantes. En plus de ce rôle de nutriment, le NO_3^- est également une molécule signal impliquée dans le contrôle de nombreux processus physiologiques, dans la croissance des plantes et dans le rendement (Crawford, 1995 ; Krapp *et al.*, 2014 ; Vidal *et al.*, 2014). Il est par exemple impliqué dans la régulation de l'architecture racinaire et le développement des racines latérales (Remans *et al.*, 2006 ; Pellizzaro *et al.*, 2014), dans le développement des feuilles (Chiu *et al.*, 2004) et dans l'induction de la floraison (Castro Marin *et al.*, 2011).

I.2.1.2. L'absorption de l'azote par les transporteurs

Quatre familles de transporteurs de NO_3^- ont été identifiées chez les plantes : (1) les Nitrate Transporter 1 / Peptide Transporter Family (NPF, anciennement connus sous le nom NRT1) (Léran *et al.*, 2014), (2) les Nitrate Transporter 2 (NRT2) (Krapp *et al.*, 2014), (3) les canaux chlorures (CLC) (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011) et (4) les canaux anioniques lents (SLAC) (Negi *et al.*, 2008).

Afin de maximiser leur absorption de NO_3^- dans des concentrations différentes, les plantes possèdent deux systèmes de transport adaptés à différents teneurs de NO_3^- (Miller *et al.*, 2007). Premièrement, le système de transport à faible affinité (Low Affinity Transport System ; LATS) fonctionnant quand la concentration en NO_3^- est importante, supérieure à 0,5 mM. Ce système est peu sensible, transporte une quantité importante de NO_3^- et est difficilement saturable. Deuxièmement, le système de transport à haute affinité (High Affinity Transport System ; HATS), fonctionnant quand la concentration en NO_3^- est faible, inférieure à 0,5 mM. Ce système est très sensible, mais il est rapidement saturé et son transport est de faible intensité (Lejay *et al.*, 1999). Pour chacun de ces systèmes de transport, il existe des formes constitutives et des formes induites.

NPF et NRT2 sont les familles de transporteurs de NO_3^- les plus importantes. Les familles NPF et NRT2 fonctionnent toutes les deux comme des symports $\text{NO}_3^- / \text{proton} (\text{H}^+)$, le transport du proton permettant de fournir l'énergie nécessaire au transport du NO_3^- . AtNPF6.3 (anciens noms : NRT1.1 et CHL1), le premier transporteur de NO_3^- identifié chez *A. thaliana*, appartient

à la famille des NPF (Tsay *et al.*, 1993). La protéine est composée de 590 acides aminés et forme 12 domaines transmembranaires au niveau de la membrane plasmique (Tsay *et al.*, 2007 ; Sun *et al.*, 2014). AtNPF6.3 est à la fois un senseur et un transporteur de NO_3^- , d'où l'appellation de « transcepteur » (Holsbeeks *et al.*, 2004 ; Gojon *et al.*, 2011). AtNPF6.3 est un transporteur à double affinité pour le NO_3^- , pouvant agir comme un HATS lorsqu'il est sous forme monomérique ou comme un LATS sous forme dimérique (Wang *et al.*, 1998 ; Sun *et al.*, 2014).

Des transporteurs de NH_4^+ existent aussi, permettant à la plante d'absorber cette source de N quand elle est présente au contact des racines (Pantoja, 2012). *Arabidopsis thaliana* possède 6 gènes de transporteurs de NH_4^+ de type AMT (*AMT1.1*, *AMT1.2*, *AMT1.3*, *AMT1.4*, *AMT1.5*, *AMT2.1*), cinq d'entre eux étant exprimés dans les racines alors qu'*AMT1.4* n'est exprimé que dans le pollen (Yuan *et al.*, 2007, 2009). *AMT1.1* et *AMT1.3* sont des transporteurs à capacité de transport et à affinité élevée, exprimés dans les cellules rhizodermales et corticales (Loqué *et al.*, 2006 ; Yuan *et al.*, 2007). *AMT1.5* est également localisé dans les cellules du rhizoderme, mais contribue bien moins que *AMT1.1* et *AMT1.3* à l'absorption du NH_4^+ . *AMT1.2* est un transporteur à basse affinité localisé dans les cellules corticales et de l'endoderme (Yuan *et al.*, 2007). *AMT2.1* est très différent des transporteurs de la famille des *AMT1*, et serait plus proche de transporteurs de NH_4^+ de bactéries que de plantes (Sohlenkamp *et al.*, 2000). Il se distingue également des gènes de la famille *AMT1* par son incapacité à transporter le méthylammonium et par son expression plus forte dans les parties aériennes que racinaires (Sohlenkamp *et al.*, 2000).

I.2.1.3. L'assimilation de l'azote chez les plantes

I.2.1.3.a. Réduction du nitrate en ammonium

Le NO_3^- , élément nutritif essentiel pour les plantes, représente la principale forme d'azote assimilable pour les plantes, mais son absorption représente l'étape limitante dans le métabolisme azoté des plantes (Forde, 2000). La réduction du NO_3^- se déroule en deux étapes : le NO_3^- est dans un premier temps réduit en nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase (NR), puis le nitrite est réduit en NH_4^+ par la nitrite réductase (NiR) (Stitt, 1999) (Figure 4). Ces deux réactions enzymatiques sont coûteuses en termes de molécules réductrices (NAD(P)H, ferrédoxine) (Meyer & Stitt, 2001). Chez *A. thaliana*, il existe 2 gènes de NR : *Nia1* et *Nia2* (Wilkinson & Crawford, 1993). L'activité de la NR est rapidement modulée par les contraintes environnementales, et notamment induite par la lumière et la disponibilité en NO_3^- (Kaiser *et al.*, 2002). La NR peut également catalyser une réaction secondaire conduisant à la formation de monoxyde d'azote (NO ; Rockel *et al.*, 2002), une molécule signal impliquée dans le développement des plantes et les réponses au stress (Bellin *et al.*, 2013 ; Sanz *et al.*, 2015 ; Fancy *et al.*, 2017).

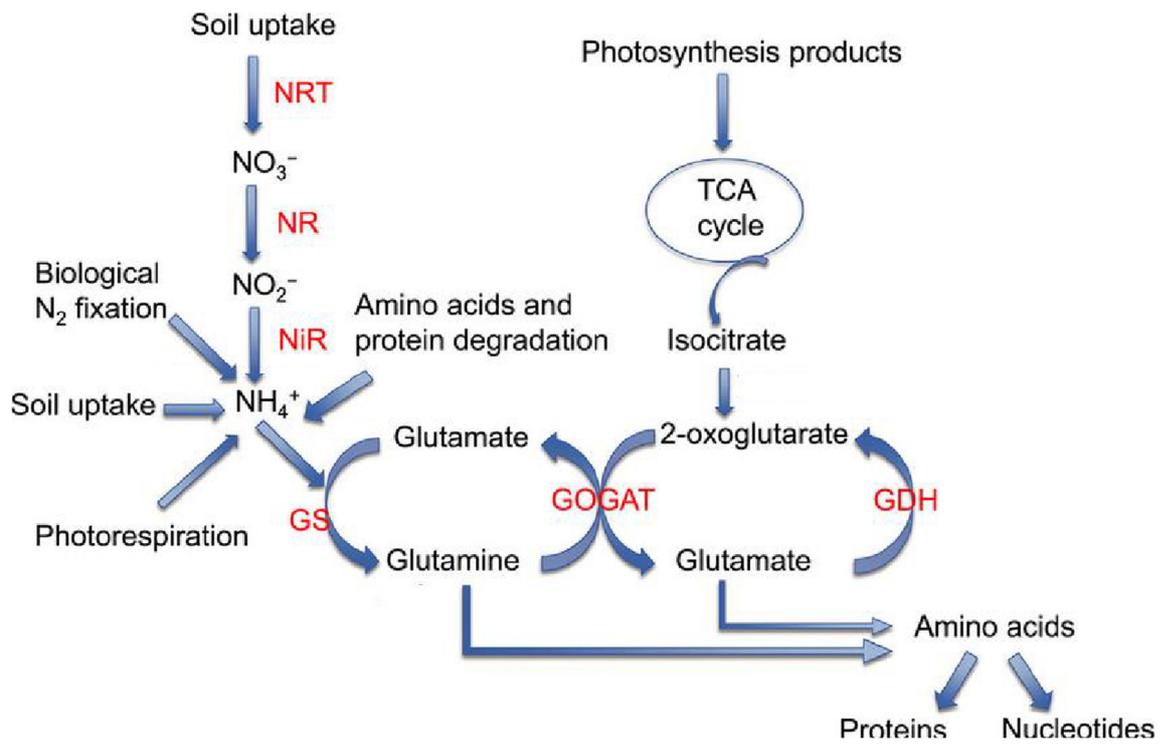


Figure 4 : Schéma bilan de l'assimilation de l'azote chez les plantes (adapté de Lu *et al.*, 2016).

NRT = transporteurs de Nitrate ; NR = Nitrate Réductase ; NiR = Nitrite Réductase ; GS = Glutamine Synthétase ; GOGAT = Glutamine-2-Oxoglutarate Aminotransférase ; GDH = Glutamate Déshydrogénase.

I.2.1.3.b. Métabolisme du glutamate

Le glutamate est une molécule centrale du métabolisme des acides aminés chez les plantes supérieures (Forde & Lea, 2007). Son groupe α -amine est directement impliqué dans l'assimilation de NH_4^+ et est ensuite transféré à tous les autres acides aminés. Le NH_4^+ est assimilé par le cycle glutamine synthétase (GS) / glutamate synthase (Glutamine-2-Oxoglutarate Aminotransférase ; GOGAT) catalysant, respectivement, la formation de glutamine à partir de glutamate et de NH_4^+ , et la formation de deux molécules de glutamate à partir d'une molécule de glutamine et d'une molécule de 2-oxoglutarate / α -cétoglutarate (Figure 4). Chez les plantes supérieures, la GS1 cytosolique (une seule isoforme) a un rôle important dans l'assimilation primaire du NH_4^+ dans les racines et dans la réassimilation de NH_4^+ généré par la dégradation des protéines dans les feuilles (Thomsen *et al.*, 2014). La GS2 (de trois à cinq isoformes) intervient, elle, principalement dans la réassimilation du NH_4^+ provenant de la photorespiration, dans les chloroplastes, ainsi que dans l'assimilation de NH_4^+ dérivant de la réduction du NO_3^- dans les plastes (Wallsgrave *et al.*, 1987). Il existe deux types de GOGAT chez les plantes, différant par les réducteurs qu'elles utilisent : la ferrédoxine-GOGAT qui a une activité importante dans les chloroplastes et la NADH-GOGAT principalement localisée dans les cellules non photosynthétiques (Nigro *et al.*, 2016).

Le métabolisme du glutamate implique aussi la glutamate déshydrogénase (GDH), qui catalyse l'interconversion entre le glutamate et le 2-oxoglutarate (Figure 2). La GDH a principalement une fonction désaminante permettant de fournir du 2-oxoglutarate pour le cycle de l'acide tricarboxylique (Krapp, 2015). Il a cependant été démontré que la formation de glutamate à partir de 2-oxoglutarate, permettant l'assimilation de NH_4^+ (fonction aminante), est induite en condition de stress abiotiques, contribuant ainsi à la détoxification du NH_4^+ dans les cellules (Zhou *et al.*, 2015 ; Hessini *et al.*, 2017).

Une fois le glutamate synthétisé, de nombreuses aminotransférases peuvent transférer le groupe amine du glutamate à d'autres molécules, pour catalyser la formation d'AA. Une large gamme d'AA est ainsi formée, incluant la glutamine, le glutamate, l'asparagine et l'aspartate qui sont des molécules porteuses de N majeures chez les plantes supérieures (Lam *et al.*, 1996).

I.2.1.4. Le rôle de l'azote dans la germination des graines et dans la dormance

L'étape de germination des graines commence par l'imbibition de celles-ci et se termine avec l'élongation de l'axe embryonnaire, avec pour conséquence observable, la protrusion de la radicule à travers le tégument de la graine (Bewley & Black, 1994). Dans certaines circonstances, cependant, des graines imbibées intactes, actives d'un point de vue métabolique, peuvent échouer à germer, malgré des conditions environnementales favorables. Ce blocage physiologique est causé par le phénomène de dormance des semences (Bewley, 1997). Les graines matures d'*A. thaliana* fraîchement récoltées, par exemple, présentent un phénomène de dormance primaire, et ne peuvent donc germer sans que la dormance soit levée, par la

maturation des graines ou par un traitement tel que la stratification (e.g. période d'imbibition au froid), l'apport de lumière ou l'apport de gibbérellines (GA) (Koornneef & Karssen, 1994).

La dormance contribue à l'adaptation des plantes à leur environnement : elle optimise la distribution de la germination d'une population de graines en fonction de la période de l'année, permettant par exemple la germination des plantes annuelles au printemps et non en automne. La dormance dépend de nombreux facteurs, par exemple les conditions de croissance de la plante mère (McCullough & Shropshire, 1970), les conditions de stockage des graines et les traitements chimiques / environnementaux qu'elles subissent (Bewley, 1997). Chez *Arabidopsis*, le tégument a un rôle important dans le maintien de la dormance. Cette dernière est en effet réduite quand le tégument est supprimé, ou chez des mutants affectés au niveau du tégument (Debeaujon & Koornneef, 2000 ; Debeaujon *et al.*, 2000). Deux phytohormones sont essentielles à la gestion des phénomènes de dormance des semences : l'acide abscissique (ABA) et GA (Bentsink & Koornneef, 2008). L'ABA est une hormone clé, promouvant la dormance (Finkelstein *et al.*, 2002), qui est en effet altérée chez des plantes mutantes déficientes en ABA. La dormance est un processus actif, liée à la synthèse *de novo* d'ABA durant l'imbibition de la graine (Finkelstein *et al.*, 2002). Les GA, au contraire, promeuvent la germination des graines (Yamaguchi & Kamiya, 2001), et les mutants déficients en GA sont affectés dans leur capacité à germer (Ross *et al.*, 1997). Chez *Arabidopsis* et la tomate, les GA ont un rôle supposé dans la levée des contraintes mécaniques imposées par les tissus entourant l'embryon (Debeaujon & Koornneef, 2000) et dans la promotion de la croissance de l'embryon. L'importance de la balance ABA / GA pour la germination est supportée par le fait que la dormance réduite de certains mutants ABA est liée à une quantité de GA nécessaire à la germination plus faible (Koornneef *et al.*, 2002). La dormance est un processus complexe et d'autres hormones que l'ABA et les GA sont impliquées, comme des brassinostéroïdes ou encore l'éthylène (Bentsink & Koornneef, 2008).

L'altération de la dormance par des facteurs environnementaux, tels que la stratification ou la lumière, semblent être liée, soit à la synthèse ou perception des GA (Hilhorst *et al.*, 1986 ; Yamauchi *et al.*, 2004), soit à la quantité d'ABA présente dans les graines imbibées (Jacobsen *et al.*, 2002 ; Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Un autre facteur environnemental lié à la dormance est NO_3^- (Alboresi *et al.*, 2005). Le NO_3^- a un effet stimulateur sur la germination d'*A. thaliana*, chez des écotypes peu dormants comme Col-0 (Alboresi *et al.*, 2005), chez des écotypes plus dormants comme *Ler* (Batak *et al.*, 2002) ou *Ws* (Alboresi *et al.*, 2005) et chez des écotypes très dormants comme l'écotype Cap Verde Island (*cvi* ; Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Le rôle du NO_3^- sur la germination semble dû à un effet signal et non à un effet nutritionnel, l'apport de glutamine ou de NH_4^+ ne stimulant pas la germination des graines d'*A. thaliana* (Alboresi *et al.*, 2005).

En plus du NO_3^- , d'autres composés azotés sont capables de lever la dormance des graines d'*A. thaliana*, comme le nitrite ou le cyanure (CN^-). Bethke *et al.* (2006) ont montré que l'effet de ces trois molécules sur la dormance dépendait en réalité du NO. Ils ont tout d'abord montré que

l'action du piègeur de NO, c-PTIO (2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide), qui élimine le NO des tissus et solutions, renforçait la dormance de la graine d'*Arabidopsis*, et que donc l'absence de NO renforçait la dormance. Ils ont ensuite montré qu'en présence de c-PTIO, et donc en absence de NO, NO₃⁻, le nitrite et le cyanure perdait leur effet sur la dormance, démontrant ainsi le caractère nécessaire du NO à ce phénomène. Ils ont enfin montré que l'apport de NO purifié sous forme gazeuse ou d'un donneur de NO (SNP; sodium nitroprusside) sur des graines réduisait la dormance de celles-ci. L'effet du NO₃⁻ sur la germination dépend donc bien du NO, synthétisé à partir de NO₃⁻.

Il a aussi été montré qu'un traitement NO₃⁻ (Matakiadis *et al.*, 2009) ou NO (Liu *et al.*, 2009) sur les graines d'*A. thaliana* induisait une diminution rapide de la quantité d'ABA, et donc une levée de la dormance. Cette diminution pourrait être attribuée aux ABA 8'-hydroxylases codées par la famille de gène *CYP707A* (*CYP707A1* à *CYP707A4*), impliquée dans le catabolisme de l'ABA et ayant un rôle dans le contrôle de la dormance des graines chez *A. thaliana*. En effet, la mutation de *CYP707A1* ou de *CYP707A2* provoque une augmentation de la dormance des graines, ainsi que des niveaux d'ABA observés dans celles-ci (Okamoto *et al.*, 2006). De plus, l'expression de *CYP707A2* est induite par la présence de NO₃⁻ (Matakiadis *et al.*, 2009) ou de NO (Liu *et al.*, 2009). Il apparaît ainsi que l'effet stimulateur du NO₃⁻ sur la germination est dû à l'action du NO qui induirait des gènes responsables du catabolisme de l'ABA, tel *CYP707A2*, modifiant ainsi la balance ABA / GA responsable de la dormance. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'en absence de traitement le NO s'accumule dans la graine durant les premiers stades de l'imbibition (pic atteint 3h après le début de l'imbibition) (Liu *et al.*, 2009) et qu'ensuite, 6h après le début de l'imbibition, l'expression du gène *CYP707A2*, dont les ARNm sont déjà hautement accumulés dans les graines sèches, est induite (Kushiro *et al.*, 2004).

I.2.2. La mobilisation des réserves de la graine, source endogène d'azote et de carbone

Trois phases peuvent être distinguées lors du développement des graines orthodoxes (qui ont l'aptitude à survivre à l'état sec et à pouvoir ensuite reprendre un métabolisme normal après le retour à des conditions hydriques favorables), catégorie dont font partie les graines d'*A. thaliana* (Delahaie, 2013). La première phase correspond à l'embryogenèse, caractérisée par les divisions et élongations cellulaires. Cette activité cellulaire intense s'accompagne d'une forte augmentation de la teneur en eau. La seconde phase correspond au remplissage, stade au cours duquel les réserves (sucres, lipides, protéines) s'accumulent dans les cellules de la graine. Cette accumulation se traduit par une augmentation de la masse fraîche et sèche des graines, et par une diminution de la teneur en eau. La troisième et dernière étape est la dessiccation des graines, au cours de laquelle la teneur en eau des graines diminue très fortement. Cette étape est fondamentale pour la qualité physiologique et la longévité de la graine. La maturation de la graine comprend les étapes deux et trois, et est caractérisée par l'accumulation des composés de stockage et l'acquisition de la dormance et de la tolérance à la dessiccation (Goldberg *et al.*, 1994).

Quelle que soit la graine, le stockage des réserves est essentiel afin d'assurer la croissance post-germinative des plantules, jusqu'à l'établissement de la photosynthèse. Les 3 composants majeurs de réserves sont les sucres, les triacylglycérols (TAG) et les protéines de stockage spécialisées (SSP), dont les proportions varient selon l'espèce considérée (Baud *et al.*, 2008). Les réserves peuvent représenter jusqu'à 90% du poids sec des graines. Dans les graines sèches d'*A. thaliana*, les SSP et les TAG représentent chacun environ 30 à 40 % du poids sec (Baud *et al.*, 2002). Durant l'étape de maturation, les ARNm les plus présents dans les graines d'*A. thaliana* codent des SSP, qui seront source d'azote pour la plantule. Les deux SSP majeures chez *A. thaliana* sont une globuline 12S (la cruciférine) et une albumine 2S (l'arabine) (Heath *et al.*, 1986) qui sont stockées dans des vacuoles de stockage des protéines de réserve. Les TAG, qui serviront de squelette carboné et de source d'énergie pour la plantule, sont des esters de glycérol et des acides gras (Miquel & Browse, 1995).

Concernant les sucres, l'amidon, le glucose et le fructose s'accumulent durant la première moitié du développement de la graine d'*A. thaliana* mais il en reste très peu dans la graine sèche à la fin de son développement. Le saccharose, au contraire, est accumulé à la fin du développement de la graine (Focks, 1998). Quant aux AA libres, ils représentent 0,2 % de la matière sèche à la fin du développement de la graine chez l'écotype Ws d'*A. thaliana*, mais ont représenté jusqu'à 2,8 % de la matière sèche durant la maturation. Les AA les plus présents chez la graine mature sont l'asparagine (13 %), la sérine (16 %), la glutamine (25 %), la glycine (13 %) et l'alanine (10 %) (Baud *et al.*, 2002).

Durant la germination, les réserves stockées sous forme de lipides, protéines ou sucres sont hydrolysées et leurs produits d'hydrolyse utilisés pour la croissance de la plantule. Les SSP sont hydrolysées en AA par des enzymes protéolytiques. La plupart des AA ainsi obtenus sont ensuite transportés dans les tissus en développement où ils serviront à la synthèse d'enzymes et de protéines structurales. Certains de ces AA subiront une déamination et pourront ensuite, soit servir à la synthèse de composés non azotés, soit être métabolisés pour fournir de l'énergie à la plantule (Ashton, 1976). Les enzymes protéolytiques impliquées dans la mobilisation des réserves protéiques durant la germination peuvent être classées en deux catégories : les endopeptidases qui hydrolysent des liaisons au sein des polypeptides et les exopeptidases qui hydrolysent les extrémités des polypeptides (Ashton, 1976). Ces protéinases se retrouvent dans la graine à partir de l'étape de la maturation, durant laquelle elles sont stockées dans les mêmes compartiments que les SSP. Des mécanismes existent pour empêcher la dégradation des SSP durant la maturation de la graine, comme par exemple le maintien des enzymes protéolytiques dans une forme inactive. Au début de la germination, ces protéinases doivent donc être réactives pour initier la mobilisation des protéines de stockage. Des mécanismes de changements structuraux des SSP, pour les rendre temporairement inaccessibles aux enzymes protéolytiques existent aussi (Müntz *et al.*, 2001).

I.3. Le rôle de l'azote lors d'un stress biotique chez les plantes

I.3.1. Généralités sur la défense des plantes

La sensibilité d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola* est dépendante de deux catégories de mécanismes de défense : les défenses constitutives, qui sont présentes avant l'infection, et les défenses induites par le pathogène. Les défenses constitutives peuvent être mécaniques, mais également chimiques, comme dans le cas des composés antimicrobiens que sont les phytoanticipines (glucosinolates chez les Brassicacées) (Osbourn, 1996). Malgré la sensibilité d'*A. brassicicola* à certains isothiocyanates, provenant de l'hydrolyse des glucosinolates, ce mode de défense n'est pas toujours efficace dans le cas de l'interaction entre *A. thaliana* et *A. brassicicola* (Sellam *et al.*, 2007). Les défenses induites, plus efficaces en général que les défenses constitutives (Agrawal & Karban, 1999), sont activées par la reconnaissance d'un motif moléculaire associé aux pathogènes (Pathogen-associated molecular pattern ; PAMP), comme la flagelline des bactéries ou des composants issus de la paroi des champignons, par un récepteur de reconnaissance de motif moléculaire (pattern recognition receptor ; PRR). Cette reconnaissance déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la mise en place d'une réponse immunitaire basale, la PAMP-Triggered Immunity (PTI). Les organismes pathogènes pouvant produire des effecteurs capables de bloquer la PTI, certaines plantes se sont adaptées et sont capables de synthétiser des protéines de résistance reconnaissant les effecteurs, ce qui conduit à une réponse immunitaire plus forte (ETI ; Effector-Triggered Immunity), qui provoque généralement une réaction hypersensible chez la plante (Jones & Dangl, 2006).

Les défenses induites sont associées à la production rapide d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de NO par la plante. La fonction des ROS dans l'établissement des défenses des plantes est double : elles combinent en effet une fonction de signal et une toxicité vis-à-vis du pathogène (Torres, 2010). Les défenses induites aboutissent également à la formation de composés participant à la défense de la plante : les phytoalexines issues du métabolisme secondaire des plantes et les PR-protéines (Pathogenesis-related proteins).

Trois phytohormones, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène jouent un rôle majeur dans la régulation des défenses des plantes. Le réseau de régulation contrôlé par ces phytohormones est très complexe, mais, généralement, le SA est lié à l'activation des défenses contre les pathogènes biotrophes alors que le JA et l'éthylène sont associés à la défense contre les pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005). De plus, les voies de défense liées au SA et au JA seraient mutuellement antagonistes (Kunkel & Brooks, 2002). Ces voies de défense modifient l'expression de nombreux gènes associés aux défenses des plantes, tels que le gène *Plant Defensin 1-2 (PDF1.2)* qui dépend du JA ou le gène *Pathogenesis Related 1 (PRI)* qui lui dépend du SA (Kunkel & Brooks, 2002). La voie du JA est importante pour la défense d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*. En effet, Thomma *et al.* (1998) ont montré que la présence du champignon induisait chez Col-0 l'induction de gènes comme *PDF1.2*, et que des mutants non sensibles au JA étaient plus sensibles au champignon.

I.3.2. Le rôle du métabolisme primaire de l'azote dans les défenses des plantes

L'azote peut influencer la sensibilité des plantes aux pathogènes. Le statut nutritif de la plante a un impact sur la biosynthèse des AA, ce qui affecte en conséquence l'expression des gènes, notamment ceux liés aux défenses des plantes. La reconfiguration des métabolismes primaires et secondaires des plantes, liée à l'infection par un pathogène, est également influencée par l'azote présent (Ward *et al.*, 2010). Fabro *et al.* (2004) ont par exemple montré que la synthèse de la proline pouvait être induite par un pathogène, *Pseudomonas syringae*, chez *A. thaliana*, et que cette induction favorisait une réponse hypersensible liée à la voie du SA. Dans le cas d'un autre AA, le GABA, l'accumulation a été observée en réponse à une gamme de stress biotiques (Kinnersley & Turano, 2000). La présence du champignon *Cladosporium fulvum*, par exemple, augmenterait la teneur en AA, dont le GABA, présents dans des plants de tomate (Solomon & Oliver, 2001). Des résultats similaires obtenus dans l'interaction *A. thaliana* / *A. brassicicola* ont montré que l'infection par le champignon provoquait une augmentation de la teneur en GABA dans la plante, et qu'un apport de GABA exogène augmentait la sévérité de la maladie (Botanga *et al.*, 2012).

La concentration en N semble de plus modifier la production de défenses constitutives impliquant les alcaloïdes (Stout *et al.*, 1998) et les phénols (Johnson *et al.*, 1987). La production de défenses constitutives est un phénomène coûteux pour la plante, et en cas de déficit en N, il pourrait y avoir compétition pour le N disponible entre la croissance et la mise en place de défenses, ce qui pourrait diminuer l'efficacité de ces dernières (Herms & Mattson, 1992 ; Huot *et al.*, 2014). Une remobilisation de N peut également se produire chez les plantes en réponse à l'attaque d'un pathogène, afin de diminuer la quantité de nutriments accessibles pour le pathogène (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Olea *et al.* (2004) ont par exemple montré qu'une augmentation de l'expression de l'asparagine synthétase (formation d'asparagine et de glutamate à partir d'aspartate et de glutamine) était observée dans le phloème de feuilles de tomates infectées par *Pseudomonas syringae*, conduisant probablement à un transport de l'asparagine, et donc de nutriments, hors de la zone d'influence du pathogène.

A ce jour, plusieurs transporteurs de NO_3^- de la famille des NRT2 ont pu être identifiés comme impliqués dans les défenses des plantes, tels que AtNRT2.6-1 dans l'interaction entre *Erwinia amylovora* et *A. thaliana* (Dechorgnat *et al.*, 2012), AtNRT2.5 chez *A. thaliana* en réponse à l'infection par *Alternaria brassicae* (Vahabi *et al.*, 2018) et AtNRT2.1 dans le pathosystème *A. thaliana*/*P. syringae*. Camaño *et al.* (2012) ont par exemple montré que AtNRT2.1 avait un effet négatif sur la résistance d'*A. thaliana* à *P. syringae*, l'inactivation de *AtNRT2.1* rendant *A. thaliana* plus résistant à ce pathogène biotrophe. Cette différence de sensibilité s'expliquerait par une répression des voies de défense des plantes liées au SA par AtNRT2.1.

Les rôles de N dans les défenses des plantes incluent la formation de NO chez la plante. Le NO est une molécule signal majoritairement issue de la réduction du nitrite par la NR (Kaiser *et al.*, 2002 ; Rockel *et al.*, 2002). La forme de N est importante dans la formation du NO, le NO_3^- est

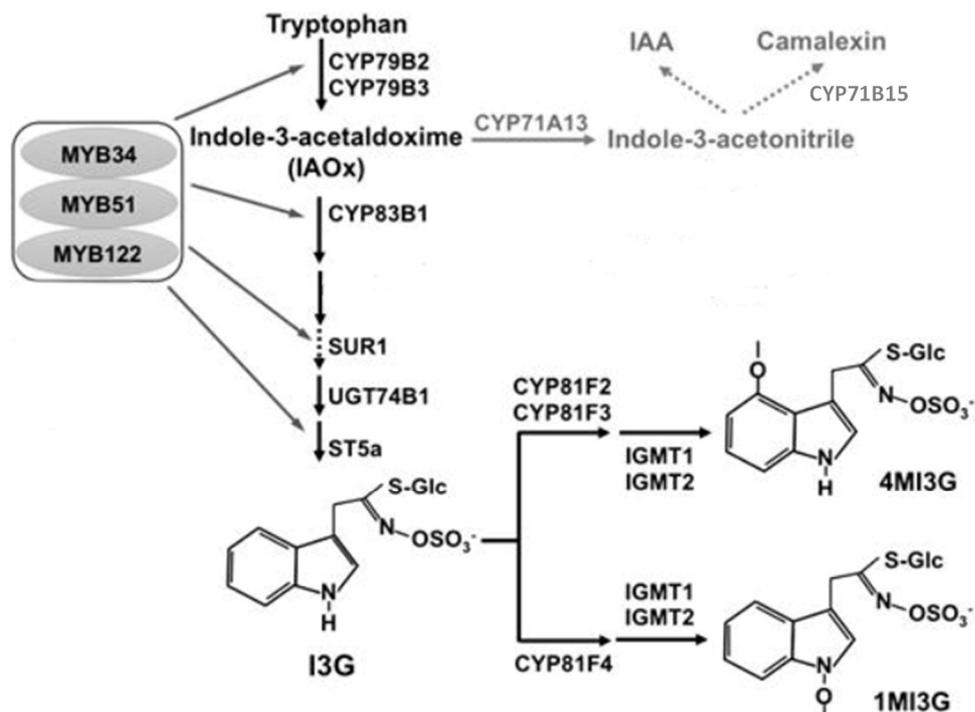


Figure 5 : Voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques et de la camalexine. (adapté de Xu *et al.*, 2016)

I3G = 3-indolylméthyl glucosinolate ; 4MI3G = 4-méthoxy-3-indolylméthyl glucosinolate ; 1MI3G = 1-méthoxy-3-indolylméthyl glucosinolate.

en effet nécessaire à la formation de NO par la NR, l'activité de cette dernière étant inhibée par NH_4^+ (Losada *et al.*, 1970). Le NO, qui est rapidement accumulé en condition de stress biotique, est une molécule d'importance capitale dans la résistance des plantes aux pathogènes. Il joue en effet un rôle dans l'accumulation des phytoalexines (Noritake *et al.*, 1996), sert de signal lors de la PTI et de l'ETI (Delledonne *et al.*, 1998) et influence la formation de papilles (appositions aux parois cellulaires formant la première ligne de défense aux champignons ; Prats *et al.*, 2005). L'un des effets les plus importants causé par la production de NO liée à la PTI et à l'ETI est l'initiation de la biosynthèse du SA (Durner *et al.*, 1998), le NO étant un composant essentiel de la voie de signalisation conduisant aux phénomènes de résistance provoqués par le SA, comme la réponse hypersensible (Mur *et al.*, 2013).

I.3.3. Le rôle des composés du métabolisme secondaires dérivant d'acides aminés dans les défenses : GSL, camalexine et polyamines

I.3.3.1. Les glucosinolates

I.3.3.1.b. Généralités sur les glucosinolates

Les GLS, qui sont caractéristiques de la famille des Brassicacées, représentent le groupe de métabolites secondaires le plus important en quantité chez *A. thaliana*, avec plus de 36 composés décrits (Hogge *et al.*, 1988 ; Brown *et al.*, 2003). Ils sont synthétisés à partir d'une gamme d'AA (méthionine, tryptophane et phénylalanine) et sont déterminants pour expliquer la résistance de l'hôte vis-à-vis de pathogènes nécrotrophes comme *A. brassicicola* (Kliebenstein, 2004). La première étape de la biosynthèse des GLS est l'oxydation du groupe amine par des monoxygénases à cytochrome P450 spécifiques, codés par la famille de gènes CYP79 (Du *et al.*, 1995 ; Wittstock & Halkier, 2000) (Figure 5). Après la formation de ce composé, le transfert d'un glucose et d'un groupe sulfate permet de créer le squelette de base des GLS, à partir duquel la diversité des GLS pourra être créée (Halkier & Du, 1997). Les GLS sont caractérisés par un atome de carbone central lié à un glucose *via* une liaison soufrée, à un groupe sulfate *via* un azote et à une chaîne latérale variable dérivant d'un AA. Les GLS sont classés en différentes familles, en fonction de leur chaîne latérale. L'expression de l'activité biologique d'un GLS nécessite son hydrolyse par une enzyme de type myrosinase. Les GLS et les myrosinases sont spatialement séparés au sein de la plante tant que ses tissus sont intacts, mais ils peuvent entrer en contact les uns avec les autres à la suite de dommages aux tissus de la plante, causés par des insectes ou des champignons par exemple. L'entrée en contact des GLS et des myrosinases permet ainsi la création de produits d'hydrolyse variés, incluant les nitriles, les isothiocyanates, les thiocyanates, les oxazolidine-2-thiones et les épithionitriles (Bones & Rossiter, 1996 ; Halkier & Du, 1997). Les myrosinases classiques chez *A. thaliana* sont les thioglucoside glucohydrolases (TGG), codées par une famille de 6 gènes (*TGG1* - *TGG6* ; Xu *et al.*, 2004). TGG1 et TGG2 ont une activité d'hydrolyse des glucosinolates

redondantes, et représentent les myrosinases principales dans les feuilles, (Barth & Jander, 2006). En effet, les plantes ayant perdu ces deux gènes sont entièrement incapables d'hydrolyser les GLS aliphatiques, et leur capacité à hydrolyser les GLS indoliques est très réduite (Barth & Jander, 2006). En comparaison, *TGG3* et *TGG6* sont exprimés dans les fleurs et particulièrement dans les étamines et les pétales, et *TGG4* et *TGG5* dans les racines (Zhang, 2002 ; Barth & Jander, 2006). Il existe également une myrosinase plus atypique, exprimée dans les feuilles en réponse à une attaque de pathogène, PENETRATION2 (PEN2) (Frerigmann *et al.*, 2016). Cette myrosinase est notamment capable d'hydrolyser le GLS indolique 4-méthoxy-3-indolylméthyl glucosinolate (Bednarek *et al.*, 2009).

Des essais *in vitro* ont montré que des produits purifiés d'hydrolyse de GLS avaient un effet toxique sur une large gamme de bactéries, de champignons et de nématodes. Il a par exemple été montré que le produit majeur d'hydrolyse des GLS chez Col-0, le 4-méthylsulphinylisothiocyanate (4-MSOITC) (produit à partir du GLS majoritaire dans les feuilles de Col-0, la glucoraphanine, un GLS aliphatique), était toxique *in vitro* sur de nombreux champignons et bactéries. Les pathogènes biotrophes étaient tous sensibles au 4-MSOITC, alors que les champignons nécrotrophes *B. cinerea* et *A. brassicicola* y étaient résistants. Ce contraste entre les organismes biotrophes et nécrotrophes pourrait s'expliquer par le fait que l'action des nécrotrophes induit la destruction des tissus et donc l'hydrolyse des GLS, créant ainsi une pression sélective vis-à-vis des défenses face aux glucosinolates chez les nécrotrophes (Tierens *et al.*, 2001). Il a cependant été montré par Tao *et al.* (2022) que la biosynthèse du 4-méthoxyindole-3-ylméthyl glucosinolate, un GLS indolique, à partir de la glucobrassicine, diminuait la sensibilité d'*A. thaliana* et de *Brassica oleracea* à *A. brassicicola*. L'effet des GLS sur les pathogènes pourrait donc être assez spécifique, et dépendant du GLS et de l'organisme pathogène.

I.3.3.1.b. Biosynthèse des glucosinolates indoliques

Arabidopsis thaliana utilise le tryptophane comme précurseur pour la production de GLS indoliques, de camalexine et d'auxine (Bender & Celenza, 2009). Cette voie de synthèse est présentée dans la Figure 5. La première étape de cette production est la conversion du tryptophane en indole-3-acétaldoxime (IAOx) par les enzymes redondantes cytochrome P450 CYP79B2 et CYP79B3 (Hull *et al.*, 2000 ; Mikkelsen *et al.*, 2000). Le double mutant pour ces deux enzymes ne possède ni camalexine ni GLS indolique, mettant en évidence le fait que ces deux enzymes contrôlent la seule voie de synthèse de ces deux produits (Zhao *et al.*, 2002 ; Glawischnig *et al.*, 2004). Ainsi, les GLS et la camalexine sont produits exclusivement à partir d'IAOx, contrairement à l'auxine (Normanly *et al.*, 2005).

L'étape de la voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques suivant la formation d'IAOx et la conversion de celui-ci par l'enzyme cytochrome P450 CYP83B1, aboutissant à la formation d'un dérivé de S-alkylthiohydroxymate (Bak & Feyereisen, 2001 ; Hansen *et al.*, 2001). La mutation de ce gène ne cause qu'une perte partielle des teneurs en GLS indoliques (Bak & Feyereisen, 2001 ; Bak *et al.*, 2001). Il est possible que CYP83A1, connu pour son rôle dans la

synthèse des GLS aliphatiques dérivés de la méthionine, puisse compenser en partie la perte d'activité de CYP83B1 (Hemm *et al.*, 2003 ; Naur *et al.*, 2005). La voie de biosynthèse des GLS indoliques continue ensuite avec l'enzyme C-S lyase SUR1, impliquée dans la synthèse de toutes les familles de GLS. En effet, la mutation de ce gène cause une absence totale de GLS dans les plantes mutantes (Mikkelsen *et al.*, 2004). UGT74B1, une glucosyltransférase, réalise l'étape suivante de la voie de synthèse, pour les GLS de toutes les familles (Grubb *et al.*, 2004). Les étapes décrites ci-dessus correspondent à la formation du noyau de la structure des GLS indoliques, ces composés devant ensuite subir des modifications de leurs chaînes latérales. Ces réactions sont réalisées dans le cas des GLS indoliques par les monooxygénases cytochrome P450 de la sous famille CYP81F (Harun *et al.*, 2020). CYP81F1, CYP81F2 et CYP81F3 peuvent réaliser des réactions d'hydroxylation aux positions 1 et 4 de l'anneau indole, convertissant le 3-indolylméthyl glucosinolate (glucobrassicine), respectivement en 1-hydroxy-3-indolylméthyl glucosinolate (1OH13M) et 4-hydroxy-3-indolylméthyl glucosinolate (4OH13M), alors que CYP81F4 ne peut le faire que sur le premier C (Pfalz *et al.*, 2009, 2011). Une dernière étape dans la biosynthèse des glucosinolates indoliques est la conversion du 1OH13M et du 4OH13M, respectivement, en 1-méthoxy-3-indolylméthyl glucosinolate et 4-méthoxy-3-indolylméthyl glucosinolate. Les enzymes capables de réaliser cette conversion du groupe hydroxyl en groupe méthoxy sont les indole glucosinolate O-méthyltransférases (IGMTs) codées par les gènes *IGMT1* and *IGMT2* (Pfalz *et al.*, 2009, 2011).

La synthèse des glucosinolates indoliques est régulée par trois facteurs de transcription de la famille MYB : MYB34, MYB51 et MYB122, leur présence induisant l'expression des gènes de toute la voie de biosynthèse (Celenza *et al.*, 2005 ; Gigolashvili *et al.*, 2007 ; Frerigmann & Gigolashvili, 2014). MYB34 régule les GLS indoliques à travers les voies de signalisation de l'ABA et du JA, alors que MYB51 et MYB122 sont liés aux voies du SA et de l'éthylène (Frerigmann & Gigolashvili, 2014 ; Frerigmann *et al.*, 2016). Ces trois facteurs de transcription MYB sont très proches de facteurs de transcription régulant la voie des GLS aliphatiques, MYB28, MYB29 et MYB76 (Hirai *et al.*, 2007 ; Sønnderby *et al.*, 2007 ; Gigolashvili *et al.*, 2008). Les protéines MYB semblent donc être chez *A. thaliana* un mécanisme de régulation des gènes de biosynthèse de toutes les familles, avec une spécialisation selon la famille.

I.3.3.2. La camalexine

Chez les Brassicacées, les phytoalexines sont cruciales à l'explication de la résistance de l'hôte vis-à-vis de pathogènes nécrotrophes comme *A. brassicicola* (Kliebenstein, 2004). La phytoalexine majeure d'*A. thaliana* est la camalexine, une phytoalexine indolique dérivant exclusivement du tryptophane et de l'IAOx (Normanly *et al.*, 2005 ; Sellam *et al.*, 2007 ; Figure 5). L'enzyme cytochrome P450 71B15 (CYP71B15, aussi appelée PAD3) est responsable de la dernière étape de la biosynthèse de la camalexine (Schuhegger *et al.*, 2006). La synthèse de la camalexine est induite lors de l'infection par un pathogène nécrotrophe comme *A. brassicicola* ou *Botrytis cinerea* (Thomma *et al.*, 1999). L'étude d'un mutant de *CYP71B15*, incapable de synthétiser de la camalexine, a permis de démontrer l'effet de celle-ci sur la

Polyamines in higher plants

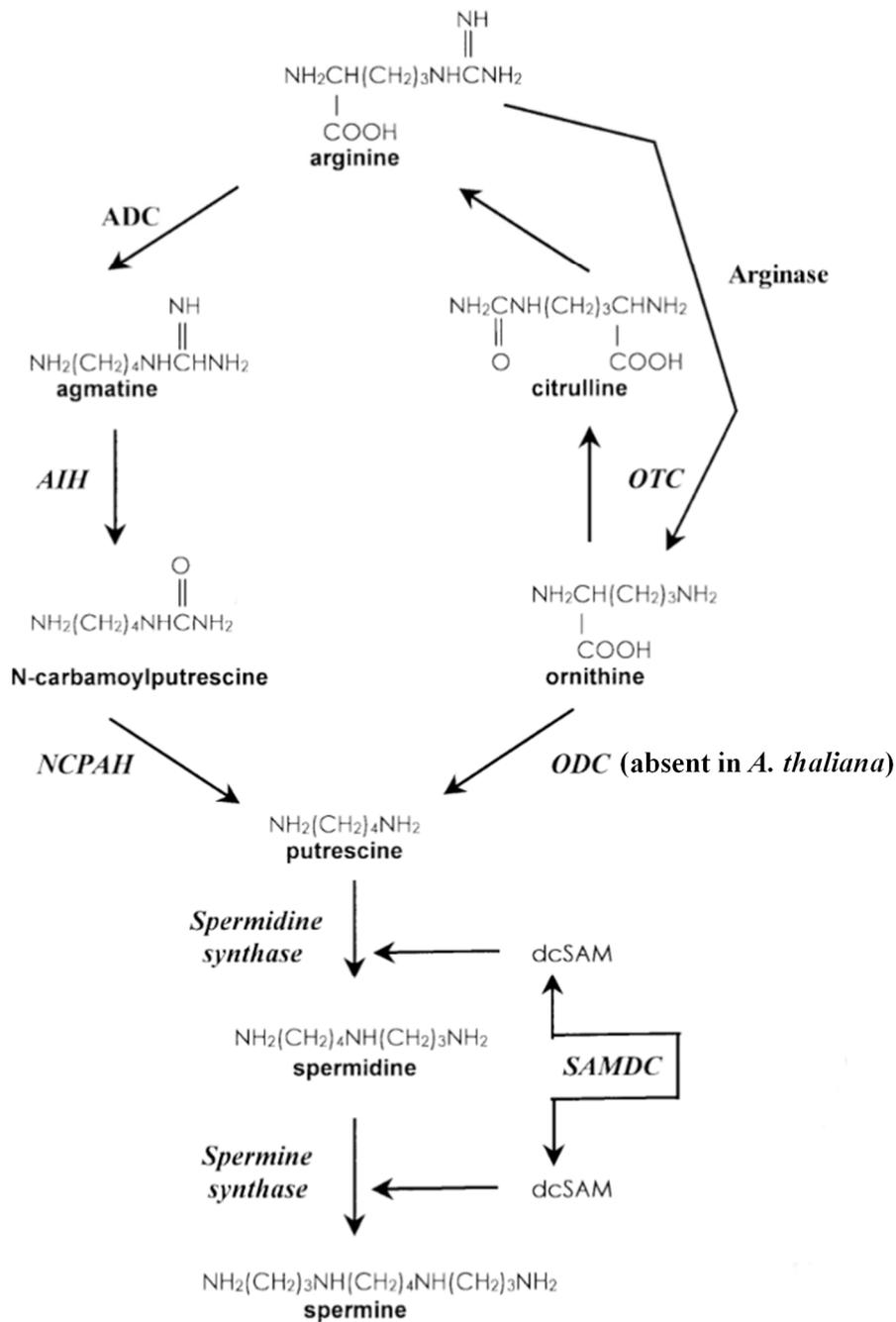


Figure 6 : Voie de biosynthèse des polyamines (Put, Spd, Spm) chez les plantes. (adapté de Bagni & Tassoni, 2001).

ADC = arginine décarboxylase ; AIH = agmatine iminohydrolase ; dcSAM = S-adénosylméthionine décarboxylée ; NCPAH = N-carbamoylputrescine amidohydrolase ; OTC = ornithine transcarbamoylase ; SAMDC = S-adénosylméthionine décarboxylase.

résistance à *A. thaliana*. La taille des nécroses et le nombre de conidies sont en effet bien plus importants chez les feuilles des mutants par rapport aux plantes sauvages (Thomma *et al.*, 1999). La mutation semble également affecter la sensibilité de la plante à la transmission à la semence du champignon, celle-ci étant favorisée chez le mutant par rapport à la plante sauvage Col-0 (NGuyen, 2015). L'action de la camalexine semble assez spécifique, elle ne semble pas provoquer de diminution des symptômes chez des pathogènes biotrophes comme *P. syringae* (Glazebrook & Ausubel, 1994) ou *Peronospora parasitica* (Glazebrook *et al.*, 1997), ni même chez un autre pathogène nécrotrophe comme *B. cinerea*, qui induit pourtant la synthèse de camalexine chez la plante (Thomma *et al.*, 1999).

I.3.3.3. Les polyamines

Les polyamines sont des amines aliphatiques présentes dans toutes les cellules des organismes vivants, et sont essentielles au fonctionnement de la cellule (Jiménez-Brémont *et al.*, 2014 ; Pal & Janda, 2017). Les polyamines les plus abondantes sont la diamine putrescine (Put ; 1,4-diaminobutane) et les polyamines dites supérieures, la triamine spermidine (Spd ; 1,8-diamino-4-aza-octane) et les tétraamines spermine (Spm ; 1,12-diamino-4,9-diazadodécane) et thermospermine (Tspm ; 1,12-diamino-4,8-diazadodécane). D'autres composés font partie des polyamines, comme par exemple la cadavérine (Cad ; 1,5-diaminopentane) ou le 1,3-diaminopropane (Bagni & Tassoni, 2001). L'abondance relative de ces polyamines chez les plantes dépend de l'espèce et du stade de développement. Elles sont de manière générale particulièrement concentrées dans les tissus en croissance et chez les plantes soumises à des stress biotiques et abiotiques (Rodriguez-Kessler *et al.*, 2008 ; Alcazar *et al.*, 2010 ; Hussain *et al.*, 2011). L'abondance en polyamines dans les cellules est contrôlée par plusieurs processus : leur biosynthèse, leur catabolisme, leur transport, la compartimentation et leur conjugaison (Kusano *et al.*, 2007 ; Carbonell & Blazquez, 2009 ; Jiménez-Brémont *et al.*, 2014). La biosynthèse, le catabolisme et la conjugaison des polyamines seront développées dans la suite de cette partie.

I.3.3.3.a. Biosynthèse des polyamines

Il existe, chez les plantes, deux voies de synthèse de la Put (Martin-Tanguy, 2001). La première de ces voies commence par une étape de décarboxylation de l'AA arginine par l'arginine décarboxylase (ADC), produisant de l'agmatine (Figure 6). Cette dernière est ensuite métabolisée en N-carbamoylputrescine par la N-carbamoylputrescine iminohydrolase (AIH). Ce produit est enfin converti en Put par l'enzyme N-carbamoylputrescine amidohydrolase (NCPAH). La seconde voie de synthèse de la Put ne contient qu'une seule étape, la conversion de l'AA ornithine, dérivant de l'arginine, en Put grâce à l'ornithine décarboxylase (ODC). Cependant ce gène est absent chez beaucoup de membres de la famille des Brassicacées, dont *A. thaliana* (Jiménez-Brémont *et al.*, 2004 ; Fuell *et al.*, 2010), la synthèse de Put chez ces plantes ne s'effectuant donc que grâce à la première voie décrite. Il existe, chez les plantes de

la famille des Brassicacées, deux gènes paralogues codant pour l'ADC (*ADC1* et *ADC2* ; Galloway *et al.*, 1998 ; Hummel *et al.*, 2001). La disruption de chacun de ces deux gènes pris séparément ne cause pas de changement phénotypique majeur, mais la délétion des deux est létale (Urano *et al.*, 2005). Enfin, ces deux gènes représentent le facteur limitant pour le début de la voie de biosynthèse des polyamines (Fuell *et al.*, 2010 ; Amrani *et al.*, 2019).

La synthèse des polyamines supérieures nécessite de la S-adenosylméthionine décarboxylée (dc SAM), servant de donneur d'aminopropyl, et généré par la S-adenosylméthionine décarboxylase (SAMDC). La dc SAM est utilisée par la spermidine synthase (SPDS), qui forme de la Spd à partir de Put en ajoutant un groupe aminopropyl. Une réaction d'aminopropylation de plus permet de former de la Spm ou de la Tspm à partir de Spd, respectivement grâce aux enzymes spermine synthase (SPMS) et thermospermine synthase (TSPMS). Le génome d'*A. thaliana* contient 4 gènes codant pour des SAMDC, 2 pour des SPDS (*SPDS1* et *SPDS2*), 1 gène de SPMS (*SPMS*) et 1 gène de TSPMS (*ACL5*) (Fuell *et al.*, 2010).

La Cad est synthétisée à partir de la lysine par la lysine décarboxylase. Cette enzyme est présente chez les bactéries mais aussi chez des plantes supérieures comme les Poacées, les Fabacées et les Solanacées (Smith & Wilshire, 1975). La lysine est le précurseur principal de la Cad, mais elle peut aussi provenir de l'homarginine, *via* l'homoagmatine, chez certaines plantes comme *Lathyrus sativus* (Ramakrisna & Adiga, 1976). Aucune relation claire entre la Cad et les autres polyamines (Put, Spd, Spm) n'a pour le moment été trouvée (Bagni & Tassoni, 2001).

I.3.3.3.b. Rôle des polyamines dans les défenses des plantes, en lien avec leur catabolisme et leur conjugaison

Le métabolisme des polyamines chez les plantes connaît des changements importants lors d'une interaction avec un organisme pathogène. L'abondance en polyamines, ainsi que l'activité des enzymes associées à leur métabolisme, augmente fortement dans les tissus infectés par un pathogène, qu'il soit biotrophe ou nécrotrophe (Walters, 2003 ; Hussain *et al.*, 2011). La modulation du métabolisme des polyamines est si importante que certains micro-organismes (*Rhodococcus fascians* par exemple) ont développé des mécanismes pour manipuler l'abondance en polyamines de leur hôte (Stes *et al.*, 2011). Le rôle des polyamines dans les défenses des plantes est dépendant des mécanismes de catabolisme oxydatif et de conjugaison des polyamines.

Le catabolisme des polyamines est assuré par deux familles d'enzymes, les diamine oxydases (DAO) et les polyamines oxydases (PAO). Les DAO sont des homodimères avec du cuivre en groupe prosthétique, catabolisant préférentiellement les diamines comme la Cad et la Put. L'oxydation de la Put, par exemple, produit du H₂O₂, du NH₄⁺ et du γ -aminobutanal (Frederico & Angelini, 1991 ; Moschou *et al.*, 2008). Il existe chez *Arabidopsis* au moins dix gènes potentiels de DAO, quatre d'entre eux ayant été caractérisés (Planas-Portell *et al.*, 2013). Les PAO utilisent le FAD (flavine adénine dinucléotide) comme cofacteur et oxydant

principalement la Spd et la Spm, produisant du H₂O₂. Il existe 5 gènes codant pour des PAO chez *A. thaliana*, *PAO1* et *PAO5* s'exprimant dans le cytosol et *PAO2*, *PAO3*, *PAO4* dans le péroxysome (Moschou *et al.*, 2008 ; Takahashi *et al.*, 2010 ; Fincato *et al.*, 2011). L'activité des DAO et des PAO est induite par l'augmentation de polyamines libres causée par l'infection par le virus de la mosaïque du tabac et par *Blumeria graminis*, respectivement chez des plantes résistantes de tabac et d'orge (Marini *et al.*, 2001 ; Cowley & Walters, 2002). La résistance de ces plantes à ces pathogènes dépend de la réponse hypersensible, activée par la production de H₂O₂, et il est concevable que l'activité de ces enzymes participe à l'induction de la réponse hypersensible. La production d'H₂O₂ semble également promouvoir les défenses des plantes *via* d'autres mécanismes, comme le renforcement des parois ou l'activation de MAP kinases (Cona *et al.*, 2006 ; Nanda *et al.*, 2010).

La conjugaison des polyamines est un autre mécanisme impliqué dans la régulation de la concentration cellulaire en polyamines libres (Bagni & Tassoni, 2001). La proportion de polyamines sous forme conjuguées par rapport aux polyamines sous forme libres est loin d'être négligeable, et peut représenter jusqu'à 90% des polyamines chez certaines espèces comme le tabac (Torrighiani *et al.*, 1987). Différentes hydroxycinnamoyl transférases catalysent la conjugaison de groupements caffeoyl, cinammoyl ou feruloyl-CoA aux molécules de Put ou de Spd. L'augmentation des teneurs en polyamines libres dans les tissus infectés s'accompagne d'une augmentation des teneurs en polyamines conjuguées (Rodriguez-Kessler *et al.*, 2008 ; Muroi *et al.*, 2009), ces composés ayant des propriétés antifongiques (Mackintosh *et al.*, 1997 ; Walters *et al.*, 2001). Muroi *et al.* (2009) ont notamment montré que l'accumulation de polyamines conjuguées, comme la p-coumaroylputrescine ou la feruloylputrescine, dans les feuilles d'*Arabidopsis* en réponse à l'inoculation par *A. brassicicola* diminuait la sensibilité de la plante au champignon.

I.3.4. Le rôle de l'azote dans la nutrition et la pathogénicité des champignons

Un pathogène entrant pour la première fois en contact avec un hôte est en situation de carence nutritive, l'assimilation rapide des nutriments de l'hôte est donc essentielle pour le succès de l'infection (Snoeijsers *et al.*, 2000). L'azote utilisé par les champignons pathogènes pour leur croissance provient exclusivement de leur hôte, sous forme de NO₃⁻, de NH₄⁺ ou d'AA. Certaines études suggèrent que le N provenant de la plante est limitant pour le pathogène, et qu'une carence en N influencerait le développement de la maladie (Thomma *et al.*, 2006 ; Lopez Berges *et al.*, 2010), alors que d'autres études prouveraient le contraire, qu'il y aurait toujours assez de N dans les plantes pour la croissance du champignon (Solomon *et al.*, 2003 ; Pageau *et al.*, 2006 ; Tavernier *et al.*, 2007).

Certains composés azotés (NH₄⁺, glutamine, glutamate) sont utilisés préférentiellement par les champignons membres du phylum des Ascomycètes. Quand ces sources primaires de N ne sont pas disponibles dans le milieu, ou sont en quantités limitantes pour leur croissance, les champignons sont capables d'utiliser une gamme de sources de N très variées : NO₃⁻, nitrite,

purines, amides, AA, protéines (Marzluf, 1997). L'utilisation de ces sources secondaires de N est très régulée et nécessite presque toujours la synthèse d'enzymes cataboliques et de perméases spécifiques, réprimées lorsque les sources primaires sont disponibles. Cette répression des enzymes et perméases impliquées dans l'utilisation d'autres sources d'azote que les sources primaires est appelée Nitrogen Metabolite Repression (NMR) ou Nitrogen Catabolite Repression (Wiame *et al.*, 1985 ; Marzluf, 1997). L'utilisation du NO_3^- , par exemple, requiert la synthèse *de novo* des NR et NiR (Fu & Marzluf, 1988). Plus de 100 gènes sont soumis à la NMR chez *Aspergillus nidulans*. Ainsi, les gènes des voies de dégradation des sources secondaires de N ne sont pas exprimés en présence de sources plus faciles à assimiler, augmentant la vigueur du champignon au sein de son environnement local instable. La synthèse *de novo* des perméases et enzymes nécessaires à l'utilisation d'une source de N secondaire est contrôlée au niveau de la transcription et requiert, le plus souvent, deux signaux : un signal global de dérèpression des sources secondaires de N et un signal spécifique indiquant la présence d'un substrat particulier (Caddick *et al.*, 1994 ; Marzluf, 1997). Il existe cependant également des systèmes contrôlés uniquement par la NMR (Shaffer *et al.*, 1988). La NMR est régulée par des gènes de régulation globaux, comme *AREA* chez *Aspergillus nidulans* (Arst & Cove, 1973 ; Caddick, 1992) ou son équivalent *nit-2* chez *Neurospora crassa* (Fu & Marzluf, 1987). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription de la famille des protéines de régulation GATA, et possèdent un domaine de liaison à l'ADN très conservé (Kudla *et al.*, 1990 ; Fu & Marzluf, 1990), consistant en un motif en doigts de zinc de type Cys₂/Cys₂ avec une boucle centrale de 17 AA. Le nom de la famille de ces facteurs de transcription provient du fait qu'ils se fixent tous à des séquences d'ADN possédant en leur cœur une séquence GATA. *AREA* et *nit-2* sont régulés par la teneur en glutamine présente dans les cellules du champignon (Wiame *et al.*, 1995).

La NMR, de par son impact sur la nutrition du champignon, est liée à la pathogénie. En effet, la régulation de la nutrition azotée, grâce aux régulateurs globaux de l'azote *AREA / nit-2*, est essentielle à l'adaptation du pathogène à l'environnement de son hôte durant l'attaque (Marroquin-Guzman, 2017). Ainsi, le mutant perte de fonction pour l'homologue d'*AREA* chez le champignon *Magnaporthe grisea* est incapable d'utiliser le NO_3^- et, bien qu'il soit toujours pathogène sur riz, cause des lésions moins importantes que la souche sauvage. Dans le cas du pathogène de haricot *Colletotrichum lindemuthianum*, le mutant de délétion pour l'orthologue d'*AREA* est spécifiquement affecté dans la transition entre ses phases biotrophe et nécrotrophe, causant des lésions moindres que la souche sauvage (Pellier *et al.*, 2003). La mutation du gène *AREA* provoque une baisse de la virulence chez plusieurs autres champignons : *Fusarium graminearum* (Min *et al.*, 2012), *Fusarium verticilloides* (Kim & Woloshuk, 2008) ou encore *Ustilago maydis* (Horst *et al.*, 2012). De plus, *AREA* contrôle une partie majeure du métabolisme cellulaire, dont beaucoup d'enzymes cataboliques incluant nombre de protéases impliquées dans la pathogénie fongique (Marzluf, 1997).

La présence, au sein de la plante, de certains AA (comme le GABA) pourrait favoriser la nutrition et le développement du champignon phytopathogène. Le champignon *Cladosporium*

fulvum, par exemple, causerait une augmentation de la teneur en AA, dont le GABA, dans des plants de tomate (Solomon & Oliver, 2001). Cette augmentation serait due à une manipulation de la plante par le champignon, la plante produisant ainsi plus d'AA pour la nutrition de ce dernier, le GABA étant de plus une source de N très efficace pour la croissance du champignon en condition *in vitro* (Solomon & Oliver, 2002). *Cladosporium fulvum* étant un pathogène biotrophe, il serait toutefois difficile d'appliquer directement ces résultats à notre pathosystème. Cependant, des résultats similaires obtenus dans l'interaction *A. thaliana* / *A. brassicicola* ont montré que l'infection par le champignon augmentait la teneur en GABA dans la plante, et qu'un apport de GABA exogène augmentait la sévérité de la maladie (Botanga *et al.*, 2012).

Chapitre II. Effet de la nutrition azotée sur la sensibilité des plantes au stade rosette et sur la modulation de leur métabolisme primaire en réponse au champignon

II.1. Introduction

Le présent travail, mené au stade rosette, a pour but d'étudier (1) (si et) comment la forme de nutrition azotée (NO_3^- vs NH_4^+) affecte la sensibilité de la plante au champignon, et (2) comment la plante module son métabolisme en réponse à l'infection du pathogène nécrotrophe, en fonction de sa nutrition azotée. Pour cela, des plants d'*A. thaliana* cultivés en hydroponie, en présence soit d'un milieu NO_3^- (5 mM) soit d'un milieu NH_4^+ (5 mM), ont été inoculés par *A. brassicicola*. Les symptômes ont été mesurés et différentes analyses ont été effectuées pour expliquer la différence de sensibilité observée entre les deux conditions azotées. En accord avec nos objectifs, le métabolisme primaire et en particulier celui de N, de son absorption par les transporteurs à son assimilation en AA, a été le point central de notre étude. Ce travail est présenté dans l'article « Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the necrotrophic fungus, *Alternaria brassicicola* », publié dans la revue *Physiologia Plantarum*.

II.2. Article numéro 1: Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the necrotrophic fungus, *Alternaria brassicicola*

Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the necrotrophic fungus, *Alternaria brassicicola*

Thibault Barrit | Alexis Porcher | Caroline Cukier | Pascale Satour |
 Thomas Guillemette | Anis M. Limami | Béatrice Teulat  | Claire Campion |
 Elisabeth Planchet 

Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, France

Correspondence

Elisabeth Planchet, Univ Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France.

Email: elisabeth.planchet@univ-angers.fr

Funding information

French Ministry of Agriculture and Food and the Regional Council of Pays de la Loire; National Agronomy School "Institut Agro - Agrocampus Ouest"

Edited by: J.K. Schjoerring

Abstract

The impact of the form of nitrogen (N) source (nitrate versus ammonium) on the susceptibility to *Alternaria brassicicola*, a necrotrophic fungus, has been examined in *Arabidopsis thaliana* at the rosette stage. Nitrate nutrition was found to increase fungal lesions considerably. There was a similar induction of defence gene expression following infection under both N nutritions, except for the *phytoalexin deficient 3* gene, which was overexpressed with nitrate. Nitrate also led to a greater nitric oxide production occurring *in planta* during the saprophytic growth and lower nitrate reductase (*NIA1*) expression 7 days after inoculation. This suggests that nitrate reductase-dependent nitric oxide production had a dual role, whereby, despite its known role in the generic response to pathogens, it affected plant metabolism, and this facilitated fungal infection. In ammonium-grown plants, infection with *A. brassicicola* induced a stronger gene expression of ammonium transporters and significantly reduced the initially high ammonium content in the leaves. There was a significant interaction between N source and inoculation (presence versus absence of the fungus) on the total amino acid content, while N nutrition reconfigured the spectrum of major amino acids. Typically, a higher content of total amino acid, mainly due to a stronger increase in asparagine and glutamine, is observed under ammonium nutrition while, in nitrate-fed plants, glutamate was the only amino acid which content increased significantly after fungal inoculation. N nutrition thus appears to control fungal infection via a complex set of signalling and nutritional events, shedding light on how nitrate availability can modulate disease susceptibility.

1 | INTRODUCTION

Nitrogen (N) is one of the most important macronutrients in plants and is crucial for plant growth and development. In the past decades, N fertilization has been heavily used to increase plant productivity, this practice has considerable impact on the environment, and furthermore, it may increase N availability for pathogen growth and plant disease development (Neumann et al., 2004; Solomon et al., 2003; Tavernier et al., 2007). Although high plant N supply is believed to cause stronger plant disease susceptibility, no general rule can be drawn about the overall effect of N nutrition on the infection

processes. In fact, the effect of N nutrition depends on host plant-pathogen interactions (Dordas, 2008), in particular, the pathogenic lifestyle and pathosystems. For instance, it is commonly observed that high N supply enhances susceptibility to biotrophs and hemibiotrophs while it reduces that to necrotrophs (Ballini et al., 2013; Dordas, 2008; Snoeijs et al., 2000). In addition, the N form has been reported to influence the ability of plants to cope with pathogen attacks, with either enhanced or decreased disease resistance (Huber & Watson, 1974). For example, nitrate (NO_3^-) has been shown to increase disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola and *Fusarium oxysporum* in tobacco and cucumber, respectively (Gupta

et al., 2013; Sun et al., 2021), while ammonium (NH_4^+) has been reported to increase resistance against *P. syringae* and *F. oxysporum* in tomato (González-Hernández et al., 2019; López-Berges et al., 2010). The specific effects of the N form during a host-pathogen interaction involving a necrotrophic fungus have been poorly investigated.

Most plants use inorganic nitrogen, NO_3^- and NH_4^+ , as their primary N source. The uptake of NO_3^- by roots and its translocation to the other plant organs involve both low and high-affinity transporter systems (LATS and HATS) (Wang et al., 2012). These two types of nitrate transporter systems were classified in two families, respectively, nitrate transporter1/peptide transporter family (NPF, previously called NRT1) for LATS (Léran et al., 2014) and nitrate transporter 2 (NRT2) for HATS (Nacry et al., 2013). Among the members of the NRT2 family, NRT2.1 appears to be the major component of the NO_3^- HATS in *Arabidopsis thaliana* (Orsel et al., 2002). Once absorbed, NO_3^- is reduced to nitrite by the cytosolic nitrate reductase (encoded by *NIA1* and *NIA2*). Given that nitrite is toxic for plant cells, it is quickly reduced to NH_4^+ by the chloroplastic nitrite reductase. Besides the fact that NH_4^+ can be derived from the primary nitrate reduction, it can also be directly absorbed from the medium through ammonium transporters (AMT). In *A. thaliana*, five homologs (AMT1.1 to AMT1.5) constitute the AMT family, while AMT2.1 is the only member belonging to the methylammonium permease subfamily (Hao et al., 2020). Similar to NRT2.1, AMT1.1 expression appears to be regulated by the N sources and their concentrations (von Wirén et al., 2000). NH_4^+ is then assimilated through the combined action of glutamine synthetase (GS), which exists in cytosolic and chloroplastic isoforms (GS1 and GS2, respectively), catalyzing the ATP-dependent condensation of NH_4^+ with glutamate to produce glutamine, and of glutamate synthase (GOGAT), which catalyzes the transfer of the amide group of glutamine to oxoglutarate to synthesize glutamate. These successive reactions, illustrating the GS/GOGAT cycle, represent the major pathway for primary N assimilation in plants. While a single gene encoding GS2 (*GLN2*) is present in the *A. thaliana* genome, GS1 is encoded by five isogenes (*GLN1.1* to *GLN1.5*). *GLN1.2* has been reported to be the main isozyme contributing to shoot GS1 activity in vegetative growth stages and to be upregulated to relieve NH_4^+ toxicity (Guan et al., 2016). Alternatively, glutamate dehydrogenase (GDH) can also catalyze in vitro NH_4^+ incorporation into glutamate by reductive amination of 2-oxoglutarate. In *A. thaliana*, NAD(H)-GDH is encoded by three genes (*GDH1*, *GDH2*, and *GDH3*). *GDH2* was found to be the most expressed gene, in this family, in both shoots and roots, and NH_4^+ nutrition induced its expression in both tissues (Sarasketa et al., 2014). Glutamate plays a central role in amino acid (AA) metabolism and secondary metabolites in higher plants (Forde & Lea, 2007), and it is positioned at a “crossroad” between carbon (C) and N metabolisms, therefore controlling several metabolic processes that have a role in plant defence (Seifi et al., 2013).

Nutrient acquisition from plant cells and their efficient absorption is essential for the establishment and successful infection of phytopathogens in host plants (Divon & Fluhr, 2007). Plant nutritional status thus plays a role in disease development (Mur et al., 2017). It has been shown that plant defence responses against pathogens are

notably linked to the plant's ability to mobilize N through NO_3^- and NH_4^+ transporters and to assimilate $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ into AAs, which are precursors of the defence molecules (Ballini et al., 2013; Dietrich et al., 2004; Fagard et al., 2014; Thalineau et al., 2018; Zeier, 2013). It has previously been demonstrated, in *A. thaliana* rosettes, that the disruption of the high-affinity NO_3^- transporter (NRT2) reduced susceptibility to *P. syringae* (Camañes et al., 2012) and induced a lower tolerance to *Erwinia amylovora* (Dechorgnat et al., 2012). Similar results were obtained with *A. thaliana* lines impaired in the NH_4^+ transporter (AMT1.1), which displayed an enhanced resistance against *Plectosphaerella cucumerina*, and reduced susceptibility to *P. syringae* (Pastor et al., 2014). To deal with pathogens, plants have evolved sophisticated defence mechanisms, including inducible and constitutive resistance mechanisms. Contrary to the constitutive defence, which typically consists of physical barriers and pre-formed chemical compounds, the pathogen-induced plant resistance depends on the activation of downstream defence responses (Sun et al., 2020). In general, the phytohormones jasmonic acid and ethylene are important regulators of the induced systemic resistance against necrotrophic pathogens, whereas the phytohormone salicylic acid plays a central role in the systemic acquired resistance against biotrophic pathogens (Dong, 1998). In addition to these phytohormones, nitric oxide (NO) is another mediator involved in plant resistance against various pathogens and is considered one of the major defence activators (Delledonne et al., 1998; Mur et al., 2013). The best characterized enzymatic source for NO synthesis in plants is the NAD(P)H-dependent nitrate reductase involving the nitrite reduction to NO (Planchet & Kaiser, 2006).

Alternaria brassicicola is a necrotrophic fungal pathogen (Glazebrook, 2005), altering the aerial plant parts at all the growth stages. Shortly after leaf penetration, *A. brassicicola* produces toxins, hydrolytic enzymes and necrosis-related proteins on cultivated Brassica species (Otani et al., 1998). The cell lysis and death cause black leaf spot disease and promote the absorption of nutrients from the aboveground tissues of *A. brassicicola* hosts. To our knowledge, no study has been undertaken to study the effect of the plant N nutrition regime on the susceptibility of *A. thaliana* to *A. brassicicola*. The present work, conducted at the rosette stage, aims to study (1) how *A. thaliana* affects plant susceptibility to the fungal pathogen, following the form of N nutrition (NO_3^- vs. NH_4^+), and (2) how plants modulate their metabolism following the plant N nutrition in response to necrotrophic infection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experimental materials and growth conditions

Seeds of *A. thaliana* (Col-0 ecotype) were sown in pots with soil and grown in a growth chamber (8/16 h light/dark, 21°C). After 4 weeks, plants were individually transferred to a hydroponic system containing a modified Murashige and Skoog medium (5 mM KNO_3 , 0.5 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 50 μM iron-EDTA, and 0.5 ml L^{-1} microelements buffered with 0.5 g L^{-1}

MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, pH 5.7) for 2 weeks. Afterwards, the plants were placed in a new hydroponic nutrient solution containing either nitrate (5 mM KNO₃) or ammonium (5 mM NH₄Cl in the presence of 5 mM K₂SO₄) as a N source for 2 weeks. The nutrient solution (pH 5.7) was replaced every week.

The *A. brassicicola* wild-type strain Abra43 was initially isolated from *Raphanus sativus* seeds (Belmas et al., 2018) and was routinely grown and maintained on potato dextrose agar at 24°C.

2.2 | Infection assays

For plant infection assays, 5 µl drops of *A. brassicicola* (Abra43) conidia suspension (10⁵ conidia ml⁻¹ in water) were inoculated on leaves from 8 weeks old plants. For control plants, 5 µl drops of H₂O were used. The plants were then maintained for 2 days under saturating humidity (100% relative humidity). Foliar symptoms were quantified at 7 days post-inoculation (dpi) by manually measuring the lesion area surface. H₂O-treated and Abra43-inoculated leaves were then harvested (4 leaves by rosette; 18 plants per N and inoculation conditions), immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Five independent experiments were performed.

2.3 | Expression profiling by quantitative real-time reverse transcription-PCR

For total RNA extraction, leaves were grounded in liquid nitrogen with a mortar and pestle. The homogenous powder was treated with TRI Reagent (Ambion) according to the manufacturer's protocol. After DNase treatment, cDNAs were obtained by reverse transcription (RT) of 1 µg of total RNA using 6 µl of iScript RT supermix5X (Bio-rad). The reaction mixture was incubated for 5 min for a priming step (25°C), followed by the RT step (20 min, 46°C). Real-time quantitative PCR was performed using the SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, strictly following the manufacturer's instructions, and using the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-rad). The PCR-reaction was incubated for 30 s at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 10 s at 60°C. The specificity of the PCR amplification procedure was checked with a heat-dissociation protocol (from 65 to 95°C) after the final cycle of PCR. Each measurement was carried out with the three biological repeats, using a triplicate PCR reaction for each modality for determining Ct values. Each gene expression was normalized to the expression level of the reference gene (*Actin*). The primer sequences used for quantitative RT-PCR are listed in Table S1.

2.4 | Metabolite profiling

For detection of total free AAs and organic acids (AO), harvested leaf samples were first lyophilized and ground with glass beads (3 mm) using a TissueLyser (Qiagen) at 30 Hz for 1 min. Polar metabolites were extracted with 400 µl methanol/1 ml chloroform/400 µl water.

Alpha-aminobutyric acid and phthalic acid were used as internal standards. The polar phase was dried using a speed vac (Genevac) and then solubilized in 1 ml deionized water. Standardized volumes of samples were dried and derivatized with 50 µl methoxyamine hydrochloride in pyridine (20 mg ml⁻¹) for 90 min at 30°C and then with 50 µl *N*-methyl-*N*-tert-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide for 30 min at 70°C. Analyses were carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a 436-GC coupled to a Simple Quadrupole (SQ) SCION MS (Bruker). Compounds were separated on a BR5MS column (Bruker; 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane, 30 m × 0.23 mm i.d, 0.25 µm film thickness). The GC was operated in a constant pressure mode with helium as carrier gas (1 ml min⁻¹). Injection (0.25 µl) was performed in split mode 1/4. The elution profile was 70°C for 1 min, a linear gradient of 5°C min⁻¹ to 300 and 300°C for 5 min, resulting in a total run time of 56 min. The injector MS transfer line and source temperatures were 290 and 220°C, respectively. Mass spectra were collected using electron impact ionization at 70 eV. The GC-MS was operated in the SIM detection mode at mass range *m/z* 50–650. Three independent experiments were performed.

For the quantitation of sugar and nitrate contents, derivatized samples were diluted two times and analysed by HPLC, with 100 mM NaOH on a Carpac PA-1 carbohydrate column at 30°C (Dionex Corp.) using pulsed amperometric detection, as described by Tetteroo et al. (1994) (sugars), or with 12 mM NaOH on an AS11-HC hydroxide-selective-anion-exchange column (Dionex Corp.) using conductimetric detection, as described by the product manual for IonPac AS11 (ThermoScientific) (nitrate). All metabolic data were normalized to dry weight. Three independent experiments were performed.

To measure leaves ammonium content, a colourimetric assay method was used according to Vega-Mas et al. (2015). In a flat bottom spectrometric microplate (greiner 96 well), 50 µl of extracts containing polar metabolites (used for metabolite profiling, see above) were mixed with, in the order, 100 µl of sodium phenoxide (330 mM) dissolved in NaOH (160 mM, pH ≈ 13), 50 µl of sodium nitroprusside (0.02%) and 100 µl of sodium hypochlorite (0.2%). Absorbance was read at 635 nm after 30 min incubation at room temperature. A standard curve was prepared from 10 mM ammonium sulphate solution to determine the NH₄⁺ content. Three independent experiments were performed in duplicate.

2.5 | Endogenous NO detection by fluorescence

The fluorophore 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA; Sigma-Aldrich) was used for fluorometric NO determination. *A. thaliana* leaves were pre-incubated with DAF-2DA (10 µM) in MES buffer (5 mM, pH 6) for 30 min at 21°C in darkness and then rinsed twice with MES buffer for 10 min to remove excess fluorophore. DAF-2DA fluorescence (495 nm excitation and 515 nm emission wavelength) was observed by microscopy (LEICA DM4500B) connected to a fluorescence detection system L5. Two independent experiments were performed. Fluorescence quantification was made using the R software.

2.6 | Statistical analysis of data

Statistical analyses were carried out with the RStudio Software (version 1.2.1335). Parametric tests (analysis of variance [ANOVA] followed by Tukey's HSD test in the case of multiple comparisons, Student's *t* test in the case of additional side-by-side comparisons) were performed when the conditions of normal distribution and homogeneity of variances were met. Otherwise, nonparametric tests (ANOVA using permutation tests for multiple comparisons or Wilcoxon-Mann-Whitney test for additional side-by-side comparisons) were used to test the significance of the results. Statistically significant differences were denoted by $p < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | Increase of disease susceptibility induced by *A. brassicicola* under nitrate nutrition

To determine to what extent the form of N nutrition affected the plants in response to a necrotrophic fungus, *A. thaliana* plants (Col-0) were grown in hydroponic solutions containing either NH_4^+ or NO_3^- as the

sole N source, and the leaves were inoculated with *A. brassicicola* or treated with H_2O (control). The rosette biomass was compared between the two nutrition regimes after 7 dpi for the control conditions. Whereas shoot fresh weight was slightly lower under the NH_4^+ than under NO_3^- nutrition regime (Figure 1), shoot dry weight was not significantly different between both N conditions, showing that plant growth was not affected by the NH_4^+ nutrition regime. In the presence of necrotrophic fungus, the surface of the fungal induced-necrotic lesions was 9.5-fold more developed with NO_3^- medium compared to NH_4^+ medium at 7 dpi (Figure 2). These data suggest that NO_3^- nutrition conferred enhanced disease susceptibility to *A. brassicicola* in *A. thaliana*.

3.2 | Stronger induction of PAD3 gene expression after fungal inoculation in the presence of nitrate than ammonium

To assess if N nutrition influenced inducible defence responses in *A. thaliana* leaves after fungal pathogen inoculation, the expression of three defence genes has been studied (Figure 3). The transcript levels of all tested genes, *AtPR-1* (encoding pathogenesis-related protein 1, a biomarker for salicylic acid events), *AtPDF1.2* (a jasmonic acid/

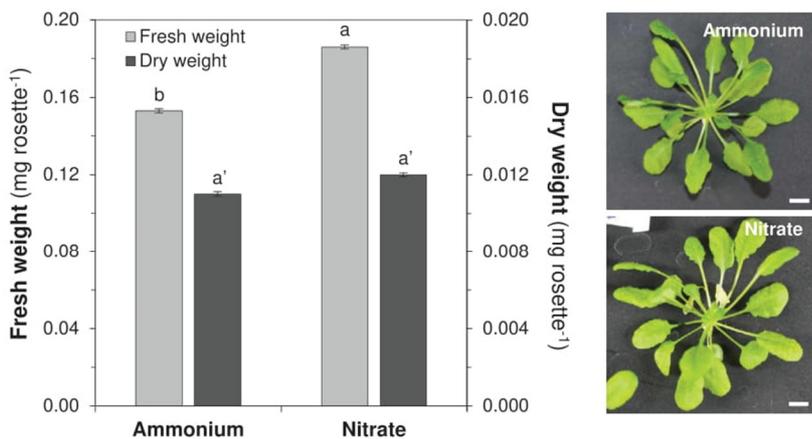


FIGURE 1 Shoot fresh and dry weights of 8 weeks old *Arabidopsis thaliana* plants (Col-0 ecotype) grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- hydroponic medium after 7 days after treatment for the control conditions. Pictures show representative rosettes for the two N nutritive conditions (scale bars = 2 cm). Data presented are means \pm SEM of shoot fresh weight ($n = 36$ individual rosettes from two independent experiments) and shoot dry weight ($n = 16$ individual rosettes from two independent experiments). Letters denote significant differences at the 0.05 level (side-by-side comparison)

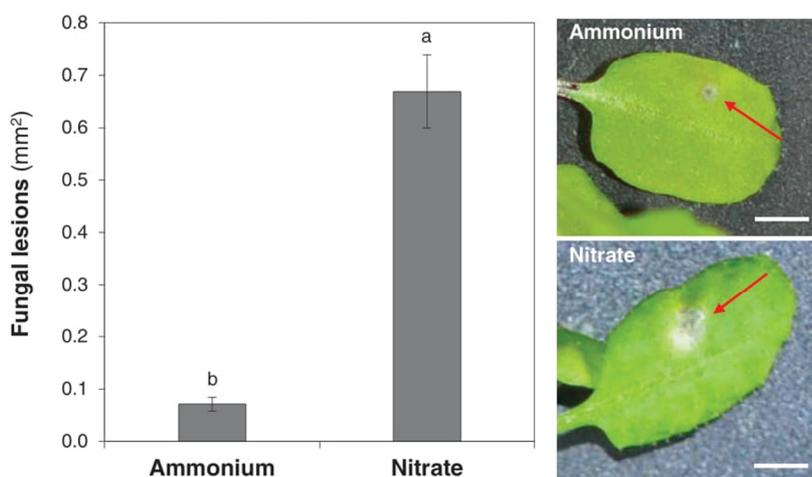


FIGURE 2 Area of fungal lesions in Col-0 plants grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, measured on leaves 7 days after treatment with *Abra43*. Data presented are means of five independent experiments ($n = 345$ – 355 separated leaves per condition). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level. Inserts: red arrows indicate fungal lesions following the N conditions. The white scale bar shows 2 mm

ethylene-responsive gene encoding pathogen inducible plant defensin 1.2) and *AtPAD3* (a gene involved in the camalexin biosynthesis), were significantly induced 7 days after fungal inoculation in both nutritive media (Figure 3). In contrast, no significant difference was observed in the induction of *AtPR-1* and *AtPDF1.2* transcripts after fungal inoculation between NH_4^+ -fed and NO_3^- -fed plants (Figure 3A,B). The levels

of *AtPAD3* transcript increased significantly (around 5.4-fold more) in NO_3^- -fed compared to NH_4^+ -fed plants (Figure 3C).

3.3 | Strong reduction of leaf glucose content after fungal infection under nitrate and ammonium media

In order to check whether the susceptibility of *A. thaliana* towards *A. brassicicola* depending on N nutrition was related to plant carbohydrate levels, the contents of major soluble sugars (glucose, fructose, and sucrose) were determined in leaves at 7 dpi (Figure 4). Under H_2O treatment, the sugar content was not significantly different between nutritive media (around $16 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$). Still, it should be noted that the fructose content was significantly higher under these conditions for the NO_3^- grown plants. Fungal inoculation led to a significant reduction of sugar content in both nutritive media, with a decrease of around 28 and 19% for the NO_3^- -fed plants compared to the NH_4^+ -fed, respectively. This decrease was mainly due to a significant reduction in glucose level, with a loss of around 28 and 23% after fungal inoculation for NO_3^- - and NH_4^+ -grown plants, respectively.

3.4 | Decrease of leaf ammonium content after Abra43 inoculation under ammonium nutrition

NO_3^- and NH_4^+ levels were quantified in Col-0 leaves at 7 dpi (Figure 5). As expected, NH_4^+ -fed plants exhibited less NO_3^- content than NO_3^- -fed plants (fivefold less), whereas the inoculation conditions did not affect the NO_3^- levels. The presence of a NO_3^- trace in plants grown with NH_4^+ could be explained by the fact that these plants had been under NO_3^- deprivation for only 2 weeks. In addition, NH_4^+ -fed plants exhibited higher leaf NH_4^+ content compared to NO_3^- -fed plants, $35 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$ and $13 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$ on average, respectively. However, Abra43 infection significantly decreased leaf NH_4^+ content for NH_4^+ -fed plants (30% less) compared to NO_3^- -fed plants.

3.5 | Fungal infection-dependent AMT gene induction

To determine how N transporters could be regulated by *A. brassicicola* and/or by N source, expressions of some NH_4^+ and NO_3^- transporter

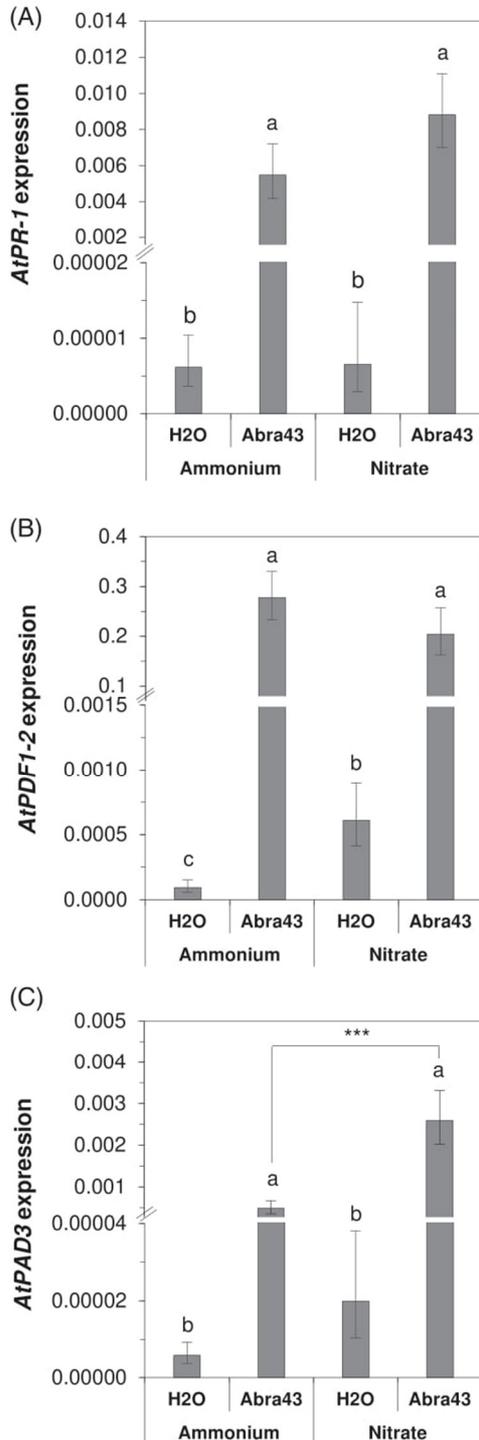


FIGURE 3 Legend on next page.

FIGURE 3 Transcriptional levels of defence genes in the leaves of Col-0 plants, grown on NH_4^+ or NO_3^- conditions. *AtPR-1* (A), *AtPDF1-2* (B), and *AtPAD3* (C) mRNA levels were determined, 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43, by quantitative reverse transcription (qRT-PCR) and normalized with the expression level of the actin standard. Data presented are means of four to five independent experiments ($n = 4-5$ per condition) performed in triplicates (each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons) and ***, an additional significant difference at the 0.001 level from a side-by-side comparison

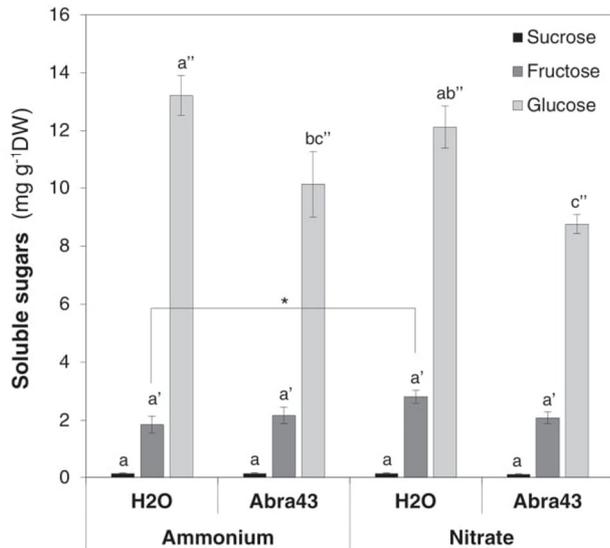


FIGURE 4 Soluble sugar contents in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, determined by HPLC, 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43. Data presented are means of three independent experiments ($n = 3$ per condition; each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons) and *, an additional significant difference at the 0.01 level from a side-by-side comparison

genes were measured in leaves at 7 dpi (Figure 6). For two NO_3^- transporter genes (*AtNPF6.3* and *AtNRT2.1*), no significant difference in transcript levels was observed between *A. thaliana* plants inoculated either by H_2O or the necrotrophic fungus within the same nutrition regime (Figure 6). However, *AtNPF6.3* expression was up-regulated in plants grown on NH_4^+ medium in comparison with NO_3^- medium (at least 2.5-fold more) (Figure 6A), whereas the expression level of *AtNRT2.1* in leaves of plants grown on a nutrient solution containing NO_3^- was shown to be significantly higher than those grown with NH_4^+ (Figure 6B). For NH_4^+ transporter genes, while *AtAMT1.1* was strongly induced only in NH_4^+ -fed plants after fungal inoculation compared to NO_3^- -fed plants (Figure 6C), *AtAMT2.1* expression was up-regulated in both nutritive media in the presence of the necrotrophic fungus, although this induction was significantly higher under NH_4^+ medium compared to NO_3^- medium (Figure 6D). Similar results to fungal-induced *AtAMT2.1* expression were obtained for the *AtAMT1.2* expression (Figure S1A).

3.6 | Nitrate-dependent NO production at the infection site

To check whether N nutrition impacted NO synthesis in *A. thaliana* infected by *A. brassicicola*, NO leaf production was determined using DAF-2DA fluorochrome. A greater NO production was observed at the infection site for plants grown on NO_3^- medium after fungal inoculation (at 7 dpi) compared to NH_4^+ -fed plants (around 14-fold more) (Figure 7A). Interestingly, a specific green fluorescence was also

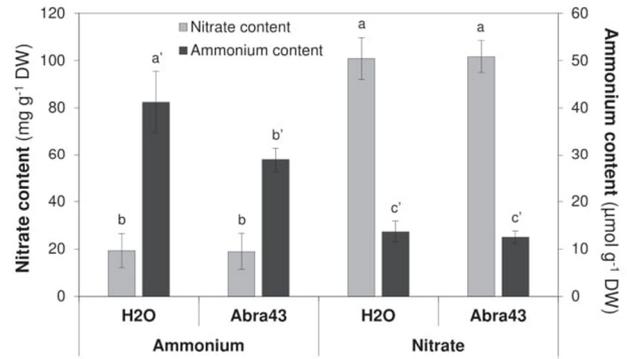


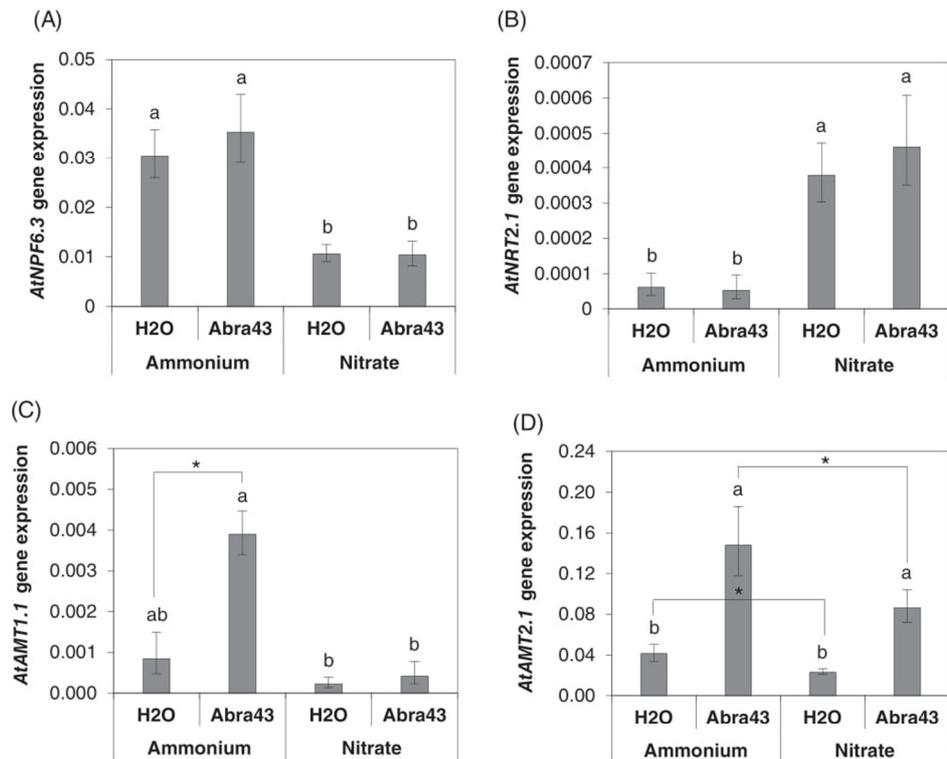
FIGURE 5 Nitrate and ammonium contents in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, measured at 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43. Data presented are means of three independent experiments ($n = 3$ per condition; each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons)

detected in the mycelium of the necrotrophic fungus *A. brassicicola*, both in NH_4^+ and NO_3^- media (Figure 7A inserts). To investigate whether this stronger NO production was dependent on nitrate reductase, *AtNIA1* and *AtNIA2* transcript levels were measured after 7 dpi. Interestingly, expression of *AtNIA1* was lower in the presence of NO_3^- than under NH_4^+ medium (Figure 7B), and more precisely, *AtNIA1* expression was significantly lower after fungal inoculation compared to H_2O treatment under NO_3^- medium. For *AtNIA2*, no difference in gene expression was observed whatever the condition (Figure 7C).

3.7 | Modulation of leaf AA and OA composition depending on plant nitrogen nutrition and fungal inoculation

To further investigate the effects of *A. brassicicola* on plant N metabolism, the leaf composition of amino and OAs was monitored under the different N sources for the two modalities of inoculation at 7 dpi (Figure 8; Tables 1 and 2; Figure S2). Leaf acid content and global proportion of free AAs and OAs significantly differed between NO_3^- -fed plants and NH_4^+ -fed plants (Figure 8A; Figure 8B). Acid content was higher for plants under NH_4^+ compared to those under NO_3^- . Under NH_4^+ , it represented $384 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW after H_2O treatment and $272 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW after fungal infection, with amino and OAs representing, respectively, 97 and 3% of acids under H_2O treatment, and 94 and 6% after Abra43 inoculation. Under NO_3^- medium, the acid content was similar for control and after fungal inoculation (around $260 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), with amino and OAs representing respectively, 38 and 62% of acids under H_2O treatment, and 44 and 56% after Abra43 inoculation. Furthermore, the impact of the fungus on total leaf AA content clearly differed depending on the plant N source. Indeed, the analysis of variance (Table 1) revealed significant

FIGURE 6 Transcriptional levels of nitrate and ammonium transporter genes in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium. *AtNPF6.3* (A), *AtNRT2.1* (B), *AtAMT1.1* (C), and *AtAMT2.1* (D) mRNA levels were determined, 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with *Abra43*, by quantitative reverse transcription (qRT-PCR) and normalized with the expression level of the actin standard. Data presented are means of four to five independent experiments ($n = 4\text{--}5$ per condition) performed in triplicates (each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons)



differences between inoculation modalities ($\text{H}_2\text{O}/\text{Abra43}$), as well as a significant interaction between N nutrition condition and inoculation modality for total AA content with a global lower AA content after *Abra43* inoculation, explained by plants fed with NH_4^+ (Figure 8A). The detailed leaf compositions in total AAs (Table 1) highlighted different free AA profiles between the plants supplied with the two N sources. The most significantly represented AAs in the NH_4^+ -fed plants were glutamine and asparagine (for both modalities of inoculation). Arginine, GABA and serine were, to a lesser extent, significantly represented after *Abra43* inoculation (Table 1). Consistently with observations for total AA content, many AAs, including the most abundant in NH_4^+ -fed plants (e.g. glutamine and asparagine), presented significantly lower abundance in NO_3^- -fed plants. GABA was the most represented AA for NO_3^- -fed plants. Glutamine, aspartate, glutamate, and alanine were also represented after H_2O treatment, but to a lesser extent. Glutamine and glutamate (and then threonine, alanine, serine, and asparagine) were also quite abundant after *Abra43* inoculation (Table 1). Interestingly, fungal inoculation significantly led to a higher content of leaf glutamate, one of the most abundant AAs, in plants grown with NO_3^- medium, as well as a lower content of isoleucine, phenylalanine and valine contents under NH_4^+ nutritive medium (Table 1). Regarding OAs (Table 2), and excepted pyruvate, they were represented in a much smaller abundance for plants under NH_4^+ compared to those under NO_3^- . Fumarate was, however, the most abundant whatever the studied condition, reaching around $81 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW in plants grown on NO_3^- medium (Table 2). At a lesser extent, leaves also presented high contents of malate and citrate for plants grown on NO_3^- medium after H_2O inoculation around

35.6 and $33.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW, respectively, and for plants under NH_4^+ nutritive medium after *Abra43* inoculation (around 4.1 and $2.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW, respectively) (Table 2). However, despite these slight differences between plants treated with H_2O or *Abra43*, inoculation with the fungus did not significantly influence total OA content (Table 2).

3.8 | Modulation of glutamate metabolism after fungal infection

Given that glutamate was the only AA whose content increased significantly after fungal inoculation in plants grown on NO_3^- medium, the expression of key genes involved in the glutamate metabolism had been measured following H_2O treatment and fungal inoculation in both nutritive media (Figure 9). For the cytosolic glutamine synthetase genes, *AtGLN1.2*, the most expressed gene under all conditions, was the only downregulated after fungal inoculation under NH_4^+ medium (Figure 9A). The *AtGLN1.3* transcript levels were significantly lower after *Abra43* treatment in NO_3^- medium compared to NH_4^+ medium (Figure 9B), whereas the opposite effect was observed for *AtGLN1.4* (Figure 9C) and *AtGLN1.5* (Figure S1C). *AtGLN1.1* gene expression did not show any differences between conditions (Figure S1B). Only *AtGLN1.4* was sustained at a higher expression level under NO_3^- medium (compared to NH_4^+ medium) (Figure 9C). For the chloroplastic glutamine gene, *AtGLN2*, its expression was significantly decreased in both nutritive media after fungal inoculation, but also in the presence of NO_3^- with H_2O treatment (Figure 9D). Similar results were observed for *AtGDH1* (Figure 9E), whereas

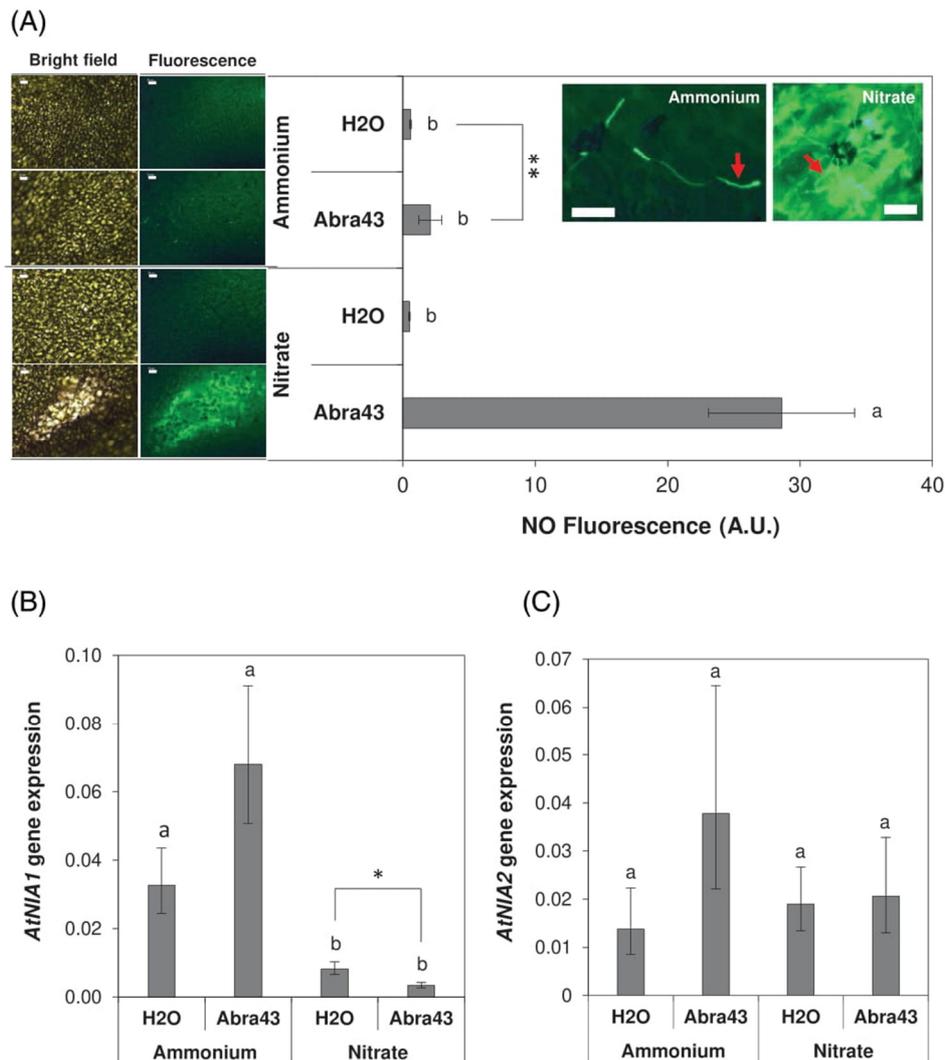


FIGURE 7 Nitric oxide fluorescence around symptoms, observed by fluorescent microscopy, in leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium (A). Leaves were observed 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43. Pictures on the left are of the same inoculated spot, in bright field and in fluorescence. Fluorescence is quantified in arbitrary units (A.U.). Red arrows on pictures in the top right corner point to the fluorescent fungus mycelium. The white scale bars show 50 μm . Data presented are means of three independent experiments ($n = 6$ per condition, each sample consisted of one leaf from an individual plant). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons) and *, an additional significant difference at the 0.01 level from a side-by-side comparison. Transcriptional levels of nitrate reductase genes (*AtNIA1* and *AtNIA2*) in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium (B and C). Nitrate reductase transcript levels were determined, 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43, by quantitative reverse transcription (qRT-PCR) and normalized with the expression level of the actin standard. Data presented are means of four to five independent experiments ($n = 4-5$ per condition) performed in triplicates (each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons)

AtGDH2 was significantly more expressed under NH_4^+ medium than NO_3^- medium whatever the treatment (Figure 9F). Transcript levels of *P5CS*, involved in proline biosynthesis from glutamate, decreased significantly only in plants grown in NO_3^- medium compared to NH_4^+ medium after Abra43 treatment, suggesting that lower proline content could be related to plant susceptibility (Figure S1D). The gene expression of proline dehydrogenase (*ProDH*; involved in proline degradation) was not influenced by the nutritive medium or by the presence of *A. brassicicola* (Figure S1E).

4 | DISCUSSION

4.1 | Influence of N nutrition on plant fungal infection

In the *A. thaliana* (Col-0)/*A. brassicicola* pathosystem used here at the rosette stage, we showed that N nutrition impacted on fungal development, with more visible lesions with nitrate susceptibility compared to ammonium (Figure 2). Our results are consistent with previous

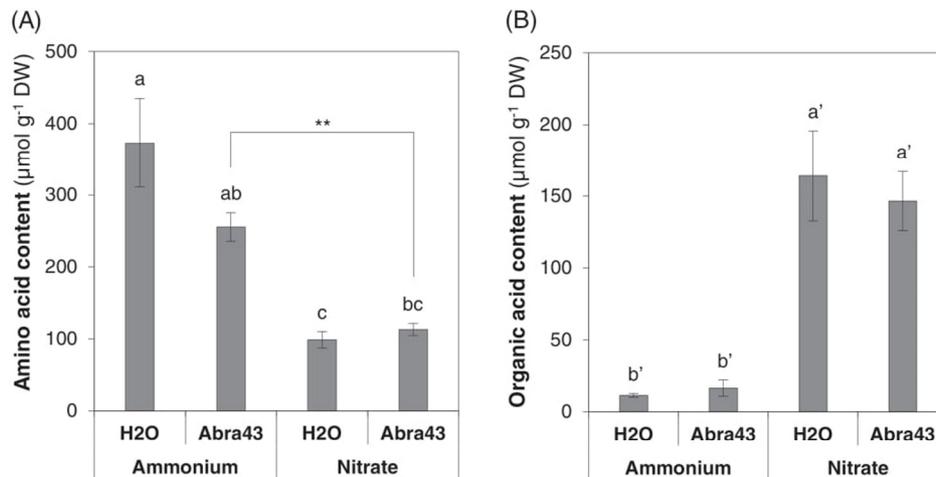


FIGURE 8 Amino acid (A) and organic acid (B) contents in the leaves of Col-0 plants, grown in the presence of NH_4^+ or NO_3^- medium, determined by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), 7 days after treatment with sterile water (H_2O) or inoculation with Abra43. Data presented are means of three independent experiments ($n = 3$ per condition; each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Error bars indicate SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons) and **, an additional significant difference at the 0.01 level from a side-by-side comparison

studies in which increased resistance was observed in plants grown with NH_4^+ such as tomato inoculated with *P. syringae* (Fernández-Crespo et al., 2015; González-Hernández et al., 2019) or *F. oxysporum* (López-Berges et al., 2010). However, other studies have reported that NO_3^- -fed plants displayed increased resistance to pathogen attack compared to NH_4^+ -fed plants, such as rice subjected to *Rhizoctonia solani* (Chi et al., 2019), cucumber exposed to *F. oxysporum* (Wang et al., 2016) or tobacco infected by *P. syringae* (Gupta et al., 2013). The lower fungal development observed here in plants grown with NH_4^+ could be explained by NH_4^+ -mediated inhibition of fungal growth. Such an effect has been suggested for various pathogens (*F. oxysporum*, Divon et al., 2006; *Verticillium dahliae*, Tenuta & Lazarovits, 2002; *Elsinoë fawcettii*, Wang et al., 2009; and *Botrytis cinerea*, Soulie et al., 2020). Also, N nutrition could have an impact on the physical barriers of the plant (epidermal cuticle thickness, lignification), which in turn control fungal penetration and consequently reduce the incidence of disease (Kumar et al., 2016; Tronchet et al., 2010). Accordingly, López-Berges et al. (2010) have shown that when N source is NH_4^+ , fungal species such as *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, or *Magnaporthe oryzae* fail to penetrate cellophane membranes, suggesting that the ability of hyphae to pierce cellulosic material is affected by NH_4^+ nutrition. In other words, ammonium could repress virulence factors associated with physical penetration in plant tissues.

4.2 | Interaction between inoculation modality and N source

Fungal pathogens can reduce NO_3^- to NH_4^+ (Gorfer et al., 2011; Schinko et al., 2010), and sense the presence of NO_3^- in order to

quickly adapt to the changed conditions, e.g. by subsequent transcriptional activation of the NO_3^- assimilation genes (Pfanmüller et al., 2017). The lower susceptibility of *A. thaliana* to *A. brassicicola* found under NH_4^+ nutrition was accompanied by both a significant reduction in the NH_4^+ content (Figure 5), and induction of NH_4^+ transporter genes (*AtAMT1.1*, *AtAMT1.2* and *AtAMT2.1*) (Figure 6; Figure S1A). Fungal inoculation did not modify the expression of NO_3^- transporter genes (*AtNRT2.1* and *AtNPF6.3*) regardless of the N source (Figure 6). Still, as expected, *AtNRT2.1* expression was induced by NO_3^- and repressed by NH_4^+ (Figure 6B). The repression of *AtNRT2.1* expression by NH_4^+ was concomitant with an increase in glutamine (Table 1). This was consistent with the specific role of glutamine in N signalling responsible for NO_3^- uptake regulation (Nazoa et al., 2003). Interestingly, *NRT2.1* disruption in *A. thaliana* has been reported to confer tolerance to either the bacterial pathogen *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Camañes et al., 2012) or the necrotrophic fungus *P. cucumerina* (Gamir et al., 2014). Furthermore, *NRT2.1* expression has been reported to be negatively regulated by *NRT1.1/NPF6.3* (Bouguyon et al., 2015). Our results also show that *AtNPF6.3* expression was weak under NO_3^- nutrition and induced under NH_4^+ nutrition (Figure 6A). Collectively, these data support the idea that *AtNRT2.1* and *AtNPF6.3* expression would be involved in the susceptibility of *A. thaliana* to *A. brassicicola* under NO_3^- nutrition.

The gene encoding nitrate reductase is generally induced by NO_3^- (Crawford, 1995) and repressed by NH_4^+ in plant leaves (Stitt, 1999). However, under our conditions, *AtNIA1* transcripts were more abundant under NH_4^+ than NO_3^- nutrition (Figure 7B). Leleu and Vuylsteker (2004) also found that nitrate reductase mRNA accumulation under NH_4^+ nutrition was twofold higher than under NO_3^- supply in *Brassica napus* seedlings. There are two explanations for this effect: (1) a change in shoot-root nitrogen assimilatory metabolism, or

TABLE 1 Average values of amino acids ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW} \pm \text{SEM}$) in *Arabidopsis thaliana* leaves after H_2O treatment or Abra43 inoculation from plants grown on two nutritive media (NH_4^+ or NO_3^-) at 7 dpi. Values represent the means of three independent experiments ($n = 3$ per condition; each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Lowercase letters indicate a statistical difference between amino acids, inside a condition of nitrogen (N) and inoculation (I). Lowercase letters with apostrophes indicate a statistical difference between N conditions, for an amino acid and an inoculation condition. Greek letters indicate a statistical difference between inoculation conditions, for an amino acid and an N condition. No letter indicates the absence of statistical difference for the comparison. The different factor effects and their interaction are presented at the bottom of the table, with the p -value. Significance of p : $0 < \text{***} < 0.001 < \text{**} < 0.01$

Amino acids	Ammonium medium		Nitrate medium	
	H_2O	Abra43	H_2O	Abra43
Alanine	6.35 \pm 1.07 (b)	5.36 \pm 1.42 (d)	9.35 \pm 1.51 (bc)	8.97 \pm 1.00 (bcd)
Arginine	39.21 \pm 4.63 (b, a')	28.17 \pm 3.61 (b, a')	0.26 \pm 0.26 (d, b')	3.61 \pm 0.37 (d, b')
Asparagine	103.05 \pm 22.57 (a, a')	65.12 \pm 9.16 (a, a')	2.57 \pm 0.35 (cd, b')	6.36 \pm 4.98 (bcd, b')
Aspartate	7.31 \pm 0.92 (b)	6.62 \pm 1.11 (cd, b')	10.30 \pm 2.54 (bc)	12.92 \pm 0.72 (bc, a')
Cysteine	0.50 \pm 0.06 (b)	0.42 \pm 0.04 (d)	0.43 \pm 0.03 (d)	0.42 \pm 0.05 (d)
GABA	30.90 \pm 3.27 (b)	27.26 \pm 1.89 (b)	23.64 \pm 2.61 (a)	26.02 \pm 6.36 (a)
Glutamate	2.00 \pm 0.52 (b, b')	1.94 \pm 0.47 (d, b')	10.08 \pm 0.82 (bc, a', β)	15.42 \pm 0.76 (ab, a', α)
Glutamine	106.31 \pm 32.27 (a, a')	66.26 \pm 10.96 (a, a')	13.22 \pm 2.84 (b, b')	15.97 \pm 4.49 (ab, b')
Glycine	2.46 \pm 0.41 (b, a')	2.25 \pm 0.38 (d, a')	1.07 \pm 0.21 (d, b')	0.98 \pm 0.17 (d, b')
Histidine	7.12 \pm 2.25 (b, a')	5.17 \pm 1.68 (d)	0.08 \pm 0.08 (d, b')	0.74 \pm 0.57 (d)
Isoleucine	1.56 \pm 0.12 (b, a', α)	0.94 \pm 0.08 (d, β)	0.74 \pm 0.09 (d, b')	0.70 \pm 0.15 (d)
Leucine	2.91 \pm 0.52 (b, a')	1.64 \pm 0.28 (d)	1.35 \pm 0.12 (d, b')	1.13 \pm 0.31 (d)
Lysine	6.99 \pm 1.40 (b, a')	4.61 \pm 0.71 (d, a')	0.89 \pm 0.21 (d, b')	0.89 \pm 0.31 (d, b')
Methionine	2.32 \pm 0.39 (b, a')	1.63 \pm 0.25 (d, a')	0.63 \pm 0.08 (d, b')	0.74 \pm 0.09 (d, b')
Phenylalanine	2.13 \pm 0.21 (b, a', α)	1.09 \pm 0.15 (d, β)	0.91 \pm 0.08 (d, b')	0.90 \pm 0.22 (d)
Proline	3.00 \pm 1.13 (b)	2.19 \pm 0.20 (d)	3.44 \pm 1.98 (cd)	2.23 \pm 0.60 (cd)
Serine	34.92 \pm 10.88 (b)	25.53 \pm 6.50 (bc, a')	7.74 \pm 3.54 (bcd)	6.50 \pm 1.35 (bcd, b')
Threonine	9.49 \pm 1.56 (b)	6.06 \pm 1.28 (d)	9.26 \pm 1.79 (bc)	9.26 \pm 0.80 (bcd)
Tryptophan	0.85 \pm 0.07 (b)	0.60 \pm 0.07 (d)	0.60 \pm 0.06 (d)	0.42 \pm 0.21 (d)
Tyrosine	1.34 \pm 0.02 (b)	0.82 \pm 0.22 (d)	0.62 \pm 0.28 (d)	0.36 \pm 0.36 (d)
Valine	2.27 \pm 0.20 (b, a', α)	1.44 \pm 0.20 (d, β)	1.37 \pm 0.10 (d, b')	1.30 \pm 0.26 (d)
Amino acid (AA) effect			$< 2^{-16}$ ***	
Nitrogen (N) effect			$< 2^{-16}$ ***	
Inoculation (I) effect			0.0048**	
AA \times N effect			$< 2^{-16}$ ***	
AA \times I effect			0.3358	
N \times I effect			$< 2^{-16}$ ***	
AA \times I \times N effect			0.1913	

(2) a signalling effect mediated by NO. Hypothesis (1) is likely to be true since NH_4^+ nutrition changes root metabolism, enhancing NH_4^+ incorporation and detoxication, perhaps leading to an increase in the contribution of rosette leaves to total nitrate assimilation. This effect might be transitory since plants have been sampled only 2 weeks after the onset of N treatments. Hypothesis (2) is also likely to be true. In fact, nitrate reductase is the major source of NO (Planchet et al., 2005), which in turn plays an important role in signalling during plant disease resistance (Delledonne et al., 1998) and in the regulation of plant defence against fungal pathogens and elicitors (Jedelská et al., 2021; Martínez-Medina et al., 2019; Planchet et al., 2006). Here, a strong NO_3^- -dependent NO production was observed after *A. brassicicola* inoculation (Figure 7A). However, there was no visible

induction of either *AtNIA1* or *AtNIA2* expression after fungal inoculation under NO_3^- nutrition. There may have been a transient increase in *AtNIA* expression, thereby producing NO and then a repression exerted by NO itself (negative feedback). NO-dependent repression of *NIA1* transcription has been observed in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type cells (de Montaigu et al., 2010). The NO_3^- -dependent NO accumulation observed in our study after inoculation (Figure 7A) could have originated not only from the plant but also from the pathogen since it is also equipped with nitrate reductase. If correct, *A. brassicicola* could promote infection via its own NO_3^- -dependent NO production, which in turn perturbs NO homeostasis required for disease resistance in the host. Other studies have suggested that NO synthesis may accelerate colonization of the host, and thus

TABLE 2 Average values of organic acids ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW} \pm \text{SEM}$) in *Arabidopsis thaliana* leaves after H₂O treatment or Abra43 inoculation from plants grown on two nutritive media (NH₄⁺ or NO₃⁻) at 7 dpi. Values represent the means of three independent experiments ($n = 3$ per condition; each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Lowercase letters indicate a statistical difference between organic acids, inside a condition of nitrogen (N) and inoculation (I). Lowercase letters with apostrophes indicate a statistical difference between N conditions, for an organic acid and an inoculation condition. Greek letters indicate a statistical difference between inoculation conditions, for an organic acid and an N condition. No letter indicates the absence of statistical difference for the comparison. The different factor effects and their interaction are presented at the bottom of the table, with the p -value. Significance of p : $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01$

Organic acids	Ammonium medium		Nitrate medium	
	H ₂ O	Abra43	H ₂ O	Abra43
Citrate	0.95 ± 0.31 (bc, b')	2.32 ± 1.59 (ab, b')	33.86 ± 5.59 (ab, a')	30.33 ± 10.59 (b, a')
Fumarate	5.23 ± 0.76 (a, b')	7.03 ± 1.94 (a, b')	86.89 ± 28.53 (a, a')	74.43 ± 14.90 (a, a')
Isocitrate	0 (c, b')	0.30 ± 0.16 (b, b')	0.72 ± 0.06 (b, a')	0.82 ± 0.03 (b, a')
Malate	2.56 ± 0.50 (b, b')	4.05 ± 2.21 (ab, b')	35.63 ± 4.15 (ab, a')	33.32 ± 4.44 (b, a')
Oxoglutarate	0.60 ± 0.15 (c, b')	0.72 ± 0.04 (b, b')	1.69 ± 0.10 (b, a')	3.03 ± 0.61 (b, a')
Pyruvate	1.01 ± 0.42 (bc)	1.13 ± 0.32 (ab)	1.97 ± 0.20 (b)	1.91 ± 0.22 (b)
Succinate	0.97 ± 0.03 (bc, b')	0.92 ± 0.15 (ab, b')	3.29 ± 0.82 (b, a')	2.54 ± 0.58 (b, a')
Organic acid (OA) effect			<2 ^{e-16***}	
Nitrogen (N) effect			<2 ^{e-16***}	
Inoculation (I) effect			0.7451	
OA × N effect			<2 ^{e-16***}	
OA × I effect			1	
N × I effect			0.7255	
OA × I × N effect			1	

Note: *** < 0.001.

promote necrotrophic growth (Arasimowicz-Jelonek & Floryszak-Wieczorek, 2016; Turrion-Gomez & Benito, 2011; Zhao et al., 2020), by inducing conidiation (Gong et al., 2007; Samalova et al., 2013; Wang & Higgins, 2005), spore germination or appressoria formation (Prats et al., 2008). Yet, in plants, NO stimulates defence-related gene expression and the production of phytoalexins (Martinez-Medina et al., 2019), such as camalexin. Camalexin is the major phytoalexin in *A. thaliana* (Glazebrook & Ausubel, 1994) and has been shown to inhibit the growth of some necrotrophic fungi, including *A. brassicicola* (Ferrari et al., 2003; Rogers et al., 1996; Thomma et al., 1999). Here, *AtPAD3*, a gene involved in camalexin biosynthesis, was much more induced after inoculation under NO₃⁻ nutrition compared to NH₄⁺ (Figure 3C). However, the fungal lesions were much more visible under NO₃⁻ nutrition, suggesting that camalexin was not very effective as a protectant. NO accumulation could also enhance disease susceptibility via post-translational modification (S-nitrosylation) of proteins involved in defence (Lubega et al., 2020). Given that *AtPR-1* and *AtPDF1.2* gene expressions were induced in a similar way after fungal inoculation regardless of N nutrition, it is likely that salicylic acid and ethylene/jasmonic acid mediated signalling was activated to induce plant defence responses independently of NO₃⁻ and NH₄⁺.

4.3 | Role of metabolic modulations by N nutrition in fungal infection

Metabolic changes caused by the fungal infection have been poorly investigated, and thus there is presently no clear picture of the

metabolic modifications during infection, in particular under varying N sources (Botanga et al., 2012; Brauc et al., 2011; Dulermo et al., 2009; Tavernier et al., 2007). The acquisition of both N- and C-containing compounds from the host is crucial for fungal survival, growth, and persistence (Pellier et al., 2003; Solomon et al., 2003). Most fungal pathogens assimilate plant sugars to produce fuel for their growth and consequently deprive the plant of fuel for defence responses (Talbot, 2010). In our study, this hypothesis is supported by the larger decrease of glucose content in leaves observed in NO₃⁻-fed plants after *A. brassicicola* inoculation, compared to NH₄⁺-fed plants (Figure 4).

Amino acids are important C and N sources to sustain resistance in plants (Fagard et al., 2014; Zeier, 2013) but are also crucial to sustain pathogen survival and propagation. Most fungal AA transporters mediate the uptake of a wide range of AAs, with partial selectivity, e.g. the branched-chain or aromatic AAs (Botanga et al., 2012; Wipf et al., 2002). Our results provide information about the contribution of free AAs on plant susceptibility to fungal pathogens. First, the total AA content without infection, which represents the pool of available organic N, was higher under NH₄⁺ than under NO₃⁻ (Table 1; Figure S2), mostly due to asparagine and glutamine that were 50- and 8-fold more abundant in NH₄⁺-fed plants compared to NO₃⁻-fed plants (Table 1). Second, the content of these two AAs (asparagine and glutamine), after infection with the pathogen, was still 10- and 4-fold more abundant under NH₄⁺ compared to NO₃⁻ nutrition, respectively. It is known that asparagine could be less favourably metabolized than other AAs by necrotrophic fungi (Dulermo

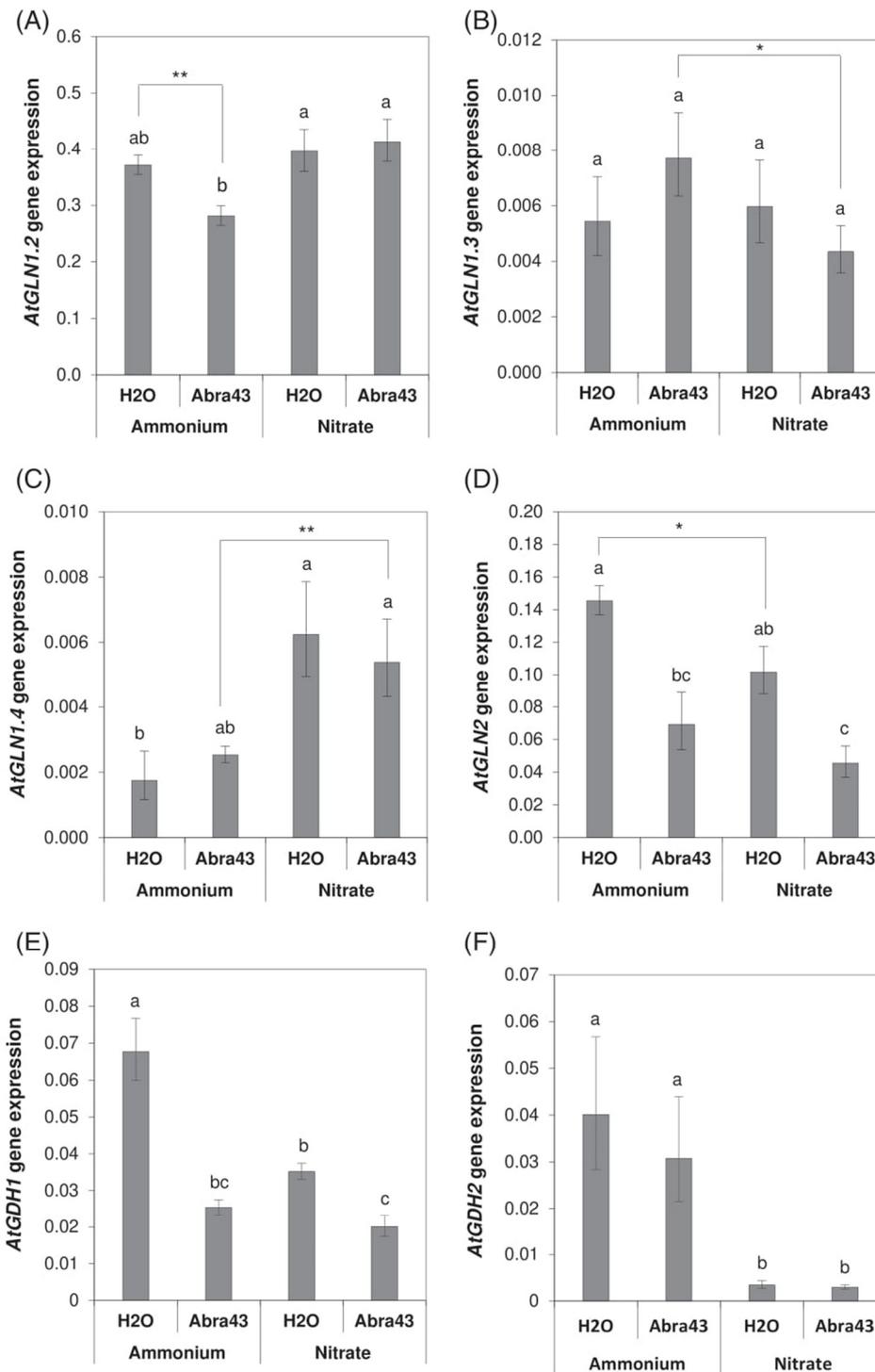


FIGURE 9 Expression of genes linked to glutamate metabolism in the leaves of NH_4^+ - or NO_3^- -fed plants. *AtGLN1.2* (A), *AtGLN1.3* (B), *AtGLN1.4* (C), *AtGLN2* (D), *AtGDH1* (E), and *AtGDH2* (F) mRNA levels were determined, 7 days after inoculation with sterile water (H_2O) or conidia solution (Abra43), by quantitative reverse transcription (qRT-PCR) and normalized with the expression level of the actin standard. Data presented are means of four to five independent experiments ($n = 4-5$ per condition) performed in triplicates (each sample consisted of 10 leaves from three individual plants). Error bar indicates SEM. Letters denote significant differences at the 0.05 level (multiple comparisons) and *, additional significant differences at the 0.05 level from a side-by-side comparison

et al., 2009). The important initial content of some AAs, including asparagine, could be then a key index for NH_4^+ -conferred resistance to *A. thaliana* in response to *A. brassicicola*. This hypothesis is reinforced by the fact that *A. thaliana* overexpressing asparagine synthetase 1 gene of pepper exhibited reduced susceptibility to infection with *P. syringae* pv. tomato and the biotrophic fungus

Hyaloperonospora arabidopsidis (Hwang et al., 2011). Regarding glutamine, it has been reported to repress fungal virulence in the hemibiotrophic fungus *F. oxysporum* and inhibit the formation of appressoria, highly specialized infection structures, in the rice blast fungus *M. oryzae* (López-Berges et al., 2010; Marroquin-Guzman & Wilson, 2015). Huang et al. (2017) also demonstrated that the

OsGS1-2 glutamine synthetase gene enhanced plant resistance to *M. oryzae*, suggesting that higher glutamine content would increase resistance by abolishing the molecular mechanisms underlying nitrogen-induced susceptibility. In agreement with that, *AtGLN1.3* gene expression was significantly more induced after fungal inoculation in NH_4^+ -fed plants compared to NO_3^- -fed plants (Figure 9B). Under NO_3^- nutrition, glutamate was one of the most abundant AAs, along with its derivative, GABA. Interestingly, it was also the only AA that increased in inoculated plants under NO_3^- nutrition. Such an increase could simply reflect its important metabolic role in hyphae since our samples include both leaf and fungal tissues. Also, it is possible that the high glutamate content itself favours disease susceptibility in *A. thaliana*. Botanga et al. (2012) have reported that GABA promoted the disease severity using the same *A. thaliana/A. brassicicola* pathosystem. However, under our conditions, GABA was not significantly higher under NO_3^- nutrition and was not affected by fungal infection (Table 1). Arginine, which represents a potential precursor for polyamines (Bagni & Tassoni, 2001; Majumdar et al., 2019), was significantly more accumulated in NH_4^+ -fed plants (in average 16-fold compared to NO_3^-). Interestingly, this higher pool of arginine would constitute an immediate substrate to counteract the effect of *A. brassicicola* and confer a decrease of susceptibility to *A. thaliana* by favouring polyamine biosynthesis.

4.4 | Conclusions and perspectives

The present study highlighted, that at the rosette stage, NO_3^- nutrition increased the susceptibility of *A. thaliana* to a necrotrophic fungus compared to NH_4^+ nutrition. This NO_3^- -dependent fungal susceptibility was perhaps due to higher NO production induced by fungal inoculation at the infection site and a change in AA composition (particularly a lower content of asparagine and glutamine under NO_3^- compared to NH_4^+ , as well as an enrichment in glutamate). This suggests the importance of the N “status” of the plant, which depends on the chemical form of the N source. N availability (concentration) is also probably important to consider. The developmental stage also probably matters since early stages of plant development (before the rosette stage) are critical for successful crop establishment and yield and associated with different N metabolic properties (typically protein remobilization). *A. brassicicola* is a seed-borne pathogen that causes damping-off, investigations are thus required to examine the role of N source in the plant-fungal pathogen interactions during seedling establishment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was conducted in the framework of the (French) regional council program “Objectif Végétal, Research, Education and Innovation in Pays de la Loire” supported by the French Region Pays de la Loire, Angers Loire Métropole (NPFun and FuSloN projects). The PhD grant of T. B. was awarded by the National Agronomy School “Institut Agro - Agrocampus Ouest”, cofinanced by French Ministry of

Agriculture and Food and the Regional Council of Pays de la Loire as part of a Contrat de Plan Etat-Région (CPER), and the French local authority Angers Loire Métropole. The authors acknowledge Prof Guillaume Tcherkez for reading manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Thibault Barrit, Alexis Porcher, Claire Champion, and Elisabeth Planchet designed the experiments. Thibault Barrit, Alexis Porcher, Caroline Cukier, Pascale Satour, and Elisabeth Planchet performed the experiments. Thibault Barrit, Alexis Porcher, Thomas Guillemette, Anis M. Limami, Béatrice Teulat, Claire Champion, and Elisabeth Planchet were involved in the interpretation of the results. Thibault Barrit, Alexis Porcher, Béatrice Teulat, and Elisabeth Planchet wrote the article. All authors read and approved the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing is not applicable to this manuscript as all generated data are already included in this article or in the supplementary material.

ORCID

Béatrice Teulat  <https://orcid.org/0000-0002-3176-2636>

Elisabeth Planchet  <https://orcid.org/0000-0002-5151-6694>

REFERENCES

- Arasimowicz-Jelonek, M. & Floryszak-Wieczorek, J. (2016) Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 7, 252.
- Bagni, N. & Tassoni, A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, 20, 301–317.
- Ballini, E., Nguyen, T.T. & Morel, J. (2013) Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice*, 6, 32.
- Belmas, E., Briand, M., Kwasiborski, A., Colou, J., N'Guyen, G., Iacomini, B. et al. (2018) Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Alternaria brassicicola* Abra43. *Genome Announcements*, 6(6), e01559–e01517.
- Botanga, C.J., Bethke, G., Chen, Z., Gallie, D.R., Fiehn, O. & Glazebrook, J. (2012) Metabolite profiling of Arabidopsis inoculated with *Alternaria brassicicola* reveals that ascorbate reduces disease severity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1628–1638.
- Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S. et al. (2015) Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transporter NRT1.1. *Nature Plants*, 1, 15015.
- Brauc, S., De Vooght, E., Claeys, M., Höfte, M. & Angenon, G. (2011) Influence of over-expression of cytosolic aspartate aminotransferase on amino acid metabolism and defence responses against *Botrytis cinerea* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1813–1819.
- Camañes, G., Pastor, V., Cerezo, M., García-Andrade, J., Vicedo, B., García-Agustín, P. et al. (2012) A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiology*, 158, 1054–1066.
- Chi, W.J., Wang, Z.Y., Liu, J.M., Zhang, C., Wu, Y.H. & Bai, Y.J. (2019) Ammonium uptake and assimilation are required for rice defense against sheath blight disease. *Cereal Research Communications*, 47, 98–110.

- Crawford, N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 7, 859–868.
- de Montaigu, A., Sanz-Luque, E., Galván, A. & Fernández, E. (2010) A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 22, 1532–1548.
- Dechorgnat, J., Patrit, O., Krapp, A., Fagard, M. & Daniel-Vedele, F. (2012) Characterization of the Nrt2.6 gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS One*, 7, e42491.
- Delledonne, M., Lamb, C., Xia, Y.J. & Dixon, R.A. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585–588.
- Dietrich, R., Ploss, K. & Heil, M. (2004) Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment*, 27, 896–906.
- Divon, H.H. & Fluhr, R. (2007) Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters*, 266, 65–74.
- Divon, H.H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O. & Fluhr, R. (2006) The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 7, 485–497.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 316–323.
- Dordas, C. (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 33–46.
- Dulermo, T., Bligny, R., Gout, E. & Cotton, P. (2009) Amino acid changes during sunflower infection by the necrotrophic fungus *B. cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 859–861.
- Fagard, M., Launay, A., Clement, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M. et al. (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany*, 65, 5643–5656.
- Fernández-Crespo, E., Scalschi, L., Llorens, E., García-Agustín, P. & Camañes, G. (2015) NH₄⁺ protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by activation of systemic acquired acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 66, 6777–6790.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G. & Ausubel, F.M. (2003) *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant Journal*, 35, 193–205.
- Forde, B.G. & Lea, P.J. (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2339–2358.
- Gamir, J., Pastor, V., Kaefer, A., Cerezo, M. & Flors, V. (2014) Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Journal*, 78, 227–240.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227.
- Glazebrook, J. & Ausubel, F.M. (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 8955–8959.
- Gong, X., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Yi, X. & Peng, Y. (2007) L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 1368–1379.
- González-Hernández, A.I., Fernández-Crespo, E., Scalschi, L., Hajrezaei, M.-R., von Wirén, N., García-Agustín, P. et al. (2019) Ammonium mediated changes in carbon and nitrogen metabolisms induce resistance against *Pseudomonas syringae* in tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 239, 28–37.
- Gorfer, M., Blumhoff, M., Klaubauf, S., Urban, A., Inselsbacher, E., Bandian, D. et al. (2011) Community profiling and gene expression of fungal assimilatory nitrate reductases in agricultural soil. *ISME Journal*, 5, 1771–1783.
- Guan, M., de Bang, T.C., Pedersen, C. & Schjoerring, J.K. (2016) Cytosolic glutamine synthetase Gln1;2 is the main isozyme contributing to GS1 activity and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. *Plant Physiology*, 171, 1921–1933.
- Gupta, K.J., Brotman, Y., Segu, S., Zeier, T., Zeier, J., Persijn, S.T. et al. (2013) The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 64, 553–568.
- Hao, D.L., Zhou, J.Y., Yang, S.Y., Qi, W., Yang, K.J. & Su, Y.H. (2020) Function and regulation of ammonium transporters in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3557.
- Huang, H., Nguyen Thi Thu, T., He, X., Gravot, A., Bernillon, S., Ballini, E. et al. (2017) Increase of fungal pathogenicity and role of plant glutamine in nitrogen-induced susceptibility (NIS) to rice blast. *Frontiers in Plant Science*, 8, 265.
- Huber, D.M. & Watson, R.D. (1974) Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 12, 139–165.
- Hwang, I.S., An, S.H. & Hwang, B.K. (2011) Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *Plant Journal*, 67, 749–762.
- Jedelská, T., Luhová, L. & Petřivalský, M. (2021) Nitric oxide signalling in plant interactions with pathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Experimental Botany*, 72, 848–863.
- Kumar, A., Yogendra, K.N., Karre, S., Kushalappa, A.C., Dion, Y. & Choo, T. M. (2016) WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist *Fusarium* head blight in barley spikelets. *Journal of Experimental Botany*, 67, 4127–4139.
- Leleu, O. & Vuylsteker, C. (2004) Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany*, 55, 815–823.
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J.C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F. et al. (2014) A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science*, 19, 5–9.
- López-Berges, M.S., Rispaí, N., Prados-Rosales, R.C. & Pietro, A.D. (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell*, 22, 2459–2475.
- Lubega, J., Umbreen, S. & Loake, G.J. (2020) Recent advances in the regulation of plant immunity by S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany*, 72, 864–872.
- Majumdar, R., Minocha, R., Lebar, M.D., Rajasekaran, K., Long, S., Carter-Wientjes, C. et al. (2019) Contribution of maize polyamine and amino acid metabolism toward resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Frontiers in Plant Science*, 10, 692.
- Marroquin-Guzman, M. & Wilson, R.A. (2015) GATA-dependent glutaminolysis drives appressorium formation in *Magnaporthe oryzae* by suppressing TOR inhibition of cAMP/PKA signaling. *PLoS Pathogens*, 11, e1004851.
- Martínez-Medina, A., Pescador, L., Terrón-Camero, L.C., Pozo, M.J. & Romero-Puertas, M.C. (2019) Nitric oxide in plant-fungal interactions. *Journal of Experimental Botany*, 70, 4489–4503.
- Mur, L.A., Prats, E., Pierre, S., Hall, M.A. & Hebelstrup, K.H. (2013) Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science*, 4, 215.
- Mur, L.A.J., Simpson, C., Kumari, A., Gupta, A.K. & Gupta, K.J. (2017) Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of Botany*, 119, 703–709.
- Nacry, P., Bouguyon, E. & Gojon, A. (2013) Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*, 370, 1–29.

- Nazoa, P., Vidmar, J.J., Tranbarger, T.J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P. et al. (2003) Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology*, 52, 689–703.
- Neumann, S., Paveley, N.D., Beed, F.D. & Sylvester-Bradley, R. (2004) Nitrogen per unit leaf area affects the upper asymptote of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* epidemics in winter wheat. *Plant Pathology*, 53, 725–732.
- Orsel, M., Filleur, S., Fraissier, V. & Daniel-Védèle, F. (2002) Nitrate transport in plants: which gene and which control? *Journal of Experimental Botany*, 53, 825–833.
- Otani, H., Kohnobe, A., Kodama, M. & Kohmoto, K. (1998) Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52, 285–295.
- Pastor, V., Gamir, J., Camañes, G., Cerezo, M., Sánchez-Bel, P. & Flors, V. (2014) Disruption of the ammonium transporter AMT1.1 alters basal defenses generating resistance against *Pseudomonas syringae* and *Plectosphaerella cucumerina*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 231.
- Pellier, A.L., Laugé, R., Veneault-Fourrey, C. & Langin, T. (2003) CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular Microbiology*, 48, 639–655.
- Pfannmüller, A., Boysen, J.M. & Tudzynski, B. (2017) Nitrate assimilation in *Fusarium fujikuroi* is controlled by multiple levels of regulation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 381.
- Planchet, E., Jagadis Gupta, K., Sonoda, M. & Kaiser, W.M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Journal*, 41, 732–743.
- Planchet, E. & Kaiser, W.M. (2006) Nitric oxide production in plants. *Plant, Signaling & Behavior*, 1, 46–51.
- Planchet, E., Sonoda, M., Zeier, J. & Kaiser, W.M. (2006) Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogem-induced hypersensitive response—a critical re-evaluation. *Plant, Cell and Environment*, 29, 59–69.
- Prats, E., Carver, T.L. & Mur, L.A. (2008) Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Research in Microbiology*, 159, 476–480.
- Rogers, E.E., Glazebrook, J. & Ausubel, F.M. (1996) Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 748–757.
- Samalova, M., Johnson, J., Illes, M., Kelly, S., Fricker, M. & Gurr, S. (2013) Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection. *New Phytologist*, 197, 207–222.
- Sarasketa, A., González-Moro, M.B., González-Murua, C. & Marino, D. (2014) Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. *Journal of Experimental Botany*, 65, 6023–6033.
- Schinko, T., Berger, H., Lee, W., Gallmetzer, A., Pirker, K., Pachlinger, R. et al. (2010) Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism. *Molecular Microbiology*, 78, 720–738.
- Seifi, H.S., Van Bockhaven, J., Angenon, G. & Höfte, M. (2013) Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 475–485.
- Snoeijs, S.S., Pérez-García, A., Joosten, M.H. & De Wit, P.J. (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 493–506.
- Solomon, P.S., Tan, K.C. & Oliver, R.P. (2003) The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology*, 4, 203–210.
- Soulie, M.C., Koka, S.M., Floch, K., Vancostenoble, B., Barbe, D., Daviere, A. et al. (2020) Plant nitrogen supply affects the *Botrytis cinerea* infection process and modulates known and novel virulence factors. *Molecular Plant Pathology*, 21, 1436–1450.
- Stitt, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 178–186.
- Sun, Y., Li, Y., Li, Y., Wang, M., Mur, L.A.J., Shen, Q. et al. (2021) Nitrate mediated resistance against *Fusarium* infection in cucumber plants acts via photorespiration. *Plant, Cell and Environment*, 44, 3412–3431.
- Sun, Y., Wang, M., Mur, L., Shen, Q. & Guo, S. (2020) Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 572.
- Talbot, N.J. (2010) Living the sweet life: how does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants? *PLoS Biology*, 8(2), e1000308.
- Tavernier, V., Cadiou, S., Pageau, K., Laugé, R., Reisdorf-Cren, M., Langin, T. et al. (2007) The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in Phaseolus leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3351–3360.
- Tenuta, M. & Lazarovits, G. (2002) Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 92, 255–264.
- Tetteroo, F.A.A., Bomal, C., Hoekstra, F.A. & Karssen, C.M. (1994) Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate contents of developing embryos of carrot (*Daucus carota* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Seed Science Research*, 4, 203–210.
- Thaleneau, E., Fournier, C., Gravot, A., Wendehenne, D., Jeandroz, S. & Truong, H.N. (2018) Nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches* depends on plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 19, 664–676.
- Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K. & Broekaert, W.F. (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant Journal*, 19, 163–171.
- Tronchet, M., Balague, C., Kroj, T., Jouanin, L. & Roby, D. (2010) Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 11, 83–92.
- Turrion-Gomez, J.L. & Benito, E.P. (2011) Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Molecular Plant Pathology*, 12, 606–616.
- Vega-Mas, I., Sarasketa, A. & Marino, D. (2015) High-throughput quantification of ammonium content in *Arabidopsis*. *Bio-Protocol*, 5(16), e1559.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A. & Frommer, W.B. (2000) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 254–261.
- Wang, J. & Higgins, V.J. (2005) Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 284–292.
- Wang, L., Bau, H., Liao, H. & Chung, K. (2009) Factors affecting the production of elsinochrome phytotoxin by the citrus scab pathogen, *Elsinoë fawcettii*. *Open Mycology Journal*, 3, 1–8.
- Wang, M., Sun, Y., Gu, Z., Wang, R., Sun, G., Zhu, C. et al. (2016) Nitrate protects cucumber plants against *Fusarium oxysporum* by regulating citrate exudation. *Plant and Cell Physiology*, 57, 2001–2012.
- Wang, Y.Y., Hsu, P.K. & Tsay, Y.F. (2012) Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, 17, 458–467.
- Wipf, D., Ludewig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W. & Frommer, W. B. (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 139–147.
- Zeier, J. (2013) New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell and Environment*, 36, 2085–2103.

Zhao, Y., Lim, J., Xu, J., Yu, J.H. & Zheng, W. (2020) Nitric oxide as a developmental and metabolic signal in filamentous fungi. *Molecular Microbiology*, 113, 872–882.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Barrit, T., Porcher, A., Cukier, C., Sator, P., Guillemette, T., Limami, A.M. et al. (2022) Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the necrotrophic fungus, *Alternaria brassicicola*. *Physiologia Plantarum*, 174(1), e13621. Available from: <https://doi.org/10.1111/ppl.13621>

Supplemental material

Table S1. Primer sequences for real-time quantitative PCR amplification.

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>AtActin</i>	GGTAACATTGTGCTCAGRGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
<i>AtAMT1.1</i>	ACGACATTATCAGTCGC	CTGTCCTGTGTAGATTAACG
<i>AtAMT1.2</i>	TCGGATTAACTTGCTTGCC	ATTCTTTCCTTGCGAACAGC
<i>AtAMT2.1</i>	AGAAGATGAGATGGCAGGAATG	AAACAGTCAAGGTCGGTGTAG
<i>AtGDH1</i>	CAAGGCTTTATGTGGGAGGA	TGAGCCACACGATTAACACC
<i>AtGDH2</i>	GGATTCATGTGGGAAGAGGA	GCGACTCGGTAACTCCAAG
<i>AtGLN1.1</i>	CAATGAGGGAAGAAGGCGGT	CGCAACACCCCAAAGGAAAG
<i>AtGLN1.2</i>	CTTTCCTTTGGGGTGTTCG	AGCTGGCCTCCTATCCTCAA
<i>AtGLN1.3</i>	TAACCTCAACCTCACCGATGCCACC	CTTGGCAACGTCGGGGTGGCTG
<i>AtGLN1.4</i>	AGATTGGAATGGTGCAGGGG	TGTCACGCCCAACCCTAATC
<i>AtGLN1.5</i>	ATGGTGAAGGCAACGAGAGG	GCCACTCCCAAGAGAAAGT
<i>AtGLN2</i>	TTCGCCACAAGGAGCACAT	CGTGCTTTCCGGTCAACCT
<i>AtNIA1</i>	ACTAGGGCACATCGAG	TGCTTACTAGCCCATCC
<i>AtNIA2</i>	CAGTTTGCGGTTTCAGC	TCGTGAATACAACGAACAC
<i>AtNPF6.3</i>	AAAGCTGCCACACACTGAAC	ATTGTGCGACTGATAATGTCGT
<i>AtNRT2.1</i>	AGTCGCTTGCACGTTACCTG	ACCCTCTGACTTGGCGTTCTC
<i>AtP5CS</i>	CCAATATTCTCCACGTCCGCTTCTTC	GATCTCCGTCATAGTTTGTGTCTATC
<i>AtPAD3</i>	AACCCACCATTAAGGAGC	TCATAAAATATATACGGCGTCCG
<i>AtPDF1-2</i>	TTGCTGCTTTCGACGCA	TGTCCCACTTGGCTTCTCG
<i>AtPR-1</i>	GGTTAGCGAGAAGGCTAACTAC	CATCCGAGTCTCACTGACTTTC
<i>AtProDH</i>	TGATGGAGAAAGCATCAAACGG	TCTCCTCTTAAGTTCCATCCTC

Fig. S1. Gene expressions of *AMT1.2*, *GLN1.1*, *GLN1.5*, *P5CS* and *ProDH* in leaves of NH_4^+ - or NO_3^- -fed plants after H_2O treatment or fungal inoculation (Abra43).

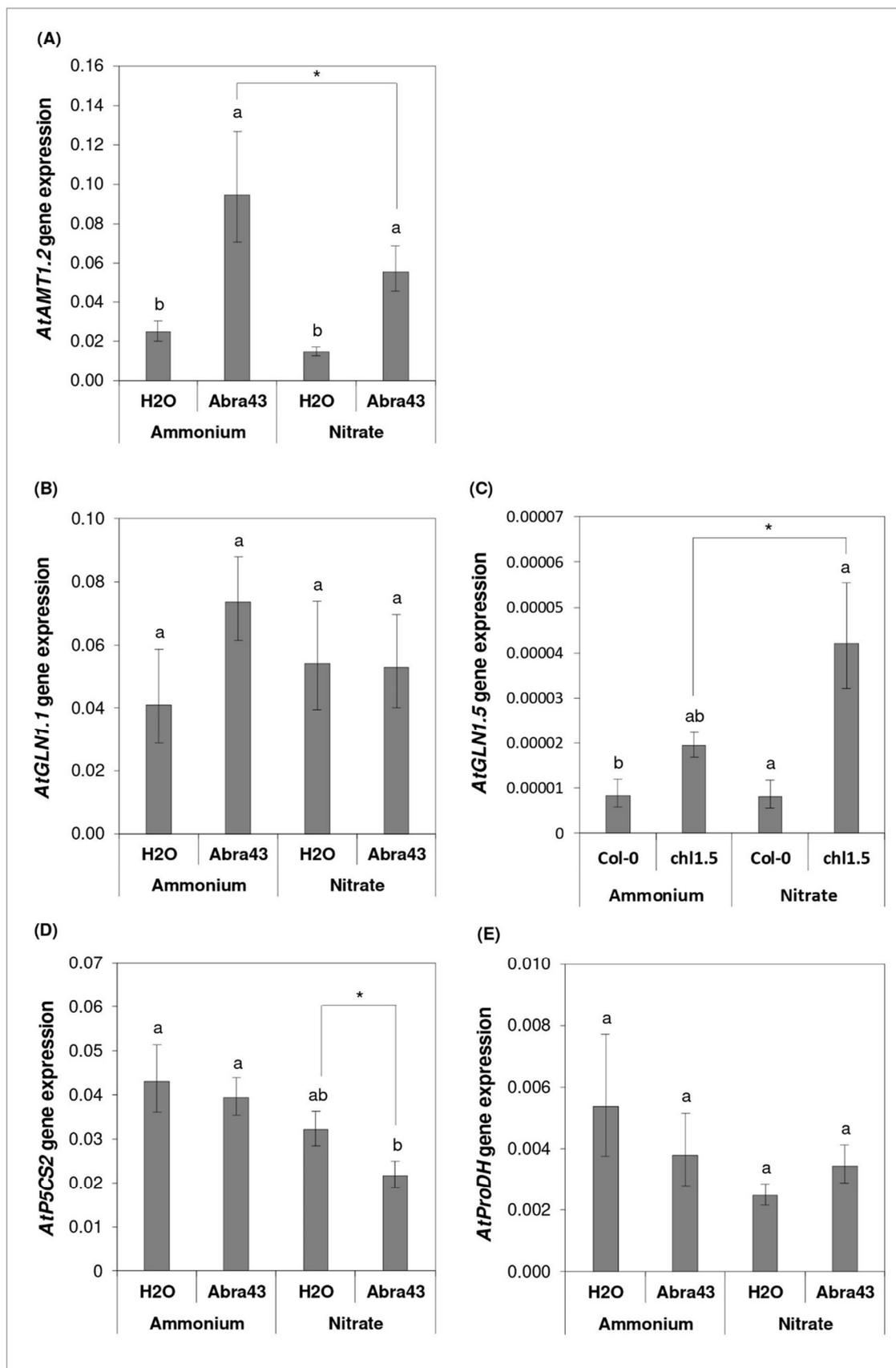
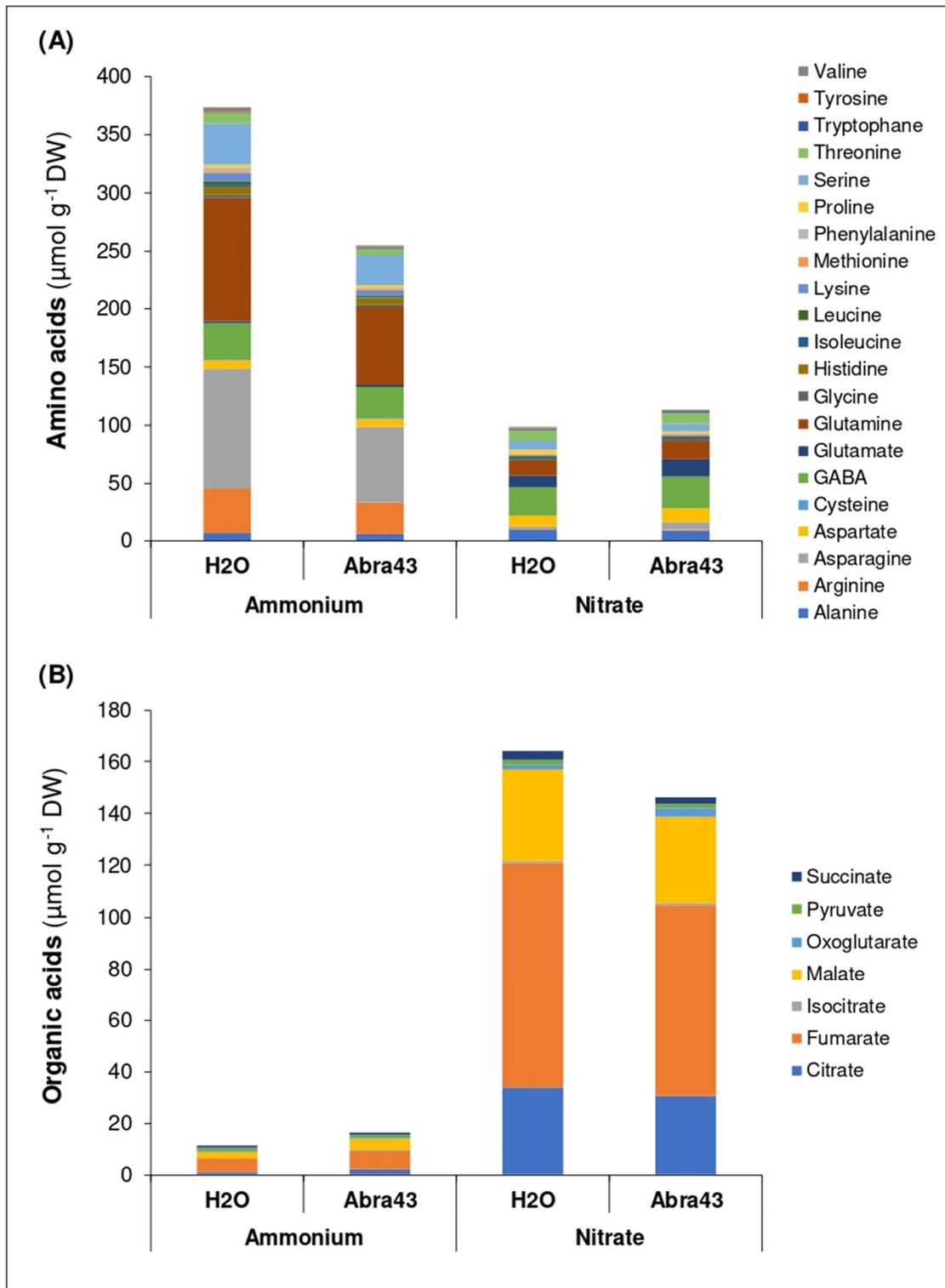


Fig. S2. Amino (A) and organic (B) acid contents in leaves of Col-0 plants, grown in presence of NH_4^+ or NO_3^- medium after treatment with sterile water (H_2O) or fungal inoculation (Abra43).



II.3. Conclusion

La présente étude a permis de mettre en évidence que la nutrition NO_3^- (5 mM) augmente la sévérité des symptômes causés par le champignon nécrotrophe *A. brassicicola* sur les feuilles d'*A. thaliana* au stade rosette. Trois facteurs principaux ont été mis en avant. Premièrement, la hausse de la sensibilité de la plante en condition NO_3^- pourrait être due à la production plus importante de NO par la nitrate réductase qui, au-delà de son rôle connu dans l'induction des voies de défenses, affecterait le métabolisme de la plante, facilitant ainsi l'infection fongique. Deuxièmement, des différences de profils d'AA ont été observées entre les deux conditions de nutrition azotée. Une teneur plus élevée en AA totaux est observée sous nutrition NH_4^+ par rapport à la nutrition sous NO_3^- , principalement en raison d'une hausse des concentrations en asparagine et glutamine. La condition NO_3^- se distinguant elle par le glutamate qui est le seul acide aminé dont la teneur augmente significativement après l'inoculation fongique. Ces changements de statut nutritionnel des plantes pourraient jouer un rôle dans leur différence de sensibilité en fonction du milieu, en fournissant au champignon plus ou moins de ressources nutritives assimilables ou en étant responsables d'une modulation des voies de défense. Enfin, un autre changement lié à la nutrition pourrait avoir un rôle dans la sensibilité inférieure au champignon des plantes cultivées sous NH_4^+ . En effet, l'induction des gènes codant des transporteurs de NH_4^+ et la baisse significative des concentrations de NH_4^+ dans les feuilles en condition inoculée, suggèrent un transport de NH_4^+ de la plante des parties malades vers les parties saines, privant potentiellement le pathogène de ressources azotées. Toutes ces informations mettent en avant l'importance du statut nutritionnel azoté de la plante dans les interactions avec les pathogènes fongiques, dépendant de la forme et de la concentration en N.

Le stade de développement de la plante est potentiellement un facteur important pour l'interaction plante-pathogène et pour le rôle de la nutrition azotée sur l'interaction. En effet, les stades précoces sont non seulement cruciaux pour l'établissement des cultures et le rendement, mais ils présentent également des particularités en ce qui concerne le métabolisme azoté. Ces stades précoces utilisent une source de N endogène (la remobilisation des protéines de réserve de la semence) en plus de N présent dans le milieu. De plus, *A. brassicicola* est un champignon transmis à et par la semence, responsable de fontes de semis, faisant du pathosystème étudié dans ce chapitre un bon modèle pour une étude du rôle de l'azote durant l'établissement des plantules. Nous avons donc poursuivi ce travail sur le rôle de N dans l'interaction plante-pathogène en s'intéressant au stade plantule et à la comparaison avec le stade adulte.

Chapitre III. Développement d'un dispositif expérimental pour l'étude au stade plantule et influence de la nutrition azotée et du génotype sur la sensibilité des plantules

III.1 Introduction

Les résultats obtenus dans le chapitre 1 ayant montré un effet de la nutrition azotée d'*A. thaliana* sur sa sensibilité à *A. brassicicola* au stade rosette, le rôle de la nutrition azotée (différentes formes et concentrations) a été étudié sur ce même pathosystème au stade plantule. L'étude de l'impact de la nutrition azotée sur l'interaction plante-pathogène à ce stade de développement a nécessité la mise au point d'un dispositif permettant d'évaluer le développement aérien et racinaire des plantules, ainsi que la sévérité de la maladie, dans un environnement stérile et contrôlé d'un point de vue nutritif. Ceci a donc constitué un premier objectif de l'étude. Un dispositif *in vitro* a été mis au point permettant des conditions de cultures des plantules optimales et modulables selon les besoins expérimentaux, sur un génotype, Col-0, cultivé dans une condition de N (5 mM NO₃⁻). Ce dispositif a notamment permis de mettre en place le protocole d'inoculation, permettant une contamination homogène des plantules par le champignon. Le dispositif a ensuite été élargi à plusieurs génotypes et conditions azotées, et l'évaluation de l'impact du champignon sur les plantules a été effectuée, grâce à une méthode d'imagerie mise au point au cours de cette étude. Une fois la mise au point du dispositif finalisée, il a été utilisé pour évaluer la sensibilité au champignon de trois écotypes plus ou moins sensibles au champignon au stade rosette, en fonction de la forme et de la concentration en N (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ et 5 mM NO₃⁻). Les résultats obtenus au stade plantule ont enfin été comparés à des résultats obtenus au stade adulte, sur des plantes des 3 mêmes génotypes cultivés dans un milieu nutritif en hydroponie (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ et 5 mM NO₃⁻). Ce travail est exposé dans l'article « A new *in vitro* device reveals a specific influence of *Arabidopsis* nitrogen nutrition on its susceptibility to *Alternaria brassicicola* at the seedling stage », soumis à la revue Plant Methods. Des résultats complémentaires sont également présentés, sur l'influence du génotype, du milieu azoté et de la présence du champignon sur la germination des graines.

III.2. Article numéro 2 : A new *in vitro* device reveals a specific influence of *Arabidopsis* nitrogen nutrition on its susceptibility to *Alternaria brassicicola* at the seedling stage

A new *in vitro* device reveals a specific influence of *Arabidopsis* nitrogen nutrition on its susceptibility to *Alternaria brassicicola* at the seedling stage

Thibault Barrit, Claire Campion, Sophie Aligon, Julie Bourbeillon, David Rousseau, Elisabeth Planchet, Béatrice Teulat*

Institut Agro, Univ Angers, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, 49000 Angers, France

*correspondence: beatrice.teulat@agrocampus-ouest.fr

Abstract

Background: Seedling growth is an early phase of plant development highly susceptible to environmental factors such as soil nitrogen (N) availability or presence of seed-borne pathogens. Whereas N plays a central role in plant-pathogen interactions, its role had never been studied during this early phase for the pathosystem *Arabidopsis thaliana* and *Alternaria brassicicola*, a necrotrophic seed-transmitted fungus. The aim of the present work was to develop an *in vitro* device allowing to study the impact of the fungus on *A. thaliana* seedling growth, while modulating N nutrition.

Results: The developed device consists of square plates placed vertically and filled with nutrient agar medium allowing modulation of N conditions. Seeds are inoculated after sowing by depositing a droplet of conidial suspension. A specific semi-automated image analysis pipeline based on the Ilastik software was developed to quantify the impact of the fungus on seedling aerial development, calculating an index accounting for every aspect of fungal impact, namely seedling damping-off, necrosis and developmental delay. The device also permits root elongation to be monitored. The interest of the device was then confirmed by characterising how N media composition (0.1 and 5 mM of nitrate (NO₃⁻), 5 mM of ammonium (NH₄⁺)) affects the impact of the fungus on three *A. thaliana* ecotypes. Seedling development was strongly and negatively affected by the fungus. However, seedlings grown with 5 mM NO₃⁻ were less susceptible than those grown with NH₄⁺ or 0.1 mM NO₃⁻, which differed from what was observed with adult plants (rosette stage).

Conclusions: The developed device allows accurate determination of seedling growth characteristics (both on aerial and root parts) and symptoms. Altogether, the device could be used to study the impact of plant nutrition on susceptibility of various genotypes to fungi at the seedling stage.

Keywords: ammonium, image analysis, necrosis, necrotrophic fungus, nitrate, root, seedling, symptom

Background

Rapid and homogeneous seedling growth is crucial for successful crop establishment and yield. However, this early stage of plant development is highly susceptible to environmental conditions including variations of nitrogen (N) availability in the soil [1-2], as well as development of diseases generally caused by seed- and soil-borne plant pathogens [3-4].

Nitrogen plays a crucial role driving plant development, growth and yield. Nitrate (NO_3^-), the main form and source of N absorbed by seedlings and young plants in temperate regions, also acts as a major signal molecule modulating plant metabolism, growth and plant defence responses [5]. Nitrogen uptake and metabolism are also central to plant defence mechanisms as they provide the material for defence compounds and allow N mobilisation away from pathogens [6]. For instance, the phytoalexin camalexin, which has been shown to have an effect in the *Arabidopsis thaliana* - *Alternaria brassicicola* interaction [7], is derived from the tryptophan amino acid [8]. Amino acids, including methionine, phenylalanine and tryptophan, are also the basis of phytoanticipins such as glucosinolates in plants of the *Brassicaceae* family [9] which, once broken down into isothiocyanates and nitriles, may be toxic to fungi, bacteria and insects [10]. Another important molecule involved in plant defence mechanisms and derived from NO_3^- , is nitric oxide (NO). NO is rapidly accumulated during biotic stress conditions and plays a role in phytoalexin accumulation [11] and salicylic acid biosynthesis [12], a major pathway for plant resistance to infection leading for instance to hypersensitive response [13]. Nitrogen is not only vital for the plants, but also for the fungal pathogens, the latter being entirely dependent on plant N sources, such as NO_3^- , ammonium (NH_4^+) and free amino acids, for their growth [14]. This makes the host N metabolism a direct factor affecting fungal growth, by modulating the N sources available for the invader.

The role of N on pathogenicity is unclear. Indeed, a large supply of exogenous N improves plant nutrition and defences but can also promote disease development, by increasing the availability of N compounds assimilable by the pathogen [15-16]. It has been shown that high N fertilisation could promote the disease [17-18] or increase host resistance [19], which would suggest that the role of N in the plant-pathogen interaction is complex and pathosystem specific. In addition to the overall availability of N, its form also plays an important role in plant-pathogen interaction. Studies have shown that NH_4^+ nutrition could increase disease severity compared to NO_3^- [20-21], while the contrary was observed in other pathosystems [22], notably *A. thaliana* - *A. brassicicola* [23].

Until now, inorganic N fertilisers and conventional agrochemicals, such as fungicides, have been widely used for many years to protect seeds and seedlings against various stresses in the

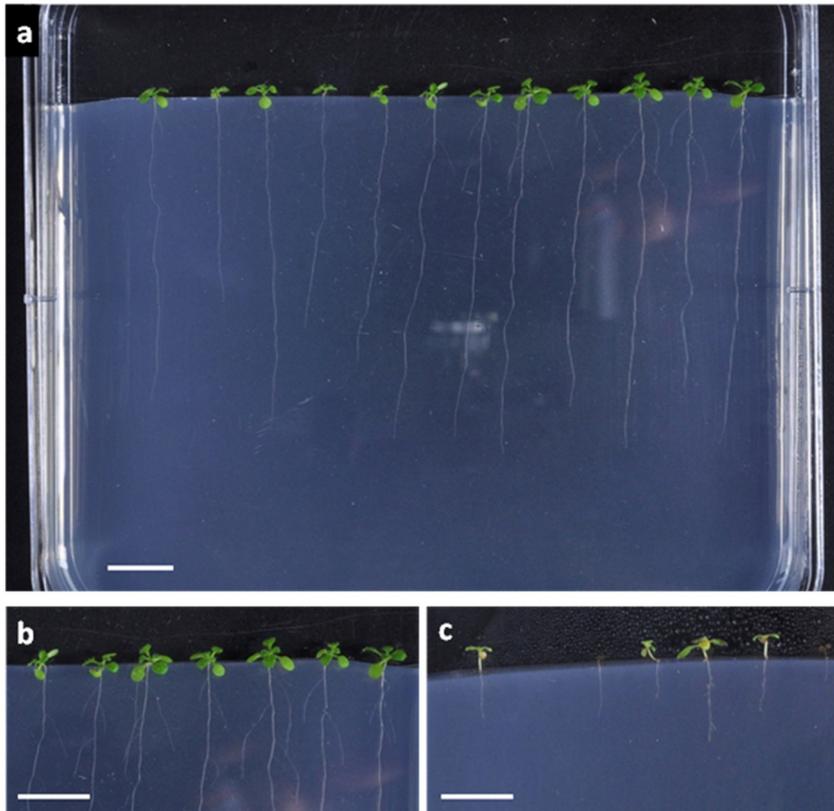


Figure 1: Pictures of 14 days old Col-0 seedlings in vertical square plates filled with MS modified agar medium supplemented with 5 mM KNO₃ (scale bars = 1 cm). **(a)** Overview of a square plate. **(b)** Seedlings treated with sterile water. **(c)** Seedlings inoculated with *A. brassicicola*.

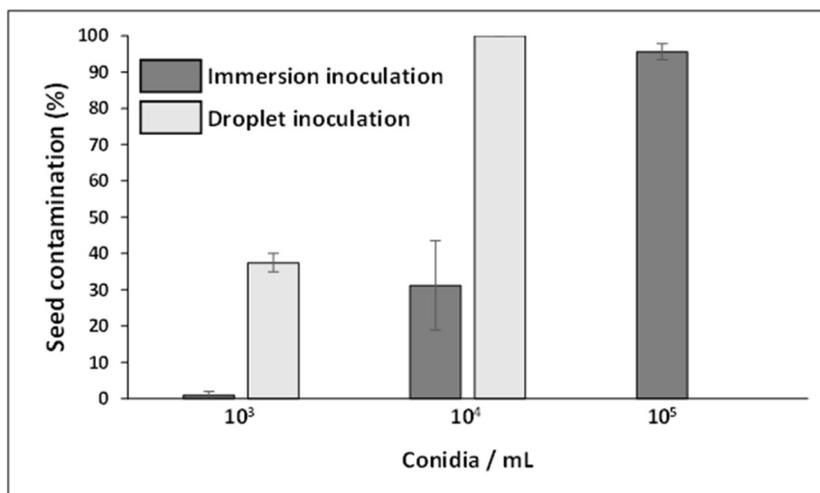


Figure 2: Seed contamination percentage observed 3 DAI for the immersion and droplet methods at different *A. brassicicola* conidial suspension concentrations (10³, 10⁴ and 10⁵ conidia per mL). Values are means of 20 seeds per biological replicate, 8 biological replicates. Error bars indicate standard error of the mean (SEM).

seedbed and to increase seedling establishment. However, the agro-ecological transition requires a substantial reduction of N input and seed treatment with fungicides. These practices would however promote the presence of seed-borne pathogens such as necrotrophic fungi on both seeds and seedlings. Moreover, N fertilisers do not only affect seedling growth but can also have different effects on disease development, shifting the balance in favour of the host or of the pathogen as reported at other stages of plant development [6, 17]. In this context and surprisingly, the impact of N fertilisation on the interaction between plants and pathogens has been little studied at the seedling stage and requires more investigation.

In order to study the impact of N nutrition on plant-pathogen interaction during seedling development, one would need a protocol allowing symptom severity, fungus growth and seedling development (*i.e.* aerial and root parts) to be monitored, in a nutrient controlled sterile environment. Studies on early plant stage interaction with pathogens commonly involve an inoculation on seven to eighteen days old seedlings growing in soil [18, 24-25] or in a Petri dish [26], neither permitting the study of the interaction during germination, early seedling growth nor root development. In order to investigate the interaction as early as possible, the inoculation has to take place directly on the seeds, by placing them in contact with dry spores or by immersing them in an inoculum suspension [27-29]. The best option to achieve a sterile and controlled environment allowing to monitor both aerial and root growth seems to be the use of agar media [30]. A protocol combining a seed inoculation with a modular sterile agar medium could therefore be a good solution to study the role of N on the plant-pathogen interaction during seedling development.

In the present work, we developed such a device, focusing on the interaction between the model plant for the *Brassicaceae* family *A. thaliana* and the necrotrophic fungus *A. brassicicola*. *A. thaliana* is a practical and already well studied model for host-pathogen interactions [31], and the interaction with *A. brassicicola*, in particular, has been abundantly used as a model for diseases caused by fungal necrotrophs [32]. This fungus is responsible for the black spot disease on leaves of *Brassicaceae* plants [33], leading to important worldwide economic losses [34]. Infection with *A. brassicicola* is however NOT limited to the leaves, but this fungus can affect all aerial parts of the plant, such as siliques and seeds in particular. Such a wide infection spectrum constitutes an important mode of conservation and transmission of the fungal inoculum and therefore makes of *A. brassicicola* a major seed-borne disease leading to seedling damping-off [35-37]. The device, allowing both homogenised seed contamination and following seedling aerial and root development by image analysis, was firstly developed on one *A. thaliana* ecotype grown in one N nutrition medium, 5 mM NO₃⁻. To validate its interest for screening the impact

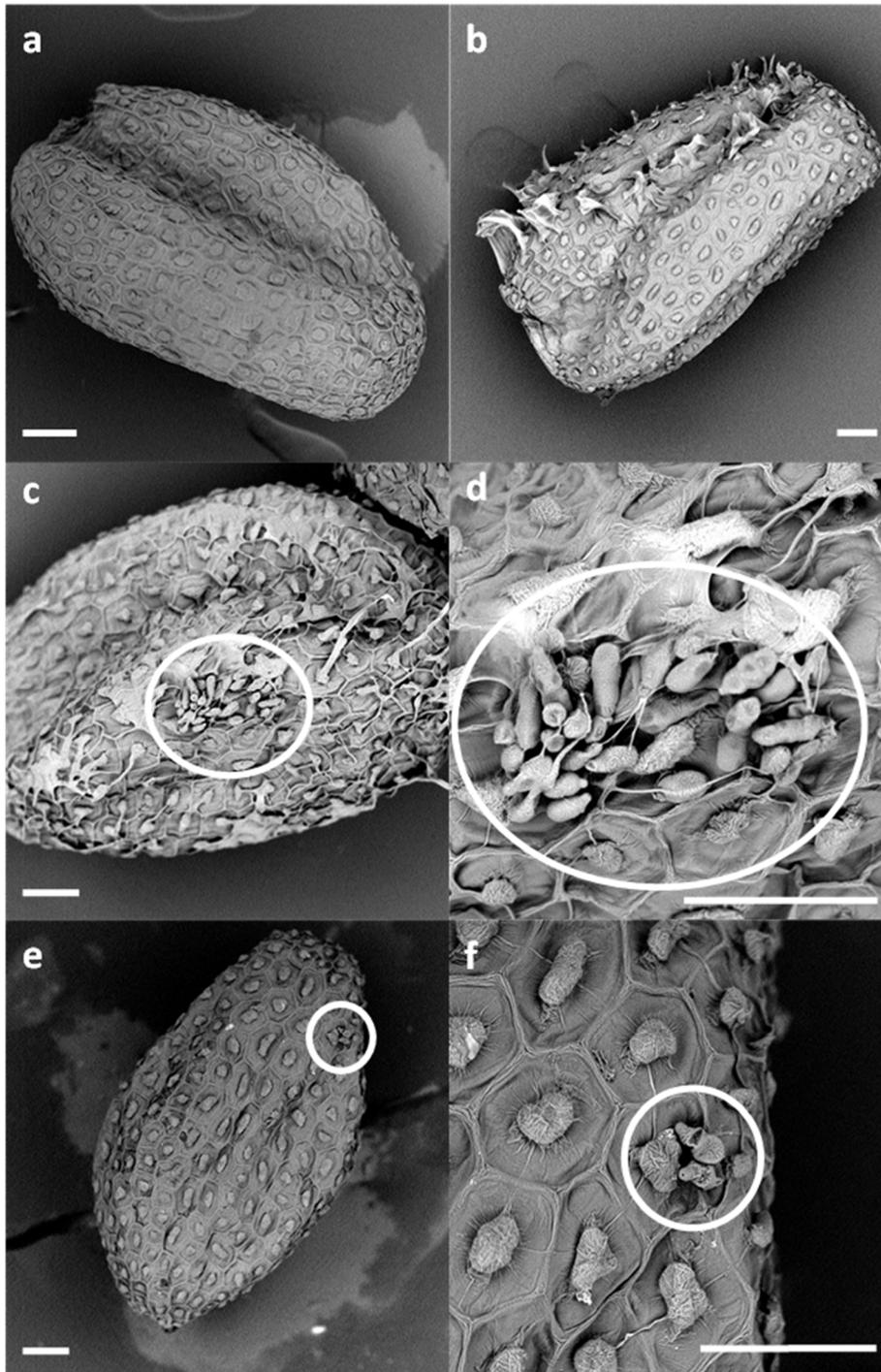


Figure 3: Scanning electron microscopy observations showing the heterogeneity of *A. thaliana* seed contamination with the immersion method compared to the droplet method, white circles highlighting *A. brassicicola* conidia. The white scale bars show 50 μm .

(a) Seed treated with sterile water. (b) Seed inoculated with the immersion method (10^5 conidia. mL^{-1}) showing no *A. brassicicola* conidia on its surface. (c) Seed inoculated with the immersion method (10^5 conidia. mL^{-1}) presenting a cluster of conidia on its surface, (d) zoom on the conidia cluster. (e) Seed inoculated with the droplet method (10^4 conidia. mL^{-1}) presenting 2 conidia on its surface, (f) zoom on the conidia.

of the fungus on seedling growth, the protocol was then used to characterise the response to the fungus of three ecotypes with contrasting susceptibilities, on three N media varying in forms and concentration (5 mM NH_4^+ , 0.1 mM NO_3^- and 5 mM NO_3^-). Finally, the results obtained at seedling stage with this developed protocol were compared with behaviours at the adult stage (*i.e.* rosette).

Results

The developed device allows studying how the fungus affects seedling growth

A new device, allowing an extensive study of the effects of the fungus on seedling growth, was developed (Fig. 1). Seeds of the *A. thaliana* Columbia (Col-0) ecotype, either treated with sterile water (H_2O) or inoculated with the Abra43 fungus, were sown in vertical square plates on agar Murashige and Skoog [38] modified medium supplemented with 5 mM NO_3^- (see the Methods section ; Fig. 1a). Using this device, seedlings can develop at least to the four-leaf stage, and the impact of the fungus on both seedling aerial and root system development can be monitored, as shown in the figures 1b and 1c with four-leaf stage seedlings treated with H_2O and inoculated seedlings affected by the fungus, respectively.

Choice of seed inoculation method

Two methods were tested for seed inoculation with *A. brassicicola*: (i) seed immersion in a conidial suspension (10^3 , 10^4 or 10^5 conidia per mL) and (ii) deposition of a droplet of conidial suspension (10^3 or 10^4 conidia per mL) on each individual seed. Results obtained at 3 days after inoculation (DAI) showed that the droplet method of inoculation allowed 100% of the seeds to be contaminated using a suspension of 10^4 conidia per mL contrary to the immersion method which allowed a lower and heterogeneous contamination rate, even with 10^5 conidia per mL (Fig. 2). In addition, even though the contamination rate is close to 100% with the immersion method of inoculation at 10^5 conidia per mL, observations of 50 seeds by scanning electron microscopy revealed that conidia were not homogeneously distributed on the seed surface, with three categories of conidia distribution (Fig. 3), seeds exhibiting either no conidia (Fig. 3b), a few conidia (not illustrated) or a cluster of conidia (Fig. 3c and 3d) on their surface. It is also important to note that symptoms on seedlings were too severe with 10^5 conidia per mL preventing the observation of seedlings at 14 DAI (data not shown), which could be explained by the conidial clusters, as illustrated on figures 3c and 3d. On the contrary, none of the 210 observed seeds inoculated with the droplet method with 10^4 conidia per mL presented any cluster of conidia on their surface, but only a few scattered conidia (Fig. 3e and 3f). The droplet

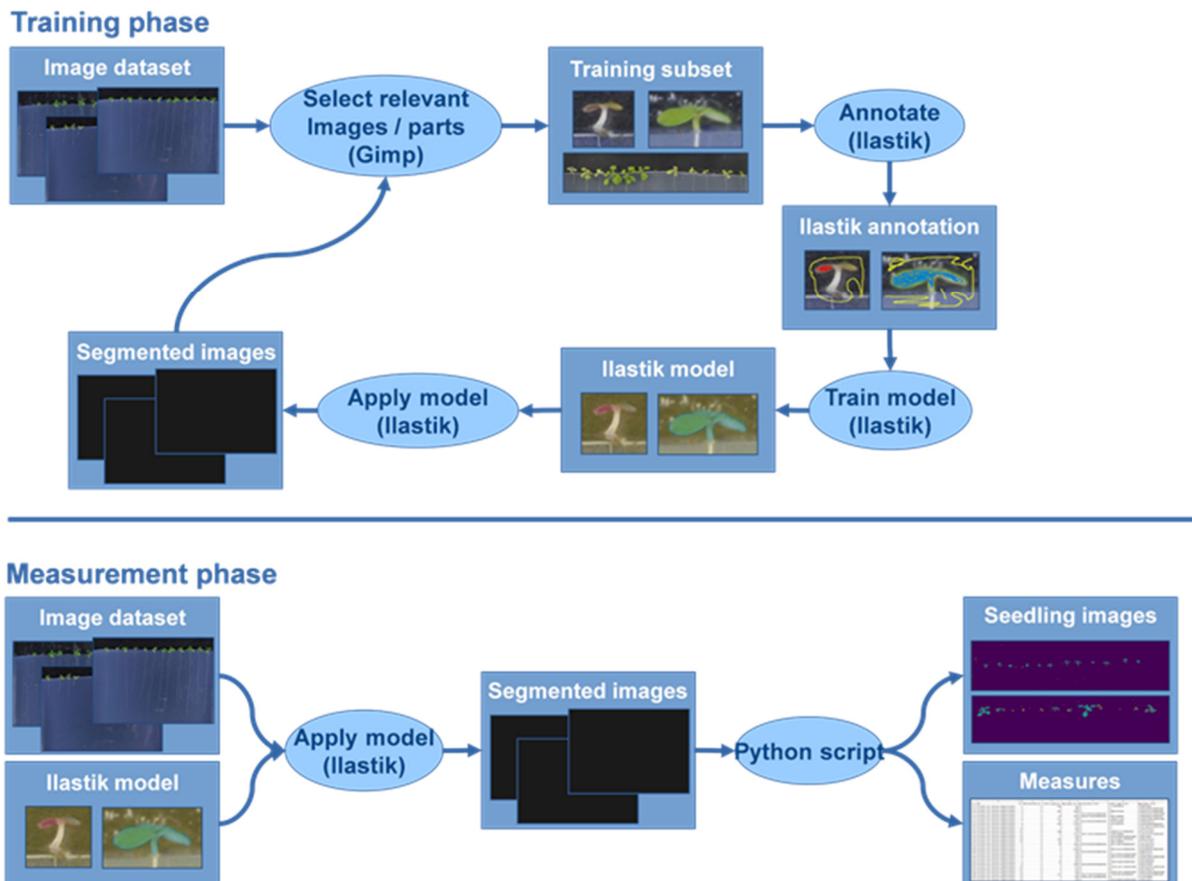


Figure 4: Overview of the semi-automated pipeline used to detect and calculate the green and necrotic areas per square plate, using the ilastik software. The pipeline is divided in two steps: (a) a software training phase on a sample of images and (b) the analysis of every image and computation of the surfaces. In the training phase, blue pixels correspond to green areas, red pixels to necrotic areas and yellow pixels to the background.

method of inoculation with a suspension of 10^4 conidia per mL was thus chosen as it allowed a more homogeneous seed contamination, as well as a compromise between disease severity and seedling development.

Development of an image analysis method to evaluate the impact of the fungus on seedling aerial development

In order to evaluate the impact of the N supply condition, of the fungus and of their interaction on seedling aerial part growth, a method based on a semi-automated image analysis pipeline was developed associating the Ilastik software [39] with a Python script. The first stage of the process consisted in training a classification random forest model with Ilastik. Twenty-five representative images were selected and annotated by associating pixels to a class. Three classes were defined corresponding to healthy tissues (green), necrotic tissues (brown) and all other objects present in the image that do not correspond to aerial parts of seedlings (Fig. 4a). Once the model trained, it was applied to the other images to identify the healthy (green) and necrotic (brown) pixels of aerial parts of the seedling (leaves, cotyledons and hypocotyl) per square plate (Fig. 4b). Classification results were then subjected to the Python script to evaluate the areas of healthy and necrotic tissues and generate colour-coded final images. The model was validated on a technical standpoint by comparing the spatial overlap between 30 representative seedlings annotated by the Ilastik model or by an expert observer using the ImageJ software, as reported in the Methods section.

To express the results, a healthy area index (HAI) representing the impact of the fungus on seedling aerial growth was developed. It depicts the percentage of healthy area variation between seedlings treated with H₂O (HA_{H₂O}) and Abra43 (HA_{Abra43}) and integrates both direct and indirect fungal effects (area deficit due to necrotic tissues and seedling growth deficit, respectively).

$$\text{HAI} = ((\text{HA}_{\text{H}_2\text{O}} - \text{HA}_{\text{Abra43}}) / \text{HA}_{\text{H}_2\text{O}}) * 100$$

The impact on the fungus was also measured using a visual rating scale (VRS) to quantify the symptom severity on the aerial parts of seedlings. The VRS integrated both colonisation by the mycelium and necrotic area, evaluated on seedlings, and was based on a score ranging from 0 (no symptom) to 5 (100% of surface area colonised and dead seedlings) (Table 1) assigned by an expert observer.

In order to find out if the HAI and the VRS produced similar results regarding the fungal effect on seedlings, the correlation between the two methods was investigated (Fig. 5a). If the results of two methods shared a similar tendency, they did not correlate very well ($R^2 = 0.67$,

Table 1. Illustration and description of the visual rating scale (VRS) used to evaluate the symptoms observed on the aerial parts of the seedlings. The scale integrated colonization by the mycelium and necrotic area on cotyledon and hypocotyl criteria, and was based on a score ranging from 0 to 5 (no symptoms to 100%) assigned by an expert observer.

Illustration of a representative cotyledon /seedling	Visual rating description
	<p>Rating = 0 No mycelium colonization nor necrosis on seedlings No impact on seedling development, four-leaf stage seedlings in general</p>
	<p>Rating = 1 Minimal mycelium colonization and necrosis on seedlings (< 25% of surface area) No impact on seedling development, four-leaf stage seedlings in general</p>
	<p>Rating = 2 Mycelium colonization and necrosis on seedlings (25% < necrosis < 50% of surface area) Small impact on seedling development, smaller four-leaf stage seedlings in general</p>
	<p>Rating = 3 Important mycelium colonization and necrosis on seedlings (50% < necrosis < 75% of surface area) Impact on seedling development, two-leaf stage seedlings in general</p>
	<p>Rating = 4 Almost total mycelium colonization and necrosis on seedlings (75% < necrosis < 99% of surface area) Important impact on seedling development, cotyledon stage seedlings in general</p>
	<p>Rating = 5 Total mycelium colonization and necrosis on seedlings (= 100% of surface area) Dead cotyledon stage seedlings</p>

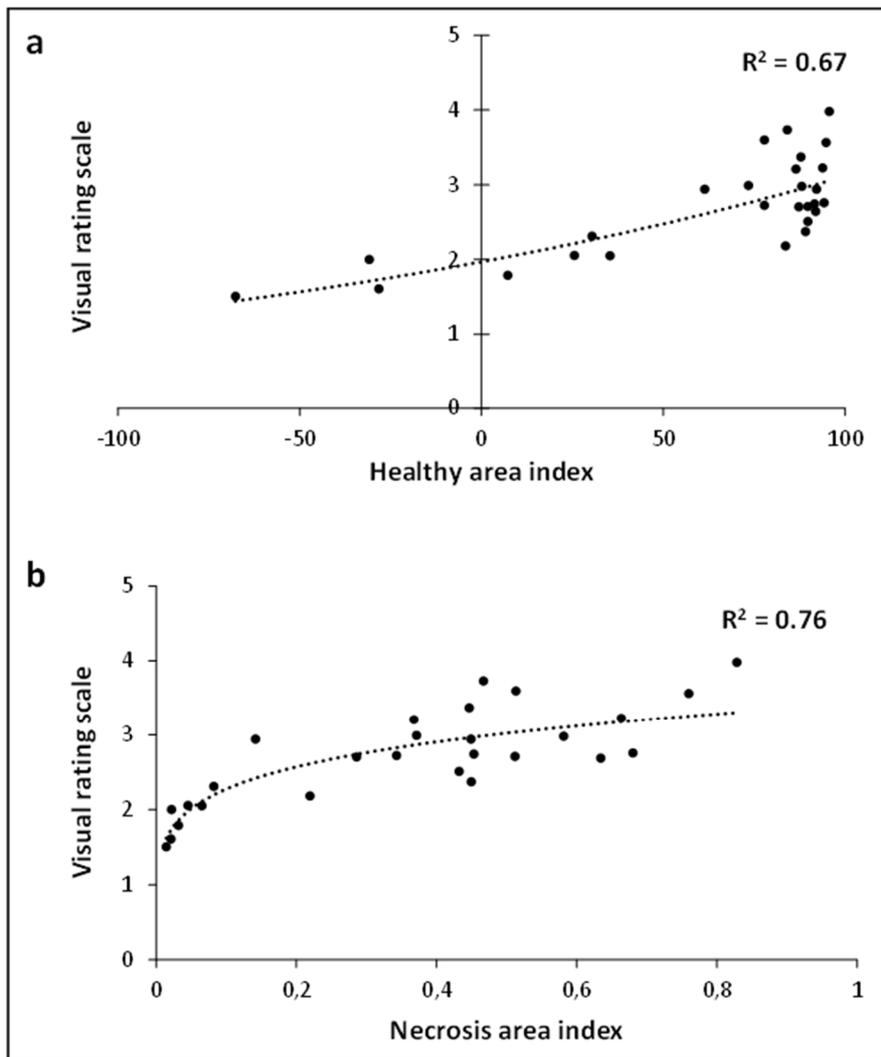


Figure 5: Correlation between the Ilastik-based indexes and the visual rating scale (VRS). Each point corresponds to the mean of three plates of 12 seedlings for a set of conditions. **(a)** VRS as a function of healthy area index, supplemented with the estimated correlation curve and R^2 coefficient. **(b)** VRS as a function of necrosis area index, supplemented with the estimated correlation curve and R^2 coefficient.

Table 2.

(a) Average values of green area, in square millimetres (per square plate), for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻), 14 DAI with sterile H₂O. Twelve seedlings per square plate, 3 square plates per independent experiment, 3 independent experiments. Lowercase letters indicate a statistical difference between genotypes, inside a N condition. Uppercase letters indicate a statistical difference between N conditions, inside a genotype, for each N condition separately and for their mean. No letter indicates the absence of statistical difference for the comparison. The different factor effects and their interaction are presented at the bottom of the table, with the *P*-value. Significance of *P*: 0 < *** < 0.001.

(b) Average values of green area ratio between seedlings treated with H₂O and seedlings inoculated with *Abra43*, for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻), 14 DAI. Twelve seedlings per square plate, 3 square plates per independent experiment, 3 independent experiments. Lowercase letters indicate a statistical difference between genotypes, inside a N condition. Uppercase letters indicate a statistical difference between N conditions, inside a genotype, for each N condition separately and for their mean. No letter indicates the absence of statistical difference for the comparison. The different factor effects and their interaction are presented at the bottom of the table, with the *P*-value. Significance of *P*: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01.

a

Green area (mm ²)	5 mM NH ₄ ⁺	0.1 mM NO ₃ ⁻	5 mM NO ₃ ⁻	Genotype mean
Col-0	25.2 ± 1.82 (a, B)	16.9 ± 2.19 (a, B)	53.3 ± 4.44 (A)	31.8 ± 3.49
<i>Ler</i>	9.4 ± 1.16 (b, B)	11.0 ± 0.58 (b, B)	42.0 ± 4.34 (A)	20.8 ± 3.28
<i>Ws</i>	21.8 ± 3.07 (a, B)	19.1 ± 1.02 (a, B)	50.9 ± 4.45 (A)	30.6 ± 3.33
Nitrogen condition mean	18.8 ± 1.79 (B)	15.7 ± 1.04 (B)	48.7 ± 2.62 (A)	27.7 ± 2.00
Genotype (G) effect			<2e-16 ***	
Nitrogen (N) effect			<2e-16 ***	
G x N effect			0.6802	

b

Fungus impact (%)	5 mM NH ₄ ⁺	0.1 mM NO ₃ ⁻	5 mM NO ₃ ⁻	Genotype mean
Col-0	89.8 ± 1.54 (A)	91.9 ± 1.38 (ab, A)	-3.9 ± 16.54 (b, B)	59.3 ± 10.26
<i>Ler</i>	85.9 ± 4.70 (AB)	92.7 ± 1.15 (a, A)	67.36 ± 8.85 (a, B)	82.5 ± 3.75
<i>Ws</i>	82.0 ± 3.40 (A)	86.9 ± 1.75 (b, A)	4.8 ± 12.28 (b, B)	54.7 ± 9.09
Nitrogen condition mean	86.2 ± 2.04 (A)	90.6 ± 0.95 (A)	21.0 ± 9.47 (B)	65.7 ± 4.87
Genotype (G) effect			0.000139 ***	
Nitrogen (N) effect			<2e-16 ***	
G x N effect			4.66e-5 ***	

exponential function, $y=1.9709e^{0.0046x}$), with a very uneven distribution. Another way to evaluate the fungal impact on seedlings, closer to what is measured with the VRS, would be the necrosis area index (NAI) obtained by dividing the necrosis area by the total area (necrosis + healthy area) of a squared plate. This index correlated better with the VRS ($R^2 = 0.76$, power function, $y=3.4141x^{0.1764}$; Fig. 5b) and presented a very balanced distribution, indicating that it seemed possible to infer the results of VRS from the measures evaluated with the Ilastik model.

It is to note that both HAI and NAI appeared to assess the fungal impact in a more satisfactory way than the VRS. Firstly, VRS being based on a rating given by an observer makes it more qualitative and less objective than methods based on pixel quantification by a software. Secondly, the comparison of the two most correlated methods showed that NAI distribution of values evenly covered the full range of possible values (from 0 to 1) while VRS was only restricted to the 1.5-4 range, the two extremes of the scale being totally unused and not allowing for an adequate representation and discrimination of the fungal impact high variability. Finally, HAI was deemed superior to NAI because it was a more complete representation of the fungal effect on seedlings. Indeed, NAI measured solely the necrosis areas while HAI considered not only the necrosis areas, which are deduced of the measured healthy areas, but also the healthy area deficit caused by the fungal presence, seedling damping-off and non-developed organs mostly which are very important aspects of the fungal impact on seedlings. HAI was thus chosen to express the impact of the fungus on seedling growth.

The new device reveals different and specific seedling susceptibility to the fungus depending on nitrogen conditions at the seedling stage

The device was developed using the Col-0 ecotype on a 5 mM of NO_3^- agar medium with seeds treated with either sterilised water or conidia suspension. To confirm whether it enables discriminating susceptibility to the fungus between genotypes and N growth conditions, three ecotypes presenting different susceptibility to the pathogen at adult stage [40] were tested on different media varying in concentration and form of N. The selected ecotypes were Col-0 (resistant), Wassilewskija (Ws; susceptible) and Landsberg *erecta* (Ler; susceptible) which were grown on media in presence of 5 mM of NO_3^- , 0.1 mM of NO_3^- or 5 mM of NH_4^+ .

Seedling aerial growth is affected by the fungus depending on genotype and nitrogen conditions

The developed image analysis pipeline (Fig. 4) has allowed quantifying the aerial growth of seedlings from seeds treated with H_2O by measuring their green area ($\text{HA}_{\text{H}_2\text{O}}$; Table 2a). In

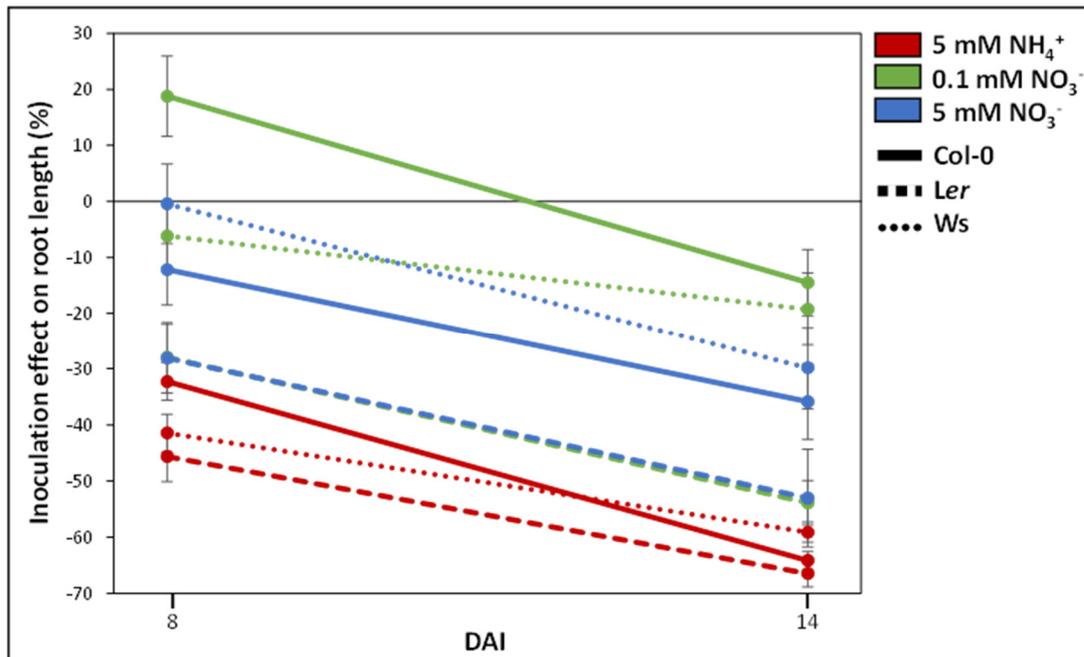


Figure 6: Primary root length (PRL) variation between H₂O and Abra43 seedlings at 8 and 14 DAI, expressed as a percentage and calculated as follows: $100 * ((PRL_{Abra43} - PRL_{H2O}) / PRL_{H2O})$. Red lines correspond to 5 mM NH₄⁺, green lines to 0.1 mM NO₃⁻ and blue lines to 5 mM NO₃⁻. Solid lines correspond to Col-0, dashed lines to *Ler* and dotted lines to *Ws*. Error bars indicate SEM.

absence of the fungus, seedling aerial green area was higher under 5 mM NO₃⁻ nutrition, with an average of 48.7 mm² per square plate, compared to under the two others N media (18.8 and 15.7 mm² in average for 5 mM NH₄⁺ and 0.1 mM NO₃⁻, respectively) (Table 2a). Significant differences were also found between genotypes, with *Ler* showing lower green leaf area than Col-0 and Ws under both 5 mM NH₄⁺ and 0.1 mM NO₃⁻. Then, using the calculated HAI allowed revealing the effect of N media on susceptibility to the fungus (Table 2b). Seedlings grown under 5 mM NH₄⁺ or 0.1 mM NO₃⁻ were dramatically affected, with a fungal impact amounting for more than 80% of green area deficit for both N conditions and for all genotypes, compared to the H₂O treated seedlings (Table 2b). On the contrary, seedlings grown under 5 mM NO₃⁻ were less susceptible to the fungus (green area reduced by 21% on average). It is also important to note the significant interaction between genotype and N nutrition for HAI, notably explained by the different response of genotypes under 5 mM NO₃⁻, with both Col-0 and Ws seemingly unaffected in their growth (-4% and +5% of fungal impact on green area, respectively), and by contrast, *Ler* that was highly impacted (67% reduction of green area). In addition to the different susceptibilities to the fungus revealed depending on N media and genotypes, infected seedlings grown under 5 mM NO₃⁻ appeared particularly healthy as they were at the same time more developed in control conditions and less affected by the fungus.

The presence of fungus also impacts primary root elongation depending on genotype and nitrogen conditions

Primary root length was measured at both 8 and 14 DAI by image analysis with the Image J software (Table S1a and Table S1b). At 8 DAI, root length highly differed between genotypes (G effect), N media (N effect) as well as inoculation modalities (I effect). All interactions between these factors were also significant, with the G x N effect the most significant (Table S1a). *Ler* presented the shortest roots compared to Col-0 and Ws. Regarding N effect, roots were the shortest under 5 mM NH₄⁺ (7 mm in average) and the longest under 5 mM NO₃⁻ (13.8 mm in average). Finally, when considering all the data, the presence of the fungus negatively affected root elongation (-12.8% in average). This was mainly due to the NH₄⁺ condition where the reduction was the strongest for all the genotypes (-38.2% in average). For the NO₃⁻ conditions, various genotype behaviours were observed in accordance with the significant interactions revealed (Table S1a), and this is more visible when results were expressed as an index of response of root length to the presence vs the absence of the fungus (Fig. 6). Indeed, root length was highly affected under both nitrate conditions for *Ler*, but not affected for Ws. Regarding Col-0, root length decreased in the presence of the fungus under 5 mM but increased

Table 3. Average values of fungal lesions for Col-0, *Ler* or *Ws* adult plants grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻) in a hydroponic system, 7 DAI. Four leaves per plant, 6 plants per independent experiment, 3 independent experiments. Lowercase letters indicate a statistical difference between genotypes, inside a condition of N, for each genotype separately and for their mean. Uppercase letters indicate a statistical difference between N conditions, inside a genotype, for each N condition separately and for their mean. No letter indicates the absence of statistical difference for the comparison. The different factor effects and their interaction are presented at the bottom of the table, with the *P*-value. Significance of *P*: 0 < *** < 0.001.

Fungal lesions (mm ²)	5 mM NH ₄ ⁺	0.1 mM NO ₃ ⁻	5 mM NO ₃ ⁻	Genotype mean
Col-0	0.39 ± 0.07 (b, B)	0.82 ± 0.13 (b, A)	1.05 ± 0.12 (b, A)	0.76 ± 0.07 (b)
Ler	0.87 ± 0.17 (a, B)	1.88 ± 0.18 (a, A)	1.78 ± 0.23 (a, A)	1.51 ± 0.13 (a)
Ws	0.89 ± 0.13 (a, B)	1.97 ± 0.28 (a, A)	1.44 ± 0.14 (ab, AB)	1.43 ± 0.13 (a)
Nitrogen condition mean	0.71 ± 0.08 (B)	1.51 ± 0.12 (A)	1.42 ± 0.12 (A)	1.22 ± 0.07
Genotype (G) effect			<2e-16 ***	
Nitrogen (N) effect			<2e-16 ***	
G x N effect			0.3912	

under 0.1 mM NO₃⁻. This result suggested that, in some nutritive conditions, the presence of the fungus could have no effect or even enhance root elongation early after inoculation (Fig. 6). After 14 days, the same main effects were found (G, N and I effects; Table S1b). *Ler* was still the genotype presenting the shortest roots (16.2 mm compared to Col-0 and Ws, 22.1 and 24.4, respectively). In addition, roots were still globally the shortest under 5 mM NH₄⁺ (10.5 mm) and the longest under 5 mM NO₃⁻ (32.4 mm), with the differences between media being amplified compared to 8 DAI (+50% growth for 5 mM NH₄⁺, +65% for 0.1 mM NO₃⁻ and +135% for 5 mM NO₃⁻). Results also indicated that root elongation was highly affected by the fungus between 8 and 14 DAI (-38.3% at 14 DAI on average for all genotypes and N conditions compared to -12.8% after 8 DAI). This was more or less marked depending on the N medium (Fig. 6), the impact being stronger for seedlings grown on NH₄⁺ (-62%), than for those grown on NO₃⁻ (-38% and -26% for 5 mM and 0.1 mM, respectively). Considering the combined effects, only the G x N and N x I interactions were still significant, while the G x I and G x N x I interactions were not significant anymore, which could be explained by the amplified main effect flattening the subtler differences.

The new device reveals a stage specific effect of nitrogen condition on susceptibility to the fungus on seedlings, compared to adult plants

To go further, findings using the developed device at the seedling stage were compared to those observed on adult plants (rosette stage) grown on a hydroponic system with the three studied N conditions (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻). Leaf necrosis area was determined at 7 DAI. Significant differences between genotypes and between N conditions were revealed (Table 3). The genotype Col-0 was on average significantly less susceptible than *Ler* and Ws genotypes (mean necrosis area, 0.76 mm², 1.51 mm² and 1.43 mm², respectively) under almost all N conditions (except for the comparison with Ws under 5 mM NO₃⁻). This difference of susceptibility to the pathogen between Col-0 and *Ler* was also found at the seedling stage, whereas there was no difference at the seedling stage between Col-0 and Ws.

When comparing N conditions, plants grown on NH₄⁺ were significantly less susceptible than those grown on NO₃⁻ (mean necrosis area, 0.71 mm², 1.51 mm², and 1.42 mm² for 5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ and 5 mM NO₃⁻, respectively). This difference was also found when considering the genotypes separately, except for Ws under 5 mM NO₃⁻ condition. This result contrasted very strongly with that obtained at the seedling stage, where seedlings grown under 5 mM NH₄⁺ and 0.1 mM NO₃⁻ were much more susceptible than those grown under 5 mM NO₃⁻.

Discussion

A new device to study plant x pathogen interaction at the seedling stage

A new device allowing the monitoring of seedling growth under modulating N supply as well as the impact of the necrotrophic fungus *A. brassicicola* was developed. It permitted to follow the kinetics of both aerial and root part growth of the seedling, from germination until at least the four-leaf stage, enabling the survey of seedlings at different points in time. It also allowed for easy sampling, the seedlings being well separated and in a clean environment (no soil on the roots for example). This environment, a nutrient controlled agar medium, is another advantage of the device enabling the study of varying nutrition regimes, N forms and concentrations in this work's case. The fully sterile device suited perfectly the study of biotic interactions at the early stages of plant development, such as the plant-fungal pathogen interaction between *A. thaliana* and *A. brassicicola* featured in the present work and could be adapted for the study of other pathosystems. Inoculation of seedlings is in most studies carried out several days after sowing [18, 24-26], preventing the study of the earlier stages of the interaction. Seed immersion in a conidial suspension is often used to solve this problem [28, 29] but, in our developed device, the droplet inoculation method implemented allowed for a more homogeneous contamination (Fig. 2). The impact of *A. brassicicola* on seedling growth was determined for both primary root elongation and seedling aerial development from image analyses. For the aerial development, a specific semi-automated pipeline was developed, based on image analyses with the Ilastik software [39] and a python script (Fig. 4). An index (HAI) was successfully applied to quantify the impact of the fungus on seedling development as it allowed accounting for every aspect of fungal impact, namely seedling damping-off, necrosis and developmental delay. HAI was deemed the best in our study but the pipeline for image analysis is flexible enough to be used for different ways of assessing the fungal effect on plants, depending on the pathosystem or the aim of the research (*e.g.* necrosis alone). The use of such a method to evaluate the fungal impact on seedlings appears more integrative than what is usually done. Indeed, studies directly inoculating the seeds commonly evaluated the infection percentage [26-27] or the germination rate [28], and not the subsequent seedling growth, while studies inoculating already grown seedlings were restricted to latter stages and evaluated the fungal growth and sporulation [18], often with a visual qualitative scale [24-25].

Influence of nitrogen nutrition on fungal infection at the seedling stage

Firstly, N affected aerial development in the absence of the fungus, with seedlings grown under 5 mM NO_3^- being larger than those grown under 0.1 mM NO_3^- and 5 mM NH_4^+ (Table 2a). This

was expected, because it is well known that NO_3^- is a more advantageous N source than NH_4^+ . Exclusive NH_4^+ nutrition can indeed result in toxicity symptoms in plants, which can lead to important yield losses [41], notably on *A. thaliana* [42]. However, the conditions in our device were not stressful enough to cause leaf chlorosis, a common symptom of severe NH_4^+ toxicity [43]. Furthermore, given the importance of N in plant growth and development, reduced seedling growth under NO_3^- deprivation conditions (0.1 mM) were also expected. The N concentration is so crucial in seedling growth that even in studies where the NO_3^- deficiency was far from as strong (4 mM NO_3^- for the control and 1 mM NO_3^- for the low N condition), deprived *A. thaliana* seedlings still presented a 30% growth reduction [44]. *Ler* seedlings grown under 0.1 mM NO_3^- and 5 mM NH_4^+ were smaller than those of Col-0 and Ws, while no statistical difference between genotypes was highlighted for 5 mM NO_3^- . This could be explained by a higher resistance of the two latter genotypes to stresses induced by the two disadvantageous N conditions. Indeed, it has been already shown that *Ler* seedling aerial growth was more impacted by NO_3^- deficiency than Col-0 and Ws seedlings [44]. Concerning NH_4^+ , it has been demonstrated that even though *A. thaliana* was in general sensitive to NH_4^+ toxicity, important genotypic differences were present [42], although no study appears to have been carried out on the three genotypes we studied. Regarding primary root growth, the global impact of N nutrition was similar to that found on the aerial part, with the longest primary roots belonging to seedlings grown on 5 mM NO_3^- and the shortest to seedlings grown on 5 mM NH_4^+ . This is consistent with the NH_4^+ -induced repression of *A. thaliana* primary root growth reported in literature [45]. On the other hand, NO_3^- is known for stimulating primary root growth of *A. thaliana* seedlings [46], while lower NO_3^- concentrations led to a reduction of fresh root weight [44]. In our study, primary roots of Col-0 and Ws were generally longer than those of *Ler*, especially in the two NO_3^- conditions. This contrasted with literature, Ws seedling roots being generally shorter than Col-0 and *Ler* ones [47], and particularly sensitive to low NO_3^- conditions [44]. One explanation could be that in this study of Aceves-García et al. [47], the medium was supplemented with sucrose which is known to induce root growth of *A. thaliana* seedlings [48], to an extent that could vary between genotypes.

The developed device highlighted the effect of N nutrition on the interaction between *A. thaliana* seedlings and the necrotrophic fungus *A. brassicicola*. Seedlings subjected to the 0.1 mM NO_3^- and 5 mM NH_4^+ conditions were more susceptible to the fungus than those under 5 mM NO_3^- (Table 2b). While the effect of N on plant-pathogen interactions has been extensively studied at the adult stage [49], studies at the seedling stage are very uncommon and most appear to be on months to years-old tree seedlings [50-53], which makes our results at this stage a

novelty. The closest study was on the effect of N supply on barley seedlings inoculated with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* [18], but the latter inoculation date (12 days after sowing) makes it very different from the present work. Generally, the role of N on pathogenicity can depend on both N concentration and N form [15-17]. In our study, higher NO_3^- concentration was linked with less susceptibility, as it is the case of *Botrytis cinerea* on tomato [19], while NH_4^+ nutrition was linked with an increase of disease severity compared to NO_3^- , something that was also observed in the *Solanum lycopersicum* L. - *Fusarium oxysporum* and *Nicotiana tabacum* - *Pseudomonas syringae* interactions [20-21]. It is important to keep in mind that the effects of N concentration and form are pathosystem specific and can have an opposite effect on plant susceptibility [18, 22, 49]. High N supply commonly enhances susceptibility to biotrophs and hemibiotrophs while reducing that to necrotrophs [22, 54-55] which is consistent with our results. Finally, these results could in part be explicated by an aggravating effect of direct stresses caused by mineral nutrition, low N nutrition possibly weakening the plant in regard to defences against pathogens [55].

The influence of N nutrition on fungal infection was also evaluated at the rosette stage with the same ecotypes and nitrogen media as those studied at the seedling stage. We showed that plants grown on NH_4^+ were significantly less susceptible than those grown on NO_3^- (Table 3), which was consistent with a previous study we conducted with one ecotype and two N media [23]. The results obtained at the rosette stage thus contrasted strongly with those obtained at the seedling stage. The device developed to study specifically seedling growth thus allowed to demonstrate that N nutrition modulates the susceptibility of *A. thaliana* to *A. brassicicola* according to the developmental stage of the plant. Susceptibility to pathogens often vary with age, generally in the sense that younger plants are more susceptible, as demonstrated in numerous studies [56-59]. This phenomenon can be linked to leaf maturity [60] and leaf rank, it was for instance demonstrated that the 8th leaf of the *Arabidopsis* rosette was more susceptible to *P. syringae* than the 16th leaf [58]. Epidermal cuticle thickness is an important part of the physical barriers involved in the control of fungal penetration, consequently reducing the incidence of disease [61], and have been shown to increase with leaf age [62] and *A. thaliana* developmental stage [63]. Fungal tissue penetration is also affected by N nutrition. It has for instance been demonstrated that fungal species such as *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, or *Magnaporthe oryzae* fail to penetrate cellophane membranes under NH_4^+ nutrition, suggesting that the ability of hyphae to pierce cellulosic material is affected by NH_4^+ [64]. This could create a synergistic effect between age and NH_4^+ nutrition raising greatly the plant physical defences and be an explanation for the different effect of N nutrition between seedlings

and rosettes. It should also be noted that early seedling growth relies on both exogenous N supply and endogenous N resources from seed reserve mobilisation. This specificity may also contribute to explain the difference highlighted between the two developmental stages studied. Finally, in rosettes, the genotype Col-0 was on average significantly less susceptible than *Ler* and *Ws*, which is consistent with the literature [40]. This difference between Col-0 and *Ler* was also present at the seedling stage but, in contrast, there was no difference at the seedling stage between Col-0 and *Ws*, showing that genotype responses to *A. brassicicola* seem dependent on developmental stage.

Conclusions

A new sterile device allowing the monitoring of *A. thaliana* seedling growth under modulating N supply, as well as the impact of the necrotrophic fungus *A. brassicicola*, was developed. It enables the survey of seedlings at different points in time, in varying nutrition regimes, N forms and concentrations. A specific semi-automated image analysis pipeline was developed to quantify the impact of the fungus on seedling development. It has allowed calculating an index (HAI) accounting for every aspect of fungal impact, namely seedling damping-off, necrosis and developmental delay, as thus highlighting the influence of N nutrition on fungal infection at the seedling stage. Seedlings subjected to NH_4^+ and lower NO_3^- conditions were more susceptible to the fungus than those subjected to higher NO_3^- conditions. The assessment of fungal impact on adult plants revealed that they were significantly less susceptible when grown on NH_4^+ , compared to NO_3^- , which dramatically contrasted with findings at the seedling stage. Thanks to the device developed in this study, it has thus been possible to highlight that N nutrition modulates *A. thaliana* susceptibility to *A. brassicicola* depending on the plant developmental stage. Because primary and secondary metabolism are of critical importance to the effect of N in the plant-pathogen interaction, elucidation of the metabolic bases associated with seedling susceptibility regulated by N supply, as well as the role of endogenous N nutrients from mobilisation of seed reserves, should provide insight into the specific findings observed at the seedling stage.

Methods

Biological material

Three ecotypes of *A. thaliana* (Col-0, *Ler* and *Ws*) were studied. Seeds of each genotype were collected from plants simultaneously grown for 13 weeks under long day conditions (16 hours

of light at 21°C, 8 hours of darkness at 19°C) in a growth chamber (IRHS, Angers, France). The *A. brassicicola* wild-type strain Abra43 was initially isolated from *Raphanus sativus* seeds [7], sequenced recently [65], and was routinely grown and maintained on potato dextrose agar at 24°C.

Experimental device developed for Arabidopsis seedling growth

To follow seedling development and fungus-induced symptoms, *A. thaliana* seedlings were grown vertically on agar nutrient medium in square plates (12×12×1.3 cm) filled with 1.2% agar modified MS medium (0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 50 μM iron-EDTA and 0.5 mL/L micro-elements buffered with 0.5 g/L MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), pH 5.7) [38], either supplemented with 5 mM NO₃⁻ (provided as KNO₃), 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NH₄⁺ (provided as NH₄Cl). Twelve seeds per plate were sown on a plane surface obtained by cutting the medium 3 cm from the top. Before sowing, seeds were stratified for 3 days (in order to break their residual dormancy) and then sterilised by successive immersions, 5 min in ethanol 70°, 15 min in sodium hypochlorite (2.6% active chlorine) and three times 5 min in sterile water. Once sown, seeds were individually inoculated by deposit of a 1 μL droplet of conidia suspension (10⁴ conidia per mL; Abra43 condition) or of sterile milli-Q water (H₂O condition). The plates were then placed for 18 days in a growth chamber under long day conditions (16 h of light at 21°C, 8 h of darkness at 19°C). Three independent experiments were carried out, containing each 3 plates of 12 seedlings per set of conditions.

Seed observation by scanning electron microscopy

Seeds inoculated either by immersion (1 h in a 10⁵ conidia per mL suspension or sterile milli-Q H₂O) or by deposit of a 1 μL droplet (10⁴ conidia per mL suspension or sterile milli-Q H₂O) were dried and observed directly by scanning electron microscopy (Phenom™ G2 Pro) in collaboration with the IMAC platform (IMAgérie Cellulaire; SFR Quasav, Angers, France).

Image analysis

Pictures of square plates containing seedlings were taken using a Nikon D5000 digital camera, in the same conditions of lighting and distance. The classification of images parts for the seedling aerial part analyses was performed with the Ilastik software (version 1.3.3), as presented in the global pipeline (Fig. 4). The training dataset was composed of 19 pictures of square plates (3216×2136 px) and 6 pictures of selected seedlings (from 176×328 to 1230×332

px). The training dataset was chosen to best represent all the variations in our data: pictures of seedlings from the three genotypes grown in different N conditions and inoculated with the fungus or not, with either homogeneity or heterogeneity in the picture regarding levels of disease severity or seedling size. These images were annotated by associating pixels to a class. Three classes were defined corresponding to healthy tissues (green), necrotic tissues (brown) and all other objects present in the image that do not correspond to aerial parts of seedlings. These annotations were then used to train Ilastik random forest model classifier. The selected features were the colour/intensity, the edge and the texture and the spatial scales for the convolution 0.70, 1.00, 1.60, and 3.50 for every feature, plus 0.30 for the colour/intensity feature. Once the model trained, it was applied to the other images to identify the healthy (green) and necrotic (brown) pixels of aerial parts of the seedling (leaves, cotyledons and hypocotyl) per square plate. Classification results were then subjected to a Python 3.7 script to evaluate the areas of healthy and necrotic tissues and generate the colour-coded final images. This script was based mainly on the numpy [66], *scikit-image* [67] and matplotlib [68] libraries.

The pipeline was tested on 18 pictures of square plates (3216x2136 px) and 5 pictures of selected seedlings (from 176x328 to 1230x332 px) to assess the quality of the classification. The evaluation of the quality of the model was based on the comparison of the areas of 30 representative seedlings measured by our image analysis pipeline and a ground truth corresponding to annotations performed manually by an expert observer with the ImageJ software (version 1.53k) [69]. The metric selected to measure the spatial overlap between those two sets of classified pixels was the classical Dice Sørensen coefficient ($DSC = 2 * |A \cap B| / (|A| + |B|)$). The DSC then equals twice the number of elements common to both sets ($|A \cap B|$) divided by the sum of the number of elements in each set ($|A| + |B|$). The DSC for our data was high (0.98), showing that there was no real difference between the model and the manual annotation.

To assess the impact of variability of annotation by the expert, the random forest model was trained with the same dataset with new annotations. The variability found was 1.6% of surface on the test data set. This was found to be negligible by comparison with the biological variation inside the conditions.

Regarding the root part, ImageJ (version 1.53k) [69] was used to determine the length of primary roots.

Experiments at the rosette stage

Experiments at the rosette stage were carried out according to Barrit et al. [23]. Seeds of three *A. thaliana* ecotypes (Col-0, *Ler* and *Ws*) were sown in pots filled with soil and have been grown in a growth chamber (8 h light / 16 h darkness, 21°C). After 4 weeks, plants were transferred individually in a hydroponic system containing modified MS medium supplemented with 5 mM KNO₃ for 2 weeks. Afterwards, plants were placed in a new hydroponic nutrient solution containing either 5 mM NH₄⁺ (provided as NH₄Cl) or 0.1 mM or 5 mM NO₃⁻ (provided as KNO₃), as sole N source for 2 weeks. Nutritive solution was replaced every week. For plant infection assays, 5 µL drops of *A. brassicicola* (Abra43) conidia suspension (10⁵ conidia per mL) were deposited on leaves from eight weeks-old plants. For control plants, 5 µL drops of H₂O were used. Plants were then maintained under saturating humidity (100% relative humidity) for 2 days. Foliar symptoms were quantified at 7 DAI by measuring manually the lesion area surface.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with the R software (version 4.1.2). Parametric tests (ANOVA followed by Tukey's HSD test in the case of multiple comparisons, Student's t test in the case of additional side-by-side comparisons) were performed when the conditions of normal distribution and homogeneity of variances were met. Otherwise, nonparametric tests (ANOVA using permutation tests for multiple comparisons, or Wilcoxon-Mann-Whitney test for additional side by side comparisons) were used to test the significance of the results. Statistically significant differences were denoted by $P < 0.05$.

List of abbreviations

DAI, day after inoculation; DSC, Dice Sørensen coefficient; GABA, Gamma-aminobutyric acid; HAI, healthy area index; N, nitrogen; NAI, necrosis area index; PRL, primary root length; SEM, standard error of the mean; VRS, visual rating scale.

Declarations

Ethics approval and consent to participate:

Not applicable.

Consent for publication:

Not applicable.

Availability of data and materials:

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information file.

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests.

Funding:

This research was conducted in the framework of the French regional council program ‘Objectif Végétal, Research, Education and Innovation in Pays de la Loire’ supported by the French Region Pays de la Loire, Angers Loire Métropole (FuSIO N project). The PhD grant of TB was awarded by the National Agronomy School “Institut Agro - Agrocampus Ouest”, cofinanced by French Ministry of Agriculture and Food and the regional Council of Pays de la Loire as part of a Contrat de Plan Etat-Région (CPER).

Authors' contributions:

TB, CC, EP and BT designed this work. TB and SA performed the experiments. TB, JB and DR developed the semi-automated image analysis protocol. TB, CC, EP and BT wrote the manuscript. TB, CC, JB, DR, EP and BT interpreted data and revised the manuscript. CC, EP and BT supervised the work. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements:

The authors are grateful to Fabienne Simonneau and Aurelia Rolland of IMAC technical platform of SFR Quasav (Angers, France) for supporting microscopy experiments and Alexia Crézé for taking some MEB pictures. The authors are also thankful to Daniel Sochard for seed production.

References

1. Paul MJ, Stitt M. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant Cell Env.* 1993;16(9):1047-57.
2. Martin T, Oswald O, Graham IA. Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol.* 2002;128(2):472-81.
3. Humpherson-Jones FM, Maude RB. Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in Brassica oleracea seed production crops. *Ann Appl Biol.* 1982;100:61-71.
4. Neergaard P. Economic significance of seed-borne diseases. In *Seed pathology*, Palgrave, London. 1977. p. 3-39.

5. Richard-Molard C, Wuillemme S, Scheel C, Gresshoff PM, Morot-Gaudry JF, Limami AM. Nitrogen-induced changes in morphological development and bacterial susceptibility of belgian endive (*Cichorium intybus* L.) are genotype-dependent. *Planta*. 1999;209:389-98.
6. Mur LAJ, Simpson C, Kumari A, Gupta AK, Gupta KJ. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Ann Bot*. 2016;119:703-9.
7. Sellam A, Dongo A, Guillemette T, Hudhomme P, Simoneau P. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant Pathol*. 2007;8:195-208.
8. Glawischnig E, Hansen BG, Olsen CE, Halkier BA. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(21):8245-50.
9. Wittstock U, Halkier BA. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci*. 2002;7(6):263-70.
10. Kliebenstein DJ. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant Cell Environ*. 2004;27(6):675-84.
11. Noritake T, Kawakita K, Doke N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol*. 1996;37(1):113-6.
12. Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(17):10328-33.
13. Mur LA, Prats E, Pierre S, Hall MA, Hebelstrup KH. Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Front Plant Sci*. 2013;4:215.
14. Mur LAJ, Simpson C, Kumari A, Gupta AK, Gupta KJ. 2016. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Ann Bot*. 2016;119:703-9.
15. Huber DM, Watson RD. Nitrogen form and plant disease. *Annu Rev Phytopathol*. 1974;12(1):139-65.
16. Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Laugé R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *J Exp Bot*. 2007;58(12):3351-60.
17. Solomon PS, Tan KC, Oliver RP. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field of study. *Mol Plant Pathol*. 2003;4:203-10.
18. Jensen B, Munk L. Nitrogen-induced changes in colony density and spore production of *Erysiphe graminis* f. sp. hordei on seedlings of six spring barley cultivars. *Plant Pathol*. 1997;46(2):191-202.
19. Hoffland E, Jeger MJ, van Beusichem ML. Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant Soil*. 2000;218(1):239-47.

20. Borrero C, Trillas MI, Delgado A, Avilés M. Effect of ammonium/nitrate ratio in nutrient solution on control of Fusarium wilt of tomato by *Trichoderma asperellum* T34. *Plant Pathol.* 2012;61(1):132-9.
21. Gupta KJ, Brotman Y, Segu S, Zeier T, Zeier J, Persijn ST, Cristescu SM, Harren FJ, Bauwe H, Fernie AR, Kaiser WM. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola in tobacco. *J Exp Bot.* 2013;64(2):553-68.
22. Dordas C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron Sustain Dev.* 2008;28(1):33-46.
23. Barrit T, Porcher A, Cukier C, Satour P, Guillemette T, Limami AM, Teulat B, Campion C, Planchet E. Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the necrotrophic fungus, *Alternaria brassicicola*. *Physiol Plant.* 2022;6:e13621.
24. Jacobs T. Postulation of virulence groups and resistance factors in the quinoa/downy mildew pathosystem using material from Ecuador. *Plant Pathol.* 1999;48(3):425-30.
25. Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Le Corre D, Silue D. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathol.* 2001;50(5):579-86.
26. Ouborg NJ, Biere A, Mudde CL. Inbreeding effects on resistance and transmission-related traits in the *Silene*–*Microbotryum* pathosystem. *Ecology.* 2000;81(2):520-31.
27. Meyer SE, Nelson DL, Clement S. Evidence for resistance polymorphism in the *Bromus tectorum*-*Ustilago bullata* pathosystem: implications for biocontrol. *Can J Plant Pathol.* 2001;23(1):19-27.
28. Finch-Boekweg H, Allen P, Meyer S. Exposure to low water potentials and seed dormancy favour the fungus in the *Pyrenophora semeniperda*-*Bromus tectorum* pathosystem. *Plant Protect Sci.* 2013;49:S15-21.
29. Bang J, Kim H, Kim H, Beuchat LR, Ryu JH. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on radish seeds by sequential treatments with chlorine dioxide, drying, and dry heat without loss of seed viability. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):6680-6.
30. Vahabi K, Reichelt M, Scholz SS, Furch AC, Matsuo M, Johnson JM, Sherameti I, Gershenzon J, Oelmüller R. *Alternaria brassicae* induces systemic jasmonate responses in *Arabidopsis* which travel to neighboring plants via a Piriformospora indica hyphal network and activate abscisic acid responses. *Front Plant Sci.* 2018;9:626.
31. Schlaich NL. *Arabidopsis thaliana*-the model plant to study host-pathogen interactions. *Curr Drug Targets.* 2011;12(7):955-66.
32. Lawrence CB, Mitchell TK, Craven KD, Cho YR, Cramer RA, Kim KH. At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *Plant Pathol J.* 2008;24(2):101-11.

33. Köhl J, Van Tongere CAM, Groenenboom-de Haas BH, Van Hoof RA, Driessen R, Van Der Heijden L. Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower. *Plant Pathol.* 2010;59:358-67.
34. Rotem J. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. APS, St Paul, USA. 1994. p.1-326.
35. Rimmer SR, Buchwaldt H. Diseases. In Brassica oil seeds-production and utilization, CAB International, Wallingford, UK. 1995. p.111-40.
36. Kubota M, Abiko K, Yanagisawa Y, Nishi K. Frequency of *Alternaria brassicicola* in commercial cabbage seeds in Japan. *J Gen Plant Pathol.* 2006;72(4):197-204.
37. Maude RB, Humpherson-Jones FM. Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot *Alternaria brassicicola* and grey leaf spot *Alternaria brassicae* of brassicas. *Ann Appl Biol.* 1980;95(3):311-9.
38. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962;15(3):473-97.
39. Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, Schiegg M, Ales J, Beier T, Rudy M, Eren K, Cervantes JI, Xu B, Beuttenmueller F, Wolny A, Zhang C, Koethe U, Hamprecht FA, Kreshuk A. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* 2019;16:1226-32.
40. Mukherjee AK, Lev S, Gepstein S, Horwitz BA. A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with *Arabidopsis thaliana* ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. *BMC Plant Biol.* 2009;9:31.
41. Britto DT, Kronzucker HJ. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol.* 2002;159(6):567-84.
42. Sarasketa A, González-Moro MB, González-Murua C, Marino D. Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. *J Exp Bot.* 2014;65(20):6023-33.
43. Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe RG, Sattelmacher B. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z Pflanz Bodenkunde.* 1997;160(2):239-51.
44. North KA, Ehltling B, Koprivova A, Rennenberg H, Kopriva S. Natural variation in *Arabidopsis* adaptation to growth at low nitrogen conditions. *Plant Physiol Biochem.* 2009;47(10):912-8.
45. Gao K, Zhou T, Hua Y, Guan C, Zhang Z. Transcription factor WRKY23 is involved in ammonium-induced repression of *Arabidopsis* primary root growth under ammonium toxicity. *Plant Physiol Biochem.* 2020;150:90-8.
46. Walch-Liu P, Forde BG. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant J.* 2008;54(5):820-8.

47. Aceves-García P, Álvarez-Buylla ER, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Muñoz R, Sánchez MD. Root architecture diversity and meristem dynamics in different populations of *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2016;7:858.
48. Yazdanbakhsh N, Sulpice R, Graf A, Stitt M, Fisahn J. Circadian control of root elongation and C partitioning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 2011;34(6):877-94.
49. Sun Y, Wang M, Mur LA, Shen Q, Guo S. Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):572.
50. Solel Z, Bruck RI. Effect of nitrogen fertilization and growth suppression on pitch canker development on loblolly pine seedlings. *J Phytopathol.* 1989;125(4):327-35.
51. Entry JA, Cromack Jr K, Hansen E, Waring R. Response of western coniferous seedlings to infection by *Armillaria ostoyae* under limited light and nitrogen. *Phytopathology.* 1991;81(1):89-94.
52. Fleischmann F, Raidl S, Osswald WF. Changes in susceptibility of beech (*Fagus sylvatica*) seedlings towards *Phytophthora citricola* under the influence of elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilization. *Environ Pollut.* 2010;158(4):1051-60.
53. Brown A, Heckman RW. Light alters the impacts of nitrogen and foliar pathogens on the performance of early successional tree seedlings. *PeerJ.* 2021;9:e11587.
54. Ballini E, Nguyen TT, Morel J. Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice.* 2013;6:32.
55. Snoeijers SS, Pérez-García A, Joosten MH, De Wit PJ. (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *Eur J Plant Pathol,* 2000;106:493-506.
56. Panter S, Jones D. Age-related Resistance to Plant Pathogens. *Adv Bot Res.* 2002;19:251.
57. Mazzola M, Leach JE, Nelson R, White FF. Analysis of the interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and the rice cultivars IR24 and IRBB21. *Phytopathology.* 1994;84(4):392-7.
58. Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell.* 2002;14(2):479-90.
59. Rusterucci C, Zhao Z, Haines K, Mellersh D, Neumann M, Cameron RK. Age-related resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is associated with the transition to flowering in *Arabidopsis* and is effective against *Peronospora parasitica*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2005;66(6):222-31.
60. Li B, Xu X. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *J Phytopathol.* 2002;150(11-12):687-91.
61. Kumar A, Yogendra KN, Karre S, Kushalappa AC, Dion Y, Choo TM. WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist *Fusarium* head blight in barley spikelets. *J Exp Bot.* 2016;67(14):4127-39.
62. Pantin F, Simonneau T, Muller B. Coming of leaf age: control of growth by hydraulics and metabolics during leaf ontogeny. *New Phytol.* 2012;196(2):349-66.

63. Shumborski SJ, Samuels AL, Bird DA. Fine structure of the Arabidopsis stem cuticle: effects of fixation and changes over development. *Planta*. 2016;244(4):843-51.
64. López-Berges MS, Rispaill N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell*. 2010;22(7):2459-75.
65. Belmas E, Briand M, Kwasiborski A, Colou J, N’Guyen G, Iacomi B, Grappin P, Campion C, Simoneau P, Barret M, Guillemette T. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Alternaria brassicicola* Abra43. *Genome Announc*. 2018;6(6):e01559-17.
66. Harris CR, Millman KJ, van der Walt SJ, Gommers R, Virtanen P, Cournapeau D, Wieser E, Taylor J, Berg S, Smith NJ, Kern R, Picus M, Hoyer S, van Kerkwijk MH, Brett M, Haldane A, Del Río JF, Wiebe M, Peterson P, Gérard-Marchant P, Sheppard K, Reddy T, Weckesser W, Abbasi H, Gohlke C, Oliphant TE. Array programming with NumPy. *Nature*. 2020;585:357-62.
67. van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yager N, Gouillart E, Yu T. Scikit-image: image processing in Python. *Peer J*. 2014;2:e453.
68. Hunter JD. Matplotlib: A 2D graphics. *Comp Sci Eng*. 2007;9(3):90-5.
69. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671-5.

Supplemental material

Table S1.

(a) Average values of primary root length 8 DAI, in centimetres, for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings after H₂O treatment or Abra43 inoculation, grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻). Twelve seedlings per square plate, 3 square plates per independent experiment, 3 independent experiments. Lowercase letters indicate a statistical difference between genotypes, inside a condition of N and inoculation, for each genotype separately and for their mean. Uppercase letters indicate a statistical difference between N conditions, for a genotype and an inoculation condition, for each N condition separately and for their mean. Greek letters indicate a statistical difference between inoculation conditions, for a genotype and a N condition, for each inoculation condition separately and for their mean. No letter indicates the absence of statistical difference for the comparison. The different factor effects and their interaction are presented at the bottom of the table, with the *P*-value. Significance of *P*: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05.

(b) Average values of primary root length 14 DAI, in centimetres, for Col-0, *Ler* or *Ws* seedlings after H₂O treatment or Abra43 inoculation, grown on different nutritive media (5 mM NH₄⁺, 0.1 mM NO₃⁻ or 5 mM NO₃⁻). Twelve seedlings per square plate, 3 square plates per independent experiment, 3 independent experiments. Lowercase letters indicate a statistical difference between genotypes, inside a condition of N and inoculation, for each genotype separately and for their mean. Uppercase letters indicate a statistical difference between N conditions, for a genotype and an inoculation condition, for each N condition separately and for their mean. Greek letters indicate a statistical difference between inoculation conditions, for a genotype and a N condition, for each inoculation condition separately and for their mean. No letter indicates the absence of statistical difference for the comparison. The different factor effects and their interaction are presented at the bottom of the table, with the *P*-value. Significance of *P*: 0 < *** < 0.001.

Table S1

a

Primary root length 8 DAI	5 mM NH ₄ ⁺		0.1 mM NO ₃ ⁻		5 mM NO ₃ ⁻	
	H2O	Abra43	H2O	Abra43	H2O	Abra43
Col-0	8.7 ± 0.4 (C, α)	5.9 ± 0.3 (a, B, β)	12.0 ± 0.6 (b, B)	14.3 ± 0.9 (a, A)	18.9 ± 0.9 (a, A)	16.6 ± 1.2 (a, A)
Ler	7.5 ± 0.5 (α)	4.1 ± 0.3 (b, B, β)	8.4 ± 0.7 (c, α)	6.0 ± 0.5 (b, AB, β)	9.5 ± 0.7 (c, α)	6.8 ± 0.6 (b, A, β)
Ws	8.8 ± 0.5 (B, α)	5.1 ± 0.3 (ab, B, β)	14.5 ± 0.7 (a, A)	13.6 ± 0.8 (a, A)	14.4 ± 0.8 (b, A)	14.3 ± 1.0 (a, A)
Genotype (G) effect					<2e-16 ***	
Nitrogen (N) effect					<2e-16 ***	
Inoculation (I) effect					<2e-16 ***	
G x N effect					<2e-16 ***	
G x I effect					0.02327 *	
N x I effect					0.00260 **	
G x I x N effect					0.00920 **	
Mean of G	Col-0		Ler		Ws	
	12.8 ± 0.4 (a)		7.2 ± 0.3 (b)		12.0 ± 0.4 (a)	
Mean of N	5 mM NH ₄ ⁺		0.1 mM NO ₃ ⁻		5 mM NO ₃ ⁻	
	7.0 ± 0.2 (C)		11.6 ± 0.3 (B)		13.8 ± 0.4 (A)	
Mean of I	H2O			Abra43		
	11.7 ± 0.3 (α)			10.2 ± 0.3 (β)		

b

Primary root length 14 DAI	5 mM NH ₄ ⁺		0.1 mM NO ₃ ⁻		5 mM NO ₃ ⁻	
	H2O	Abra43	H2O	Abra43	H2O	Abra43
Col-0	16.5 ± 0.9 (a, B, α)	5.9 ± 0.3 (a, C, β)	21.1 ± 1.2 (ab, B)	18.0 ± 1.2 (a, B)	42.2 ± 1.9 (a, A, α)	27.0 ± 2.9 (a, A, β)
Ler	12.8 ± 0.9 (b, B, α)	4.3 ± 0.3 (b, B, β)	18.5 ± 1.5 (b, B, α)	8.5 ± 0.7 (b, B, β)	31.1 ± 2.3 (b, A, α)	14.6 ± 2.7 (b, A, β)
Ws	13.5 ± 0.9 (ab, C, α)	5.5 ± 0.2 (a, C, β)	25.4 ± 1.5 (a, B, α)	20.5 ± 1.7 (a, B, β)	42.1 ± 1.8 (a, A, α)	29.5 ± 3.1 (a, A, β)
Genotype (G) effect					<2e-16 ***	
Nitrogen (N) effect					<2e-16 ***	
Inoculation (I) effect					<2e-16 ***	
G x N effect					<2e-16 ***	
G x I effect					0.1784	
N x I effect					<2e-16 ***	
G x I x N effect					0.3128	
Mean of G	Col-0		Ler		Ws	
	22.1 ± 0.8 (a)		16.2 ± 0.8 (b)		24.4 ± 0.9 (a)	
Mean of N	5 mM NH ₄ ⁺		0.1 mM NO ₃ ⁻		5 mM NO ₃ ⁻	
	10.5 ± 0.4 (C)		19.1 ± 0.6 (B)		32.4 ± 1.1 (A)	
Mean of I	H2O			Abra43		
	25.6 ± 0.7 (α)			15.8 ± 0.7 (β)		

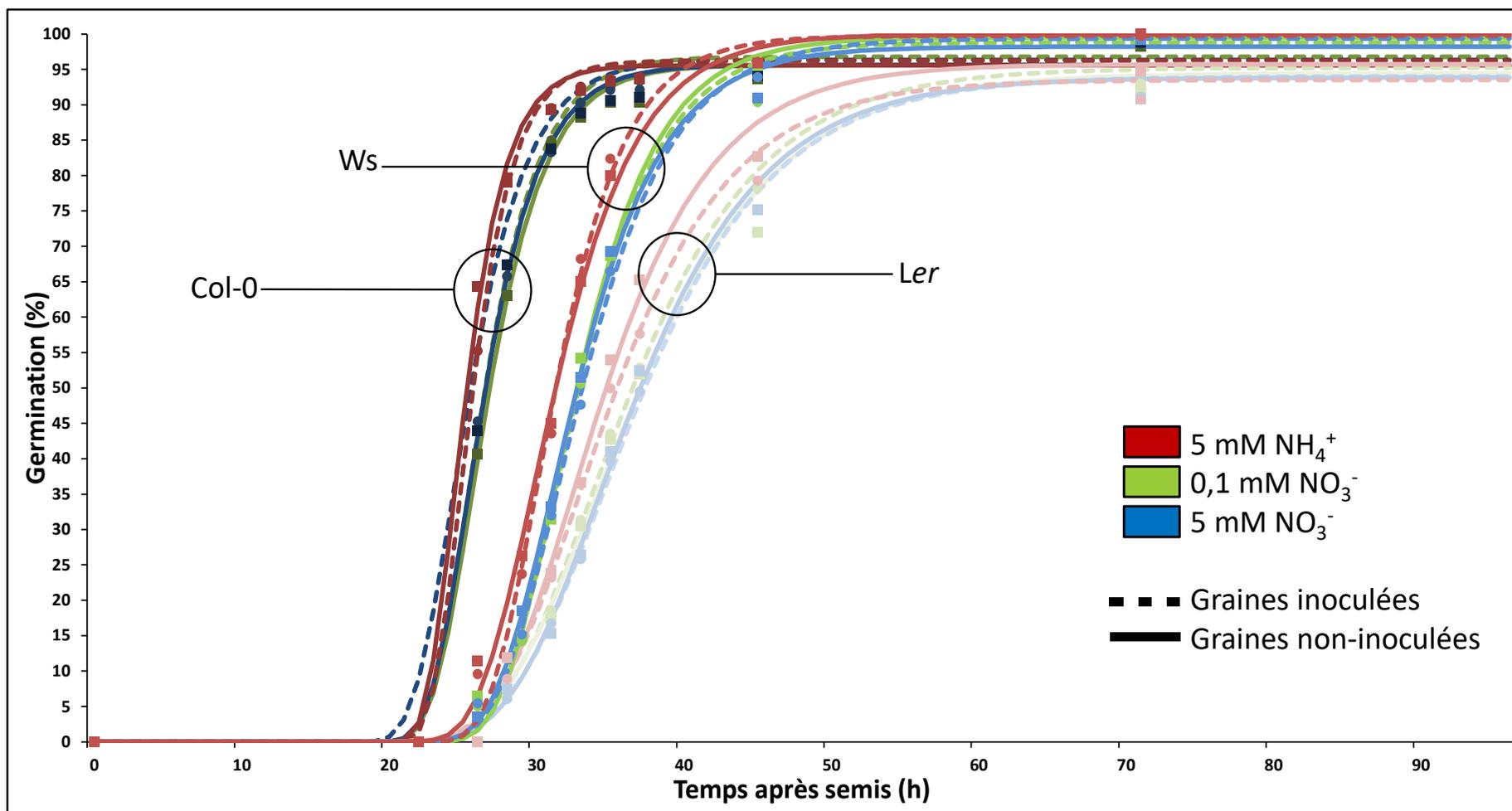


Figure 7 : Courbes de germination simulées (selon le modèle Gompertz) des trois génotypes (Col-0 trait foncé, *Ler* trait clair, *Ws* trait intermédiaire) dans trois conditions nutritives azotées (0,1mM NO₃⁻ trait vert, 5mM NO₃⁻ trait bleu, 5mM NH₄⁺ trait rouge), en présence (Abra43 ; trait pointillé et point rond) ou en absence (H₂O ; trait plein et point carré) du champignon. Les points correspondent aux valeurs expérimentales. n = 6, trois répétitions biologiques composées de deux répétitions techniques de 70 graines environ.

III.3. Résultat complémentaire : la germination des graines est influencée par le génotype et le milieu nutritif azoté mais pas par la présence du champignon

La germination des graines des trois génotypes (Col-0, *Ler*, *Ws*) a été suivie en utilisant des boîtes de Pétri rondes contenant les trois milieux nutritifs étudiés (5 mM NH_4^+ , 0,1 mM NO_3^- et 5 mM NO_3^-). Après stratification, les graines ont été inoculées par dépôt d'1 μL de suspension de conidies d'*A. brassicicola* (10^4 conidies / mL) ou de H_2O stérile, selon Barrit *et al.* (soumis). Les courbes de cinétiques complètes de la germination sont présentées dans la Figure Y. Le Tableau 4 montre les valeurs et les résultats de l'anova réalisée sur le T50 (correspondant au temps nécessaire aux graines pour atteindre 50% de germination). La germination des graines diffère significativement entre les génotypes, elle est la plus rapide pour Col-0 (T50 moyen = 26,4 h), et la plus lente pour *Ler* (T50 moyen = 32,4 h pour *Ws* et 36,5 h pour *Ler*), sans impact des modalités d'inoculation, et donc du champignon. Un effet significatif du milieu azoté a été mis en évidence avec une germination plus rapide des graines en condition 5 mM NH_4^+ (T50 moyen = 30,7 h) par rapport aux deux autres milieux (T50 moyen = 32,3 h). Aucun effet d'interaction entre les modalités étudiées n'a été trouvé. Les différences entre génotypes et conditions azotées révélées pour le T50 se retrouvent tout au long de la germination des graines (Fig. 7). Les pourcentages finaux de germination sont très élevés pour tous les génotypes dans toutes les conditions (98-100% à 144h de semis, Fig. 7).

L'importante différence de vitesse de germination entre le génotype le plus rapide Col-0, le génotype intermédiaire *Ws* et le génotype le plus lent *Ler*, pourrait jouer un rôle dans la sensibilité de ces génotypes au champignon. Il est en effet possible de supposer qu'une germination plus précoce avantage la plante dans l'interaction, lui donnant une longueur d'avance dans la « course » au développement et aux armements entre la plante et le champignon, désavantageant donc les plantules *Ler*. Les graines germent par contre plus vite en condition 5 mM NH_4^+ que dans les deux conditions NO_3^- , ce qui semble aller à l'encontre de l'hypothèse énoncée ci-dessus. Les différences de vitesses de germination entre milieux N sont cependant bien plus faibles que celles entre génotypes, ce qui pourrait expliquer que les plantules germant en condition 5 mM NH_4^+ ne sont pas moins sensibles à *A. brassicicola*. Le NO_3^- favorise classiquement la germination d'*A. thaliana*, mais cet effet surtout lié à la dormance des graines (Alboresi *et al.*, 2005) n'affecte pas nos graines stratifiées. Hendricks & Taylorson (1974) ont par contre montré un effet promoteur du NH_4^+ sur la germination des plantes de la famille des Brassicacées *Barbarea vulgaris* et *Barbarea verna*.

Tableau 4 : Temps nécessaire aux graines pour atteindre 50% de germination (T50), en h pour les graines des deux géotypes Col-0 et Ler semées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻) après traitement par H₂O stérile ou inoculation par Abra43. Les lettres en minuscule indiquent une différence statistique entre géotypes, à l'intérieur d'une condition azotée et d'une condition d'inoculation ou pour leur moyenne. Les lettres en majuscule indiquent une différence statistique entre conditions azotées, à l'intérieur d'un géotype et d'une condition d'inoculation. Les lettres indiquent une différence statistique au seuil $\alpha = 5\%$, une absence de lettre indiquant une absence de différence statistique pour la comparaison. ND = non déterminé.

T50 (h)	5 mM NH ₄ ⁺		0,1 mM NO ₃ ⁻		5 mM NO ₃ ⁻	
	H ₂ O	Abra43	H ₂ O	Abra43	H ₂ O	Abra43
Col-0	25.6 ± 0.22 (c, B)	25.8 ± 0.20 (c, B)	27 ± 0.34 (c, A)	26.5 ± 0.32 (c, AB)	26.7 ± 0.19 (c, A)	26.8 ± 0.25 (c, A)
Ler	34.6 ± 0.47 (a, B)	35.5 ± 0.58 (a)	37.4 ± 0.94 (a, A)	36.7 ± 0.83 (a)	37.1 ± 0.62 (a, AB)	37.6 ± 0.97 (a)
Ws	31.3 ± 0.25 (b)	31.4 ± 0.37 (b, B)	32.7 ± 0.46 (b)	33.1 ± 0.47 (b, A)	32.7 ± 0.44 (b)	33 ± 0.22 (b, A)
Effet Géotype (G)				<2e-16 ***		
Effet Azote (N)				<2e-16 ***		
Effet Inoculation (I)				0.8039		
Effet G x N				0.5742		
Effet G x I				0.8824		
Effet N x I				0.5105		
Effet G x N x I				0.7426		
Moyenne des conditions G	Col-0		Ler		Ws	
	26.4 ± 0.13 (c)		36.5 ± 0.34 (a)		32.4 ± 0.19 (b)	
Moyenne des conditions N	5 mM NH₄⁺		0,1 mM NO₃⁻		5 mM NO₃⁻	
	32.2 ± 0.75		32.3 ± 0.76		30.7 ± 0.67	
Moyenne des conditions I	H₂O			Abra43		
	31.8 ± 0.61			31.7 ± 0.59		

III. 4. Conclusion

Un nouveau dispositif *in vitro* en condition stérile a été développé pour permettre l'étude de l'impact du champignon *A. brassicicola* sur la croissance des plantules d'*A. thaliana*, tout en modulant leur nutrition azotée. Il consiste en des boîtes carrées placées verticalement et remplies d'un milieu nutritif gélosé permettant de moduler les conditions d'azote, les graines étant inoculées après semis par dépôt d'une gouttelette de suspension conidienne sur chaque graine. Un protocole spécifique d'analyse d'image semi-automatique a été développé pour quantifier l'impact du champignon sur le développement des plantules (parties aériennes). Il a permis de calculer un indice, HAI (Healthy Area Index), par comparaison des surfaces saines des plantules en absence et en présence d'*A. brassicicola*. Cet indice prend indirectement en compte l'intégralité des aspects de l'impact du champignon sur les parties aériennes (à savoir la mort des plantules, les surfaces nécrosées et le retard de développement des plantules induit par la présence du champignon), mettant ainsi en évidence l'influence de la nutrition azotée de la plante sur l'infection fongique au stade plantule. Les plantules cultivées en condition NH_4^+ et en concentration faible de NO_3^- (0,1 mM) se sont révélées plus sensibles au champignon que celles cultivées à une concentration élevée de NO_3^- (5 mM). Cette étude au stade plantule a été réalisée avec 3 génotypes, et a permis de mettre en évidence la sensibilité plus importante du génotype *Ler* au champignon, par rapport aux deux génotypes Col-0 et Ws. La vitesse de germination des graines pourrait participer à la plus grande sensibilité de *Ler* au stade plantule, sa germination étant en effet plus lente que celle des deux autres génotypes, entraînant potentiellement un retard dans son développement et dans l'induction de ses réponses de défenses. Enfin, afin de comparer l'influence de la nutrition azotée entre les stades plantule et adulte (rosette), une nouvelle analyse, complémentaire à la première (Barrit *et al.*, 2022) a été effectuée sur des plantes adultes au stade rosette, avec les mêmes génotypes et dans les mêmes conditions de nutrition que les plantules. Cette analyse élargie confirme les résultats de la première étude précédente. Ainsi, les plantes adultes sont moins sensibles à *A. brassicicola* en condition NH_4^+ par rapport aux conditions de NO_3^- , ce qui contraste fortement avec les résultats obtenus au stade plantule. Il a donc été possible, grâce au dispositif développé, de mettre en évidence un résultat inédit, à notre connaissance : l'effet de la nutrition azotée sur la sensibilité d'*A. thaliana* à *A. brassicicola* dépend du stade de développement de la plante. Or, l'effet de la nutrition azotée sur la sensibilité des plantes dépend de nombreux mécanismes moléculaires (Sun *et al.*, 2020). Il convient donc d'étudier ces mécanismes chez *A. thaliana* au stade plantule, à la fois dans l'objectif d'expliquer l'effet de la nutrition azotée sur la sensibilité au stade plantule, et d'expliquer les différences entre les deux stades de développement. Ces résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre IV. Variations du métabolisme primaire et secondaire des graines et des plantules associées aux différences de sensibilité révélées au stade plantule

IV.1. Introduction

Les résultats présentés jusqu'ici ont démontré l'existence d'un effet de la nutrition N (forme et concentration) sur l'interaction entre *A. thaliana* et *A. brassicicola*. La mise au point d'un dispositif permettant d'étudier l'impact du milieu nutritif azoté de la plante sur ce pathosystème au stade plantule a permis de mettre en évidence que son impact, et donc que le rôle du N dans la sensibilité au pathogène, dépend du stade de développement de la plante. En effet, nous avons montré que les plantes adultes sont plus sensibles au pathogène en condition NO_3^- (et ceci, pour les deux concentrations testées) qu'en condition NH_4^+ , alors qu'une concentration élevée en NO_3^- diminue la sensibilité des plantules au champignon. Le métabolisme de la plante, d'une importance capitale pour l'effet de N dans l'interaction plante-pathogène, a été étudié précédemment sur ce pathosystème au stade rosette (chapitre 1). Dans le présent chapitre, l'effet de l'azote sur l'interaction est cette fois étudié au stade plantule. Ce type d'étude est inédite à ce jour, à notre connaissance. L'abondance de métabolites associés au métabolisme primaire du C et du N et au métabolisme secondaire associé aux défenses de la plante (en particulier les polyamines, la camalexine et les glucosinolates) a été étudiée chez des plantules cultivées dans les différentes conditions de milieu N étudiées précédemment (5 mM NH_4^+ , 0,1 mM NO_3^- et 5 mM NO_3^-). Les génotypes Col-0 et *Ler* ont été choisis pour cette étude, en raison de leur sensibilité contrastée à *A. brassicicola*, *Ler* étant plus sensible au stade plantule comme au stade rosette, résultat possiblement influencé (au stade plantule) par leur différence de vitesse de germination. La composition des graines des deux génotypes a également été analysée, afin d'identifier les métabolites initialement présents dans les graines pouvant contribuer à expliquer les différences génotypiques de sensibilité au pathogène observées ensuite au stade plantule, que ce soit pour des aspects nutritifs ou de défense. Le travail présenté dans ce chapitre fera par la suite l'objet d'un article, en cours de préparation.

IV. 2 Matériel et Méthodes

IV.2.1 Matériel biologique

Les graines des deux écotypes sélectionnés (Col-0 et *Ler*) proviennent du même lot que celui qui a servi pour les expériences présentées dans le chapitre 2. Ce lot provient de plantes cultivées simultanément pendant 13 semaines dans des conditions de jour long (16 h de lumière à 21°C, 8 h d'obscurité à 19°C) dans une chambre de culture (IRHS, Angers, France). La souche d'*A. brassicicola* utilisée est la souche sauvage Abra43, initialement isolée à partir de graines de *Raphanus sativus* (Sellam *et al.*, 2007 ; Belmas *et al.*, 2018), multipliée par repiquage sur un milieu PDA (potato dextrose agar ; composition en g / L : extrait de pomme de terre 4, glucose 20, agar bactériologique 15) et cultivée à 24°C.

IV.2.2 Culture des plantules et inoculation par le champignon

Selon le protocole développé dans ce travail de thèse (Barrit *et al.*, soumis), les plantules ont été cultivées sur milieu nutritif gélosé (1,2% agar) dans des boîtes carrées (12×12×1,3 cm) placées à la verticale et remplies d'un milieu MS modifié (0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 50 µM de fer-EDTA et 0,5 mL/L de microéléments, tamponné avec 0,5 g / L de MES (acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique), pH 5,7; Murashige & Skoog, 1962), complété par 5 mM de NO₃⁻ (fourni sous forme de KNO₃), 0,1 mM de NO₃⁻ ou 5 mM de NH₄⁺ (fourni sous forme de NH₄Cl). Douze graines ont été semées par boîte sur une surface plane obtenue en coupant le milieu nutritif à 3 cm du sommet. Les graines ont été stratifiées (à 4°C pendant 3 jours) avant le semis (afin de rompre leur dormance résiduelle) puis stérilisées par immersions successives, 5 min dans de l'éthanol 70°, 15 min dans de l'hypochlorite de sodium (2,6% de chlore actif) et trois fois 5 min dans de l'eau stérile. Une fois semées, les graines ont été inoculées individuellement par dépôt d'une gouttelette de 1 µL de suspension de conidies (10⁴ conidies par mL ; condition Abra43) ou d'eau milli-Q stérile (condition H₂O). Les boîtes ont ensuite été placées pendant 14 jours dans une chambre de culture en conditions de jour long (16 h de lumière à 21°C, 8 h d'obscurité à 19°C). Trois expériences indépendantes ont été réalisées, contenant chacune 50 boîtes de 12 plantules par condition (soit 600 boîtes et 7200 plantules par expérience indépendante).

IV.2.3 Analyse d'images pour l'évaluation de la surface verte et de l'impact du champignon sur le développement de la partie aériennes des plantules

Six photos des boîtes carrées contenant les plantules ont été prises, par condition et par expérience indépendante (soit 72 images par expérience indépendante), à l'aide d'un appareil photo numérique Nikon D5000, dans les mêmes conditions d'éclairage et de distance. Les analyses de ces images ont été effectuées selon le protocole développé par Barrit *et al.* (soumis). La classification des images pour l'analyse des parties aériennes des plantules a été réalisée avec le logiciel Ilastik (version 1.3.3). Les images choisies pour entraîner le modèle ont été annotées en associant les pixels à une classe. Trois classes ont été définies correspondant aux tissus sains (vert), aux tissus nécrosés (brun) et à tous les autres objets présents dans l'image qui ne correspondent pas aux parties aériennes des plantules. Une fois le modèle entraîné, il a été appliqué aux autres images pour identifier les pixels sains (verts) et nécrotiques (bruns) des parties aériennes de la plantule (feuilles, cotylédons et hypocotyle) présents dans chaque boîte carrée. Les résultats de la classification ont ensuite été soumis à un script Python 3.7 pour évaluer les zones de tissus sains et nécrosés et générer les images finales codées en couleur. L'indice HAI, défini par Barrit *et al.* (soumis), a ensuite été utilisé pour évaluer l'impact du champignon sur le développement des plantules.

IV.2.4 Dosages de métabolites dans les graines

IV.2.4.1 Dosage des acides aminés et des acides organiques, des sucres solubles et anions inorganiques et de l'ion ammonium dans les graines

Un même protocole d'extraction a été utilisé pour les dosages des AA, des AO, des sucres et des ions. Les échantillons de graines stockés à -80°C ont été lyophilisés pendant 24h, pesés (30 mg de matière sèche en moyenne) puis broyés au broyeur à billes. Un mix contenant 400 µL de méthanol, 1 mL de chloroforme et 400 µL d'eau milli-Q a été ajouté dans chaque tube. Les standards internes (60,8 µL de α ABA à 2,5 mM et 60,8 µL d'acide phtalique à 2,5 mM) sont ensuite ajoutés aux tubes afin de servir de référence pour les dosages d'AA et d'AO. Après centrifugation, le surnageant (phase eau/méthanol) est récupéré puis la phase liquide est évaporée par passage au SpeedVac (Genevac), le culot ayant ensuite été resolubilisé dans 500 µL d'eau ultra-pure. Enfin, le contenu des tubes est filtré à 0,45 µm.

Dans le cas de l'analyse des AA et des AO détectés par GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse), les extraits filtrés sont séchés sous vide pour être ensuite dérivés. Une fois le culot sec, 50 µL de solution d'hydrochlorure de methoxyamine dans de la pyridine (20 mg / mL) sont ajoutés dans chaque tube, qui sont ensuite laissés à dériver 90 min à 30°C au bain à sec. Cette étape permet de protéger les fonctions cétone de la dégradation. L'étape suivante consiste à ajouter 50 µL de MTBSTFA (N-tert-Butyldiméthylsilyl-N-

méthyltrifluoroacétamide) dans chaque tube, puis à laisser dériver les tubes 30 min à 70°C au bain à sec. Le MTBSTFA se fixe aux fonctions acide, amine et thiol et permet la volatilisation des composés. Enfin, le contenu des tubes est transféré dans un flacon avec insert GC-MS et placé dans un système de GC-MS Scion SQ 436-GC (Scion Instruments, Amundsenweg, Pays-Bas ; Bruker, Billerica, Etats-Unis). Trois expériences indépendantes correspondant en moyenne à 30 mg de matière sèche ont été réalisées.

Pour les dosages de sucres solubles et d'anions inorganiques détectés par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance), les extraits sont dilués au dixième avant d'être injectés dans l'HPLC (Dionex, Sunnyvale). Un standard interne est ajouté aux échantillons dans le cas des sucres, le mélézitose (160 µg/mL). Six expériences indépendantes correspondant en moyenne à 30 mg de matière sèche ont été réalisées.

Les ions ammonium ont été dosés dans les graines par dosage colorimétrique, selon la méthode de Vega-Mas *et al.* (2015). Dans une microplaque spectrométrique à fond plat (96 puits), 50 µL d'extraits ont été mélangés avec, dans l'ordre, 100 µL de phénoxyde de sodium (330 mM) dissous dans du NaOH (160 mM, pH ≈ 13), 50 µL de nitroprussiate de sodium (0,02%) et 100 µL d'hypochlorite de sodium (0,2%). L'absorbance à 635 nm a été mesurée après 30 min d'incubation à température ambiante. La teneur en NH₄⁺ a été établie grâce à une gamme-étalon, de 0 à 10 mM, préparée à partir d'une solution de sulfate d'ammonium. Trois expériences indépendantes correspondant en moyenne à 30 mg de matière sèche ont été réalisées en duplicat.

IV.2.4.2 Dosage des huiles et des acides gras dans les graines

Ces dosages ont été effectués en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Agroindustrielle (LCA, Université de Toulouse, INRA, de Toulouse) (O. Merah), selon le protocole publié par Roche *et al.* (2019). La détermination de la composition en acides gras a été effectuée en fonction de la solubilité de l'huile dans le TerButylMéthyl Ether (ME0552, Scharlab, Barcelone, Espagne) selon la méthode (Norm ISO 5509, 1990), qui permet la transformation des acides gras en esters méthyliques. Les échantillons de graines (150 mg par échantillon) ont été broyés dans 5 mL de TerButylMéthyl Ether puis filtrés à travers un filtre GPH de 13 mm de diamètre. Sur la base de la norme NF EN ISO 12966-3, 100 mL du filtrat ont été mélangés à 50 mL d'hydroxyde de triMéthylSulfonium 0,2 M dans du méthanol (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Ceci a permis d'obtenir un mélange dont 1 mL a été injecté dans le chromatographe GC-3800 (Varian 3900, Palo Alto, Milpitas, CA, USA) associé à un détecteur à ionisation de flamme (FID) et équipé d'une colonne capillaire CP Select CB 50 m (diamètre : 0,25 mm). La température du four, initialement maintenue à 185°C pendant 40 min, a ensuite augmenté de 15°C par min jusqu'à atteindre 250°C, température maintenue pendant 10 min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées à 250°C. Un mélange standard connu d'esters méthyliques d'acide gras d'huile de colza (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a été utilisé

comme standard externe et a servi à doser les esters méthyliques d'acide gras des échantillons, par comparaison des temps de rétention. Trois extractions et dosages ont été réalisés par génotype de graine.

IV.2.4.3 Dosage de la camalexine et des glucosinolates dans les graines

La camalexine et les glucosinolates (GLS) présents dans les graines ont été dosés grâce à une méthode mise au point dans le cadre d'une collaboration avec le plateau PHYTO de la SFR Quasav et le SONAS (D. Bréard, D. Guilet) (projet BRAF (BRassicacées, Alternaria, déFenses), financé par l'appel à projet « Projets Expérimentaux » de la SFR QuaSav). Cette méthode décrite par Bréard *et al.* (en révision pour publication dans Journal of Chromatography B) consiste en une extraction simultanée assistée par ultrasons, une purification sur une colonne échangeuse d'anions et une détermination par HPLC-UV-MS pour les GLS, et HPLC couplée à un détecteur de fluorescence (HPLC-FLD) pour la camalexine. L'applicabilité de la méthode a été évaluée par l'identification et la quantification des GLS (totaux et individuels) et de la camalexine dans différents genres de *Brassicaceae*, différents génotypes d'*A. thaliana*, graines comme feuilles, inoculés ou non avec le champignon pathogène, *A. brassicicola*. Trois expériences indépendantes (30 mg de matière sèche par expérience en moyenne) ont été réalisées.

IV.2.5 Dosages de métabolites dans les plantules

Les échantillons des parties aériennes des plantules ayant servi pour toutes les expérimentations ont été récoltés 14 jours après semis et inoculation, et stockés à -80°C, à partir des 3 expériences indépendantes réalisées.

IV.2.5.1 Proportions atomiques de carbone, d'azote et de soufre dans les plantules

Les échantillons ont été lyophilisés, broyés, puis pesés de sorte à déposer 1 mg de matière par échantillon dans des capsules d'étain. La teneur élémentaire en carbone, soufre et azote (% C, % S, % N) et la composition isotopique du carbone, du soufre et de l'azote ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{15}\text{N}$) ont été mesurées dans les échantillons avec un analyseur élémentaire CHONS (Vario-EA PYROcube Elementar, Langenselbold, Allemagne) couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS Isoprime PreciIon Elementar, Langenselbold, Allemagne). Les décalages éventuels des valeurs IRMS brutes ont été corrigés à l'aide de normes internationales IEAE (caféine IAEA-600, IAEA Vienne) et de normes maison (mélange saccharose-méthionine-glycine (SMG) et étalonné par rapport à la caféine IAEA-600 et Ag₂S IAEA-S-1, pour les isotopes C, N et S).

IV.2.5.2 Extraction des métabolites des plantules pour la dérivation et le dosage des AA, AO, sucres solubles et polyamines par GC-MS

Un nouveau protocole de GC-MS a été développé pour l'analyse sur plantules, permettant le dosage de davantage de métabolites, et notamment des polyamines. L'extraction a commencé par la pesée puis le broyage au broyeur à billes de 30 mg de matière fraîche congelée. Sont ajoutés aux échantillons 1 mL de méthanol / eau milli-Q (80 / 20) contenant du ribitol 2,5 mM. Les échantillons ont été chauffés 15 min à 63°C, centrifugés, et 900 µL de surnageant ont été prélevés. Le contenu des tubes a été séché sous vide, et la dérivation des échantillons a commencé. Une fois le culot sec, 40 µL de pyridine avec hydrochlorure de methoxyamine (40 mg / mL) ont été ajoutés dans chaque tube, qui ont ensuite été laissés à dériver 2 h à 37°C. L'étape suivante a consisté à ajouter 40 µL de MTBSTFA (N-tert-Butyldiméthylsilyl-N-méthyltrifluoroacétamide) avec alcane n-connecticut (2 µL) dans chaque tube, puis à laisser dériver les tubes 30 min à 37°C. Enfin, le contenu des tubes a été transféré dans un flacon avec insert GC-MS et placé dans un système de GC-MS Scion SQ 436-GC (Scion Instruments, Amundsenweg, Pays-Bas ; Bruker, Billerica, Etats-Unis).

IV.2.5.3 Dosage des anions inorganiques et de l'ammonium dans les plantules

Le protocole pour ces dosages est à quelques détails près identique à celui utilisé pour les graines (cf §IV.2.4.1.). Les échantillons sont dans un premier temps lyophilisés pendant 24h, puis la matière sèche est pesée (50 mg en moyenne) et les échantillons sont broyés au broyeur à billes. Un mix contenant 400 µL de méthanol, 1 mL de chloroforme et 400 µL d'eau milli-Q est ajouté dans chaque tube. Après centrifugation, le surnageant (phase eau / méthanol) est récupéré puis la phase liquide est évaporée par passage au SpeedVac (Genevac), le culot étant ensuite resolubilisé dans 1 mL d'eau ultra-pure. Enfin, le contenu des tubes est filtré à 0,20 µm.

Pour les dosages d'anions inorganiques, 150 µL d'extraits non dilués sont déposés dans un vial avant injection dans l'HPLC (Dionex, Sunnyvale, Etats-Unis).

Pour les dosages de l'ammonium, le même protocole que pour les dosages dans les graines a été utilisé.

IV.2.6 Mesure de l'expression des gènes de plante et de champignon par RT-qPCR

Pour l'extraction de l'ARN total, les parties aériennes des plantules (mêmes pool d'échantillons que pour les dosages métaboliques, environ 30 mg de matière fraîche) ont été broyées dans l'azote liquide. La poudre homogène ainsi obtenue a été traitée avec du Trizol Reagent (Ambion, Austin, Etats-Unis) selon le protocole du fabricant. Après traitement à la DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis), l'obtention des ADNc s'est faite par transcription inverse de 1 µg d'ARN, réalisée en ajoutant dans les tubes 6 µL de iScript RT supermix5X (Bio-rad). Ces tubes sont ensuite placés au thermocycleur selon le cycle suivant : une étape de priming (5 min à 25°C) suivie d'une étape de transcription inverse (20 min à 46°C) et enfin d'une étape d'inactivation de la transcriptase inverse (1 min à 95°C). La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en utilisant le SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (nom du fabricant), en suivant strictement les instructions du fabricant. Trois réplicats sont réalisés par condition et par gène. Les échantillons sont ensuite placés dans un système de détection qPCR en temps réel CFX96TM (Bio-rad). Le programme utilisé est le suivant : 1 cycle d'activation de l'enzyme polymérase (30 s à 95°C) suivi de 40 répétitions des étapes de dénaturation (10 s à 95°C) et d'hybridation/élongation (10 s à 60°C). Enfin, une courbe de fusion de 65°C à 95°C est réalisée (augmentation de 0,5°C toutes les 5 s) afin de s'assurer qu'il n'y a bien qu'un seul produit d'amplification. L'actine et l'ubiquitine sont utilisées comme gènes de référence pour évaluer l'expression des différents gènes de la plante, alors que pour le champignon, ce sont les gènes de l'actine et de la tubuline qui ont été utilisés. La valeur d'expression d'un gène est obtenue grâce à la formule : $2^{-(CT_{\text{gène d'intérêt}} - CT_{\text{moyenne des deux gènes de référence}})}$. Les séquences d'amorces séquences d'amorces utilisées pour la RT-qPCR sont listées dans le tableau S1.

IV.2.7 Statistiques

Les comparaisons statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 4.1.2). Des tests paramétriques (ANOVA suivie du test HSD de Tukey en cas de comparaisons multiples, test t de Student en cas de comparaisons deux à deux) ont été réalisés lorsque les conditions de distribution normale et d'homogénéité des variances étaient remplies. Sinon, des tests non paramétriques (ANOVA utilisant des tests de permutation pour les comparaisons multiples, ou test de Wilcoxon-Mann-Whitney pour les comparaisons deux à deux) ont été utilisés pour tester la signification des résultats. Les différences statistiquement significatives ont été indiquées par $P < 0,05$. Le calcul des p -value utilisées pour les analyses multivariées (ACP pour les graines et volcano plot pour les plantules) ont également été réalisés grâce au logiciel R. Les ACP et la Heatmap correspondant aux dosages sur plantules ont été réalisées grâce à MetaboAnalyst 5.0 (Pang *et al.*, 2021). Le clustering des métabolites pour la Heatmap a été établi par la méthode de Ward, avec une mesure de la distance euclidienne. Enfin, l'OPLS et le calcul des $p(\text{corr})$ ont été effectués sur le logiciel SIMCA (Sartorius, Göttingen, Allemagne).

Tableau 1 : Valeurs moyennes de la surface verte (en mm² carrés ± SEM, et par boîte), pour les plantules Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻), traitées avec de l'eau, 14 jours après la date de traitement. Douze plantules par boîte, 6 boîtes par expérience indépendante, 3 expériences indépendantes. Les lettres en minuscule indiquent une différence statistiquement significative entre génotypes, à l'intérieur d'une condition azotée. Les lettres en majuscule indiquent une différence statistique entre conditions azotées, à l'intérieur d'un génotype, pour chaque condition azotée et pour leur moyenne. Une absence de lettre indique une absence de différence statistique pour la comparaison. Les différents effets des facteurs et leurs interactions sont présentés en bas du tableau, avec leur *p*-value. Significativité de *P* : 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05.

Surface verte (mm ²)	5 mM NH ₄ ⁺	0.1 mM NO ₃ ⁻	5 mM NO ₃ ⁻	Moyenne des génotypes
Col-0	27.1 ± 2.1 (a, B)	27.5 ± 1.3 (a, B)	133.6 ± 22.5 (A)	62.7 ± 11.7
Ler	15.3 ± 1.3 (b, B)	19.7 ± 2.1 (b, B)	93.1 ± 15.5 (A)	42.7 ± 9.0
Moyenne des conditions azotées	21.2 ± 1.8 (B)	23.6 ± 1.4 (B)	113.3 ± 14.3 (A)	52.7 ± 7.7
Effet Génotype (G)			0.02606 *	
Effet Azote (N)			<2e-16 ***	
Effet G x N			0.42821	

Tableau 2 : Valeurs moyennes de l'impact du champignon sur le développement des plantules, exprimées en tant que ratio (en pourcentage ± SEM) de surface verte entre plantules traitées avec H₂O et plantules inoculées avec Abra43, pour les plantules Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻), 14 jours après inoculation (JAI). Douze plantules par boîte, 6 boîtes par expérience indépendante, 3 expériences indépendantes. Les lettres en minuscule indiquent une différence statistique entre génotypes, à l'intérieur d'une condition azotée, pour chaque génotype et pour leur moyenne. Les lettres en majuscule indiquent une différence statistique entre conditions azotées, à l'intérieur d'un génotype, pour chaque condition azotée et pour leur moyenne. Une absence de lettre indique une absence de différence statistique pour la comparaison. Les différents effets des facteurs et leurs interactions sont présentés en bas du tableau, avec leur *p*-value. Significativité de *P* : 0 < *** < 0,001.

Impact du champignon (%)	5 mM NH ₄ ⁺	0.1 mM NO ₃ ⁻	5 mM NO ₃ ⁻	Moyenne des génotypes
Col-0	93.5 ± 3.2 (A)	81.5 ± 4.6 (b, A)	51.8 ± 9.5 (b, B)	75.6 ± 4.8 (b)
Ler	93.9 ± 2.1 (A)	92.8 ± 2.0 (a, A)	71.0 ± 4.8 (a, B)	85.9 ± 2.3 (a)
Moyenne des conditions azotées	93.7 ± 1.8 (A)	87.1 ± 2.4 (A)	61.4 ± 5.6 (B)	80.7 ± 2.6
Effet Génotype (G)			<2e-16 ***	
Effet Azote (N)			<2e-16 ***	
Effet G x N			0.5950	

IV.3 Résultats

IV.3.1. Influence du milieu azoté et du génotype sur le développement des plantules et l'impact du champignon

Le Tableau 1 présente les résultats de surface verte aérienne des plantules correspondant aux expérimentations analysées dans ce chapitre et spécifiquement dédiées aux analyses moléculaires. Les plantules cultivées en présence de 5 mM NO_3^- présentent globalement une surface verte plus importante (113,3 mm² en moyenne) que celles cultivées en présence de 5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^- (respectivement 21,2 et 23,6 mm² en moyenne). Les mêmes résultats sont obtenus en considérant chacun des deux génotypes étudiés séparément. De plus, la surface verte des plantules Col-0 est aussi plus importante que celle des plantules *Ler* en condition 5 mM NH_4^+ (27,1 vs 15,3 mm²) et 0,1 mM NO_3^- (27,5 vs 19,7 mm²), la comparaison globale des moyennes des génotypes ne permettant par contre pas de mettre en évidence une différence. Enfin, il n'y a aucune interaction entre génotype et milieu azoté pour ce caractère.

Les résultats d'impact du champignon sur le développement des plantules, estimé grâce à l'indice HAI sont présentés dans le Tableau 2. Comme dans le cas des expérimentations menées pour la mise au point du pathosystème, l'impact du champignon est influencé par la nutrition azotée, les plantules cultivées en condition 5 mM NO_3^- étant moins sensibles que celles cultivées en condition 5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^- , que ce soit pour les deux génotypes pris séparément ou globalement (HAI = 61.4% pour 5 mM NO_3^- , 93.7% pour 5 mM NH_4^+ et 87,1% pour 0,1 mM NO_3^-). Les différences entre génotypes sont également à nouveau observées, les plantules du génotype Col-0 étant moins sensibles au champignon que les plantules *Ler*, en particulier sous régime nutritif NO_3^- (0,1 ou 5 mM). Enfin, aucune interaction entre génotype et milieu azoté n'est présente.

En conclusion, les différences statistiques entre milieux et génotypes pour la surface verte et l'impact du champignon observées correspondent bien à ce qui avait été obtenu lors des expériences présentées dans le chapitre précédent, témoignant de la répétabilité de ces résultats et donc de la fiabilité du dispositif.

Tableau 3 : Masse moyenne des graines sèches pour les deux génotypes Col-0 et Ler (en $\mu\text{g} \pm \text{SEM}$).

Génotype	Masse sèche d'une graine (μg)
Col-0	19.69 ± 0.17
Ler	18.48 ± 0.30

Tableau 4 : Teneurs en acides aminés et en acides organiques dosés dans les graines des deux génotypes Col-0 et Ler (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$). Les lettres indiquent une différence statistique au seuil $\alpha = 5\%$ pour chaque comparaison génotypique, une absence de lettre indiquant une absence de différence. ND = non déterminé.

Teneur en AA et AO ($\mu\text{mol} / \text{g MS}$)	Col-0	Ler
Alanine	0.87 ± 0.07 (b)	1.56 ± 0.11 (a)
Arginine	ND	ND
Asparagine	0.74 ± 0.03 (b)	1.58 ± 0.06 (a)
Aspartate	0.94 ± 0.08	0.70 ± 0.06
Cystéine	ND	ND
GABA	0.14 ± 0.00 (b)	0.26 ± 0.02 (a)
Glutamate	2.71 ± 0.17	3.27 ± 0.23
Glutamine	0.18 ± 0.07 (b)	0.58 ± 0.05 (a)
Glycine	0.14 ± 0.01	0.32 ± 0.05
Histidine	ND	ND
Isoleucine	0.15 ± 0.00 (b)	0.30 ± 0.02 (a)
Leucine	0.13 ± 0.00 (b)	0.27 ± 0.03 (a)
Lysine	ND	ND
Méthionine	0.14 ± 0.00	0.16 ± 0.01
Phénylalanine	0.13 ± 0.00	0.20 ± 0.02
Proline	1.18 ± 0.17 (b)	4.30 ± 0.47
Sérine	0.53 ± 0.01 (b)	1.00 ± 0.12 (a)
Thréonine	0.76 ± 0.22	1.48 ± 0.30
Tryptophane	0.17 ± 0.00	0.18 ± 0.01
Tyrosine	0.15 ± 0.00	0.16 ± 0.01
Valine	0.26 ± 0.00 (b)	0.52 ± 0.03 (a)
Total AA	9.35 ± 0.38 (b)	16.86 ± 1.35 (a)
α -Cétoglutarate	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Citrate	2.21 ± 0.21	2.20 ± 0.03
Fumarate	5.20 ± 0.14	5.39 ± 0.12
Isocitrate	0.16 ± 0.00	0.16 ± 0.01
Malate	5.43 ± 0.54	9.34 ± 1.30
Pyruvate	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Succinate	0.32 ± 0.01 (b)	0.48 ± 0.02 (a)
Total AO	13.76 ± 0.72 (b)	17.99 ± 1.14 (a)
Total AA + AO	23.11 ± 0.90 (b)	34.85 ± 0.71 (a)

IV.3.2. Analyse de la composition des graines des deux génotypes Col-0 et *Ler*

La teneur en différents métabolites, (i) appartenant au métabolisme primaire de l'azote (acides aminés (AA), ions inorganiques (nitrate, ammonium)), (ii) au métabolisme carboné (acides organiques (AO), sucres solubles, lipides) ou (iii) étant des métabolites secondaires liés à la défense de la plante, camalexine et glucosinolates (GLS), a été déterminée dans les graines des deux écotypes étudiés (Col-0, *Ler*). Ceci dans l'objectif d'avoir une vue d'ensemble de la composition métabolique de départ et des différences éventuelles entre génotypes, pouvant en partie expliquer les différences de sensibilité observées au stade plantule. Les lots de graines utilisés sont ceux ayant servi aux expériences sur plantules. Les résultats sont d'abord présentés séparément pour toutes les catégories de métabolites. Puis, une analyse multivariée, ACP (Analyse en Composantes Principales), a été réalisée afin de déterminer quels sont les métabolites des graines provenant d'un même extrait qui permettent de discriminer les 2 génotypes étudiés.

Le Tableau 3 présente les quantités de masse sèche (MS) des graines des deux génotypes : les graines de Col-0 pèsent en moyenne 19,69 μg et les graines de *Ler* 18,48 μg , valeurs non différentes statistiquement.

IV.3.2.1. Teneurs en acides aminés et en acides organiques dans les graines

Les teneurs en AA et en AO des graines de Col-0 et *Ler* sont présentées dans le Tableau 4.

Les AA les plus abondants dans les graines sont le glutamate et la proline, puis l'alanine, l'asparagine et la thréonine. Des différences sont observées entre les génotypes, les graines du génotype *Ler* étant plus riches en AA que celles de Col-0. En effet, les graines de *Ler* contiennent en moyenne 16,86 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ d'AA, contre 9,35 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ pour Col-0. Cette différence de teneur totale entre les deux génotypes est expliquée par de nombreuses différences significatives individuelles de teneurs. Les graines de *Ler* sont ainsi plus riches que les graines de Col-0 en alanine, en asparagine, en GABA, en glutamine, en isoleucine, en leucine, en proline, en sérine et en valine.

Comme observé précédemment pour les AA, les graines de *Ler* sont plus riches en AO que les graines de Col-0 (17,99 vs 13,76 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$; Tableau X). Le seul AO pour lequel une différence significative de teneur a été observée entre génotypes est le succinate, plus abondant chez *Ler* que chez Col-0 (0,48 vs 0,32 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$). Le fumarate et le malate sont pour les deux génotypes les deux métabolites les plus présents, représentant la grande majorité des AO présents dans les graines. Les graines contiennent également une part importante de citrate, et des traces des autres AO.

Tableau 5 : Teneurs en sucres solubles dosés dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler* (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$). Les lettres indiquent une différence statistique au seuil $\alpha = 5\%$ pour chaque comparaison génotypique, une absence de lettre indiquant une absence de différence.

Teneur en sucre soluble ($\mu\text{mol} / \text{g MS}$)	Col-0	<i>Ler</i>
Glucose	0.52 \pm 0.10	0.64 \pm 0.25
Fructose	0.08 \pm 0.02 (b)	0.47 \pm 0.05 (a)
Sucrose	35.30 \pm 3.69	30.88 \pm 2.64
Raffinose	1.22 \pm 0.21 (b)	1.80 \pm 0.13 (a)
Stachyose	2.36 \pm 0.31 (a)	1.32 \pm 0.11 (b)
Total	39.47 \pm 4.19	35.11 \pm 2.92

Tableau 6 : Teneurs en ions inorganiques dosés dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler* (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$). Les lettres indiquent une différence statistique au seuil $\alpha = 5\%$ pour chaque comparaison génotypique, une absence de lettre indiquant une absence de différence.

Teneur en ion inorganique ($\mu\text{mol} / \text{g MS}$)	Col-0	<i>Ler</i>
Fluorure	4.99 \pm 0.86	4.83 \pm 0.78
Chlorure	12.30 \pm 0.88 (b)	25.85 \pm 1.36 (a)
Nitrate	18.68 \pm 1.43 (b)	58.36 \pm 3.33 (a)
Sulfate	0.23 \pm 0.07 (b)	0.57 \pm 0.33 (a)
Phosphate	1.03 \pm 0.26	1.04 \pm 0.28
Ammonium	4.89 \pm 0.57	5.71 \pm 0.79

Tableau 7 : Teneurs en huiles (en pourcentage massique \pm SEM) dans les graines des deux génotypes Col-0 et *Ler*, et composition en acides gras (en pourcentage massique \pm SEM). Les lettres indiquent une différence statistique au seuil $\alpha = 5\%$ pour chaque comparaison génotypique, une absence de lettre indiquant une absence de différence.

Teneur en acide gras (%)	Col-0	<i>Ler</i>
Acide palmitique	8.00 \pm 0.06 (a)	6.50 \pm 0.10 (b)
Acide stéarique	3.10 \pm 0.06	3.10 \pm 0.06
Acide oléique	14.60 \pm 0.10 (b)	16.40 \pm 0.20 (a)
Acide cis-vaccénique	1.40 \pm 0.00 (a)	1.30 \pm 0.00 (b)
Acide linoléique	28.40 \pm 0.06 (a)	26.90 \pm 0.12 (b)
Acide arachidique	2.20 \pm 0.06	2.10 \pm 0.07
Acide linoléique	18.20 \pm 0.10 (a)	17.20 \pm 0.10 (b)
Acide gondoïque	19.50 \pm 0.07 (b)	22.10 \pm 0.07 (a)
Acide eicosadiénoïque	2.00 \pm 0.06 (a)	1.50 \pm 0.00 (b)
Acide béhénique	0.60 \pm 0.00 (b)	0.70 \pm 0.00 (a)
Acide érucique	1.90 \pm 0.00 (b)	2.20 \pm 0.00 (a)
Huile (%)	27.40 \pm 0.38	28.40 \pm 1.56

IV.3.2.2. Teneurs en sucres solubles dans les graines

Le Tableau 5 permet d'observer les teneurs en sucres solubles, en $\mu\text{mol} / \text{g}$ de MS, dans les graines des deux génotypes. Le sucre le plus abondant est le saccharose (environ $33 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS). Les autres sucres sont nettement moins abondants : entre 1 ou $2 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour le stachyose et le raffinose, moins de $1 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour le glucose et le fructose, ce dernier étant le moins abondant. Si aucune différence entre génotypes ne s'observe sur le sucre majoritairement présent, des différences s'observent sur les autres sucres solubles. Ainsi, le fructose et le raffinose sont plus abondants dans les graines de *Ler*, et le stachyose plus abondant dans les graines de Col-0.

IV.3.2.3. Teneurs en ions inorganiques dans les graines

Les profils ioniques des graines des deux génotypes sont similaires : l'ion le plus abondant est le nitrate, suivi du chlorure puis de l'ammonium et du fluorure (Tableau 6). Les graines du génotype *Ler* sont globalement plus riches en anions que celles du génotype Col-0. Cette différence est significative pour le nitrate ($58,36 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour *Ler* vs $18,68 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour Col-0), pour le chlorure ($25,85 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour *Ler* contre $12,30 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour Col-0) et pour le sulfate ($0,57 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour *Ler* vs $0,23 \mu\text{mol} / \text{g}$ MS pour Col-0).

IV.3.2.4. Teneurs en acides gras dans les graines

La teneur en huile totale, exprimée en pourcentage massique, n'est pas significativement différente entre les graines des génotypes Col-0 et *Ler* ($27,40\%$ pour Col-0 vs $28,40\%$ pour *Ler* ; Tableau 7), contrairement aux teneurs individuelles en acides gras qui pour beaucoup d'entre elles varient. De manière générale, les acides gras les plus présents sont l'acide linoléique, l'acide gondoïque, l'acide linoléique, l'acide oléique et l'acide palmitique, représentant environ 90% des acides gras de la graine. Les graines de *Ler* sont significativement plus riches en acide oléique, en acide gondoïque, en acide béhénique et en acide érucique que les graines de Col-0, qui, elles, contiennent plus d'acide palmitique, d'acide cis-vaccénique, d'acide linoléique, d'acide linoléique et d'acide eicosadiénoïque.

Tableau 8 : Composition en glucosinolates (en pourcentage massique) et teneurs totales en glucosinolates (en mg / g MS \pm SEM) dans les graines des deux génotypes Col-0 et Ler. Les lettres indiquent une différence statistique au seuil $\alpha = 5\%$. ND = non détecté.

Teneur en glucosinolate (%)	Col-0	Ler
Glucosylisothiocyanate	1%	27%
Glucosylarabidopsithalianine	4%	ND
Glucosylaphanane	1%	ND
Glucosylberberine/Glucosylbervirine	ND	5%
Glucosyliberine/Glucosylbarine	1%	ND
Glucosylrucine	41%	1%
Glucobrassicine	2%	ND
Glucosylhirsutine	8%	10%
Glucosylberterone	3%	ND
Glucosylmalcolmine	7%	30%
4-(Benzoyloxy)butyl glucosinolate	12%	ND
Glucosylarabidopsithalianine	5%	2%
Glucosylhirsutine/Glucosylarabidopsithalianine	7%	17%
Teneur totale en glucosinolate (mg / g MS)	20.09 \pm 0.61 (b)	26.37 \pm 0.42 (a)

IV.3.2.5. Teneurs en camalexine et en glucosinolates dans les graines

La camalexine n'a pas été détectée dans les graines. Par contre, le profil en glucosinolates (GLS) des deux génotypes a pu être établi (Tableau 8). Les résultats mettent en évidence que la teneur totale en GLS est plus importante chez les graines de *Ler* (26,37 mg / g MS) que chez les graines de Col-0 (20,09 mg / g MS). De plus, les profils en GLS sont extrêmement différents entre les deux génotypes. La glucoérucine est par exemple le GLS le plus abondant chez Col-0, représentant 41% du total des GLS, alors qu'elle est quasiment absente chez *Ler*, ne représentant que 1% du total. Le deuxième GLS le plus abondant chez Col-0, le 4-(benzoyloxy)butyl GLS (12% du total), n'a quant à lui pas été détecté chez *Ler*. De la même façon, les GLS les plus présents chez *Ler*, la glucomalcolmiine (30%), le glucoerysimumhieracifolium (27%) et la glucojirsutine / glucoarabishirsuine (17%), sont présents en faibles quantités chez Col-0 (7, 1 et 7%, respectivement). Il est enfin à noter que le profil des GLS détectés chez Col-0 comporte 12 métabolites et est plus diversifié que celui de *Ler* qui n'en comporte que 7.

IV.3.2.6 Analyse en Composantes Principales des métabolites détectés dans les graines

L'ACP présentée en Figure 1 permet d'avoir une vue d'ensemble des résultats métaboliques (AA, AO, sucres solubles, ions inorganiques) mis en évidence par les comparaisons statistiques entre génotypes et susceptibles de contribuer aux différences observées en termes de sensibilité au champignon au stade plantule. L'axe 1 permet d'expliquer et de représenter la majorité de la variance de nos données (59,7%), tandis que l'axe 2 représente 22% de la variance des données. L'ACP permet donc de visualiser 81,7% des données et donc de présenter de manière exhaustive la structuration des métabolites en fonction des axes. Les métabolites se structurent majoritairement en fonction de l'axe 1, cet axe permettant également d'opposer le génotype Col-0 et le génotype *Ler*. L'ACP met en avant la richesse métabolique des graines de *Ler* par rapport à celles de Col-0, 25 variables métaboliques tendant vers le point correspondant à la moyenne des trois échantillons *Ler*, tandis que 2 seulement (l'aspartate et le stachyose) tendent vers le point correspondant à la moyenne des échantillons Col-0. L'impact du champignon sur les plantules, plus important chez le génotype *Ler* que chez le génotype Col-0, tend également vers la moyenne des trois échantillons *Ler*. L'axe 2, quant à lui, structure les métabolites indépendamment de leurs différences génotypiques. Le saccharose, le fluorure et le phosphate s'opposent à des AO (α -cétoglutarate, citrate, isocitrate, pyruvate) et des AA (tryptophane, tyrosine, méthionine) sur cet axe.

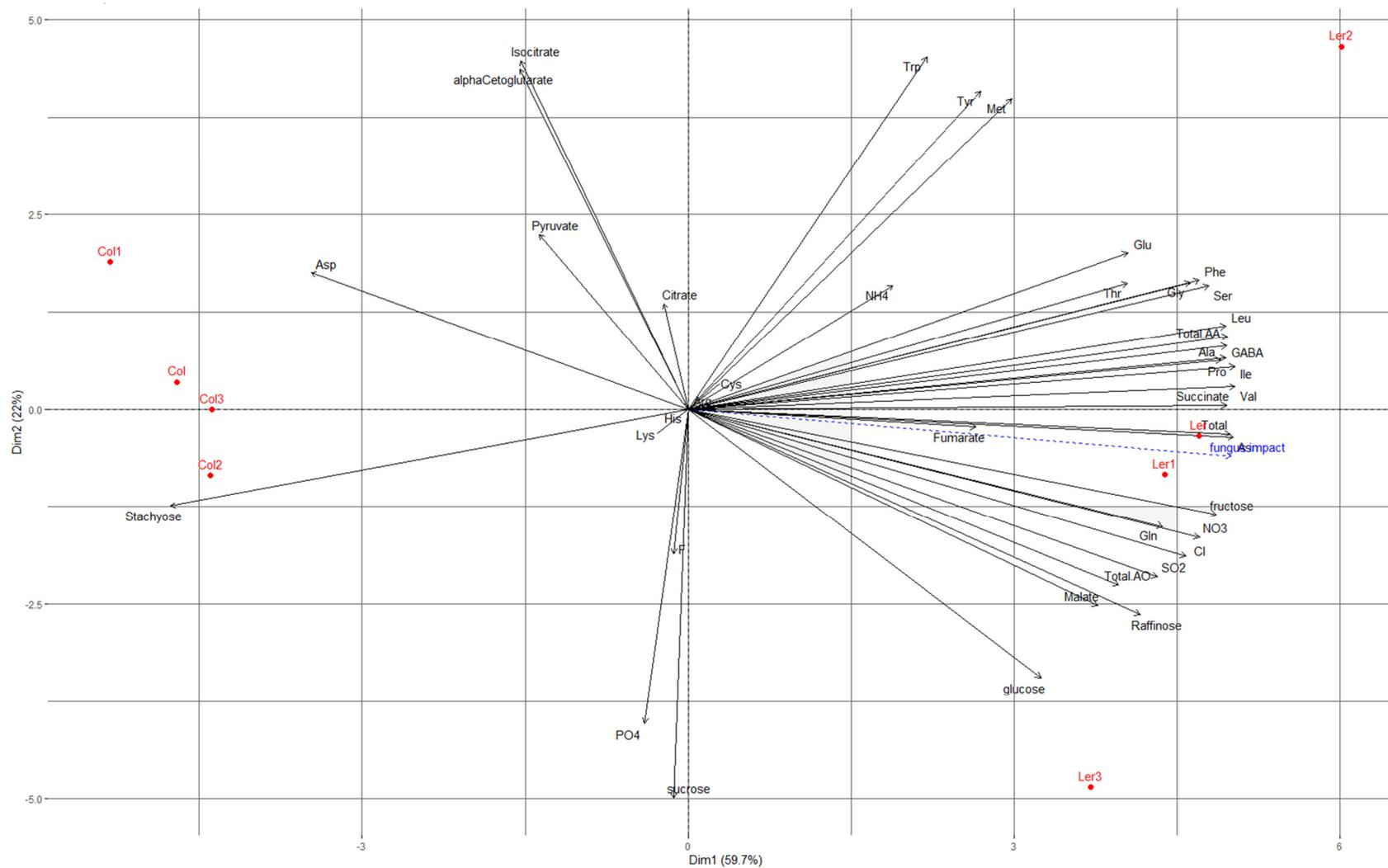


Figure 1 : Analyse en Composantes Principales des métabolites détectés dans les graines. Représentation des individus (Col-0 et *Ler*) en rouge, des variables en noir et projection de l'impact du champignon sur les plantules (évalué grâce au HAI) en bleu.

Tableau 9 : Proportions atomiques de carbone, d'azote et de soufre (en pourcentage massique \pm SEM) dans les plantules des deux génotypes Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻) après traitement par H₂O ou inoculation par Abra43, 14 JAI. Les lettres en minuscule indiquent une différence statistique entre génotypes au seuil $\alpha = 5\%$, à l'intérieur d'une condition azotée et d'une condition d'inoculation. Les lettres en majuscule indiquent une différence statistique entre conditions azotées au seuil $\alpha = 5\%$, à l'intérieur d'un génotype et d'une condition d'inoculation. Les lettres grecques indiquent une différence statistique entre conditions d'inoculation au seuil $\alpha = 5\%$, à l'intérieur d'un génotype et d'une condition azotée. Une absence de lettre indique une absence de différence statistique pour la comparaison. nd = non déterminé.

Proportions atomiques (%)			Carbone	Azote	Soufre
5 mM NH ₄ ⁺	H ₂ O	Col-0	40.52 \pm 0.20 (A)	6.54 \pm 0.43 (A)	1.23 \pm 0.11
		<i>Ler</i>	40.67 \pm 0.97 (A)	7.48 \pm 0.25 (A)	1.07 \pm 0.09
	Abra43	Col-0	39.98 \pm 0.01 (A)	5.91 \pm 0.26 (A)	1.30 \pm 0.06
		<i>Ler</i>	nd	nd	nd
0.1 mM NO ₃ ⁻	H ₂ O	Col-0	39.62 \pm 0.17 (A)	3.15 \pm 0.28 (B)	1.35 \pm 0.13 (a)
		<i>Ler</i>	40.77 \pm 0.39 (A)	2.80 \pm 0.49 (B)	0.99 \pm 0.18 (b)
	Abra43	Col-0	39.97 \pm 0.99 (A)	3.37 \pm 0.82 (B)	1.37 \pm 0.19
		<i>Ler</i>	40.12	3.91 (B)	1.30
5 mM NO ₃ ⁻	H ₂ O	Col-0	34.91 \pm 0.71 (b, B)	6.98 \pm 0.34 (A)	1.44 \pm 0.07
		<i>Ler</i>	37.71 \pm 0.35 (a, B)	7.54 \pm 0.10 (A, α)	1.25 \pm 0.13
	Abra43	Col-0	36.23 \pm 0.30 (b, B)	6.03 \pm 0.22 (A)	1.46 \pm 0.03
		<i>Ler</i>	38.69 \pm 0.37 (a)	6.05 \pm 0.30 (A, β)	1.22 \pm 0.02

IV.3.3. Influence du champignon, de la nutrition azotée et du génotype sur la composition métabolique des plantules

Cette partie est consacrée aux résultats de dosages métaboliques effectués sur les plantules Col-0 et *Ler*, inoculées avec le champignon ou non, dans les différentes conditions de milieu azoté (5 mM NH_4^+ , 0,1 mM NO_3^- et 5 mM NO_3^-). Comme pour les analyses sur les graines, les acides aminés, acides organiques, sucres solubles et ions inorganiques ont été dosés dans les plantules. Cependant, un changement de protocole de GC-MS a permis de détecter plus de composés, et notamment les polyamines. Les proportions atomiques de carbone, d'azote et de soufre ont également été évaluées. Enfin, une analyse de type OPLS (Orthogonal Projections to Latent Structures) et une représentation en volcano plot ont été effectuées afin de relier l'impact du champignon sur les plantules aux teneurs en métabolites.

IV.3.3.1. Proportions atomiques de carbone, d'azote et de soufre dans les plantules

Les proportions atomiques des plantules de carbone (C), d'azote (N) et de soufre (S) sont présentées dans le Tableau 9. Il est à noter qu'aucun résultat concernant les plantules de *Ler* cultivées en présence de 5 mM- NH_4^+ et inoculées par *Abra43* n'est présenté. Les plantules étant très affectées par le champignon dans ces conditions, les analyses n'ont pas pu être réalisées faute de matériel. De même, il n'y a qu'une seule répétition pour la condition 0,1 mM NO_3^- - *Abra43* - *Ler*, pour les mêmes raisons.

Le C représente en moyenne environ 39% de la proportion atomique des plantules, le N environ 5.5% et le S environ 1.3%.

Les résultats indiquent que la proportion atomique de C est plus faible chez les plantules cultivées en condition 5 mM NO_3^- , et, que dans cette condition, cette proportions est plus importante chez *Ler* que chez Col-0. Dans le cas de N, la proportion atomique est plus importante chez les deux conditions à 5 mM, et plus faible chez la condition 0,1 mM NO_3^- . Un effet de l'inoculation s'observe aussi, la présence du champignon diminuant la proportion de N dans le cas de *Ler* en présence de 5 mM NO_3^- . Enfin, le S est très stable entre les différentes conditions, la seule différence observée étant entre Col-0 et *Ler* pour la double condition 0,1 mM NO_3^- - H_2O .

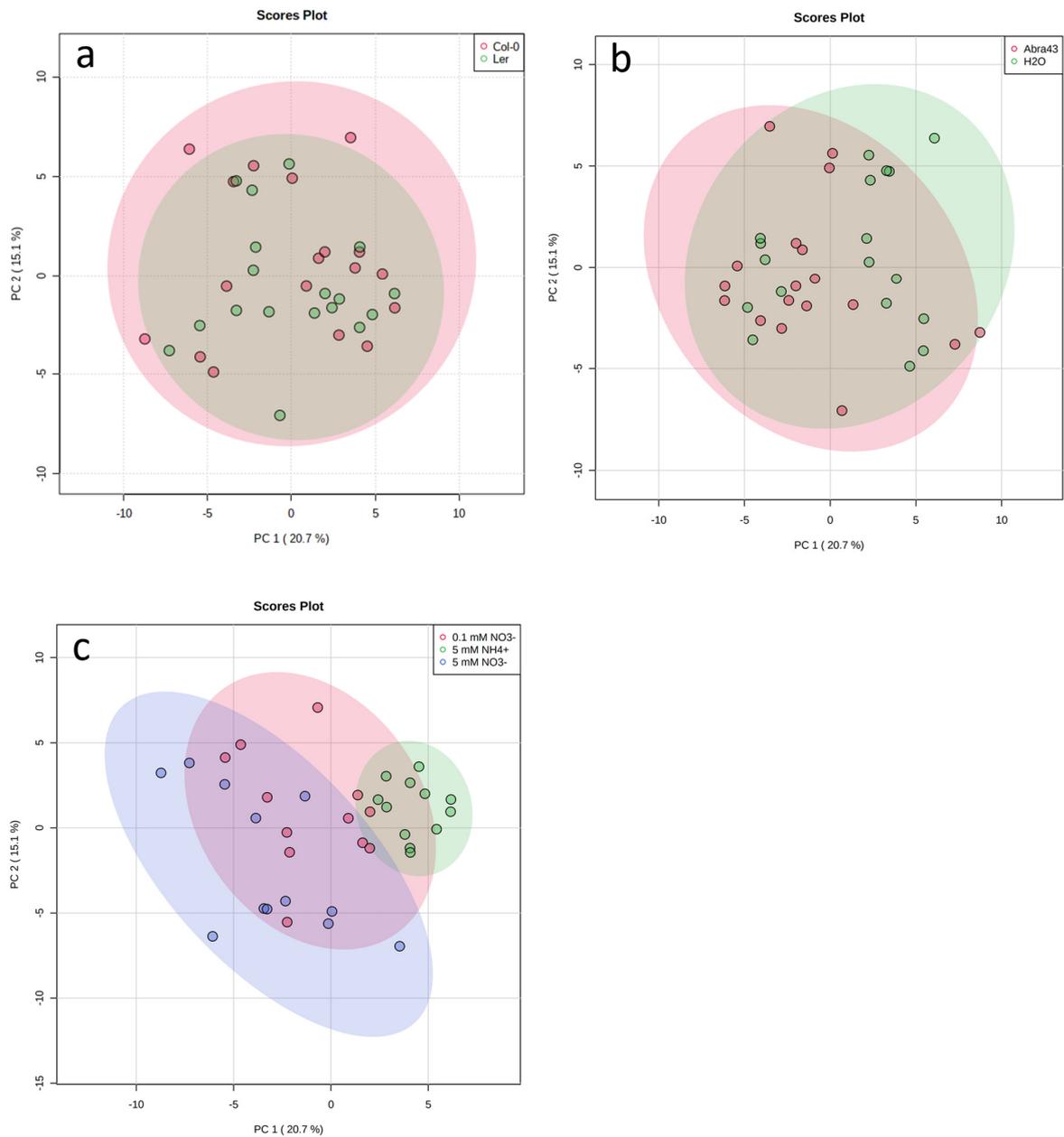


Figure 2 : Analyse en Composantes Principales des teneurs en métabolites (AA, AO, sucres, polyamines) (a) en fonction du génotype ; (b) en fonction de l'inoculation par le champignon ; (c) en fonction du milieu azoté. Chaque point représente un échantillon, correspondant à la moyenne des dosages de métabolites dans une condition de génotype, d'inoculation et de nutrition azotée.

IV.3.3.2. Teneurs en acides aminés, en acides organiques, en sucres solubles et en polyamines dans les plantules

Une ACP a été effectuée afin de visualiser les différents effets des milieux azotés (N), des génotypes (G) et de l'inoculation (I) par le champignon sur la structuration des échantillons en fonction de leurs teneurs en métabolites. Chaque point représente un échantillon, correspondant à la moyenne des dosages de métabolites dans une condition de génotype, d'inoculation et de nutrition azotée, et la figure 2 met en évidence la classification de ces échantillons en fonction des effets principaux globaux (N, I et G). Elle permet de voir la représentation dans l'espace de la distribution des échantillons, en fonction des deux axes des composantes principales, pour chacune des classifications étudiées. Deux dimensions sont significatives (35,8% de la variance expliquée, l'axe 1 expliquant 20,7% de la variance, et l'axe 2, 15,1%). La séparation des échantillons en fonction du génotype (Fig. 2a) ou de l'inoculation (Fig. 2b) ne permet pas la création de groupes distincts, la superposition des deux groupes est même quasiment parfaite dans les deux cas. Au contraire, la division entre les trois milieux (Fig. 2c) permet de montrer trois groupes d'échantillons correspondant aux trois conditions azotées, avec les groupes 5 mM NO_3^- et 5 mM NH_4^+ séparés, et le groupe 0,1 mM NO_3^- intermédiaire entre les deux autres. Il apparaît ainsi que l'effet du milieu azoté sur les teneurs globale en métabolites est plus important que ceux de l'inoculation et du génotype. Ces résultats suggèrent que l'effet du type de milieu azoté au sein des conditions Abra43 / H_2O ou Col-0 / *Ler* masque les différences qui pourraient exister entre ces conditions au sein de chaque milieu, et que l'agrégation des génotypes et des modalités d'inoculation n'est pas suffisante pour effacer les différences entre milieux. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'effet de l'inoculation et du génotype au sein des différents milieux (6 ACP présentées en Figure annexe 1), ce qui a permis de mettre en évidence l'existence d'une séparation franche en groupes des échantillons Abra43 et H_2O dans les deux conditions de milieu 5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^- , mais pas dans le cas du milieu 5 mM NO_3^- . Pour ce qui est du génotype, les comparaisons Col-0 / *Ler* au sein des milieux montrent des échantillons et des groupes non différenciés. Il semble donc y avoir un effet inoculation sur les teneurs en métabolites au sein des conditions 5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^- , les deux conditions azotées pour lesquelles les plantules sont le plus affectées par le champignon.

Une fois la caractérisation des effets principaux effectuée, les teneurs individuelles en métabolites présents dans les plantules ont été analysées. La figure 3 représente une Heatmap des métabolites significativement différents entre les conditions de milieu, de génotype et d'inoculation. Le clustering et la comparaison des moyennes par ANOVA ont permis de mettre en évidence trois grandes catégories de métabolites, en fonction de leurs teneurs relatives et des fluctuations de ces teneurs entre les différentes conditions N, G et I étudiées. Il est à noter que la classification des métabolites s'effectue avant tout en fonction des milieux azotés, en accord avec l'importance de cet effet, comme décrit ci-dessus.

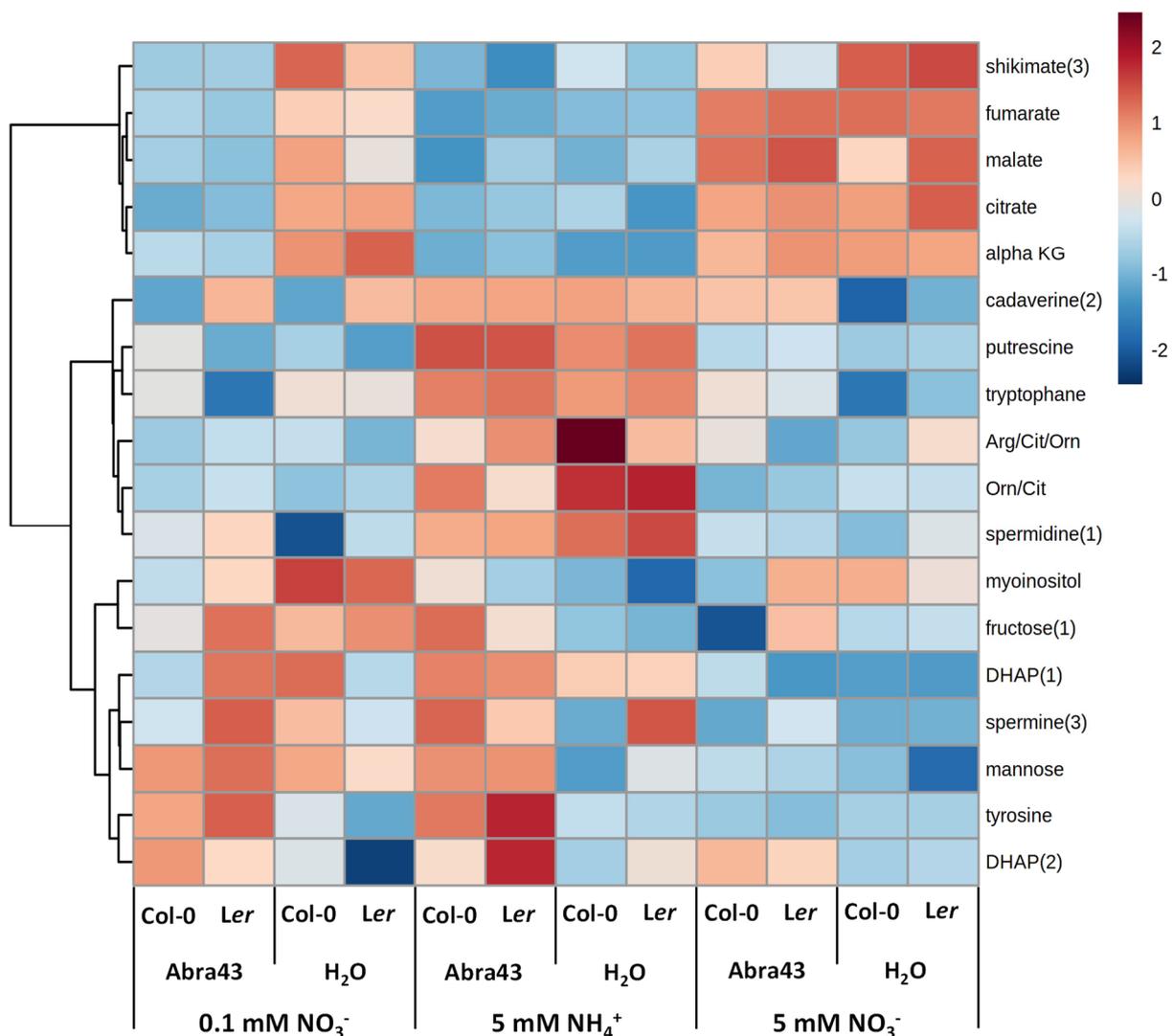


Figure 3 : Heatmap (carte de chaleur) des métabolites significativement différents entre les conditions de milieu, de génotype et d'inoculation. Les teneurs en métabolites ont subi une transformation logarithmique et les valeurs ont été centrées sur la valeur médiane. Une couleur rouge correspond aux métabolites plus abondants que la médiane, et une couleur bleue aux métabolites moins abondants que la médiane. Le clustering des métabolites a été établi par la méthode de Ward, avec une mesure de la distance euclidienne. Les numéros après les noms des métabolites (par exemple DHAP(1)) correspondent à différents produits de dérivation associés à la même molécule.

La première de ces catégories (Figure 3) regroupe 5 métabolites plus abondants en condition 5 mM NO_3^- et moins abondants en condition 5 mM NH_4^+ . Il s'agit exclusivement d'AO : le shikimate, le fumarate, le malate, le citrate et l' α -cétoglutarate. Ces métabolites sont également plus abondants en condition 0,1 mM NO_3^- , mais seulement chez les plantules non inoculées. Un autre effet de l'inoculation est observable en condition 5 mM NH_4^+ dans le cas du shikimate et du fumarate, plus présents en condition H_2O qu'Abra43. Il existe enfin un effet génotypique dans cette catégorie concernant le malate, plus présent chez *Ler* en condition 5 mM NH_4^+ et plus présent chez Col-0 dans la double condition 0,1 mM NO_3^- - H_2O .

La seconde catégorie (Figure Y), est constituée de 7 métabolites plus abondants en condition 5 mM NH_4^+ que dans les deux conditions NO_3^- . Il s'agit d'AA (le tryptophane, l'arginine, la citrulline et l'ornithine) et de polyamines (la cadavérine (Cad), la putrescine (Put) et la spermidine (Spd)). Des effets de l'inoculation se retrouvent au sein de certaines conditions azotées seulement : la Cad et le tryptophane sont plus abondants en présence du champignon pour la condition 5 mM NO_3^- , et la Put pour la condition 5 mM NH_4^+ . Au contraire, l'ornithine/citrulline est plus abondante en condition H_2O au sein du milieu 5 mM NH_4^+ . Pour ce qui est des génotypes, la Cad est plus abondante chez *Ler* en condition 0,1 mM NO_3^- , alors que c'est l'inverse pour la Put dans cette condition azotée. Enfin, dans la double condition 5 mM NH_4^+ - H_2O , l'arginine / citrulline / ornithine est plus présente chez Col-0.

La constitution de la troisième catégorie (Figure Y), constituée de 7 métabolites, ne peut par contre pas s'expliquer globalement par un effet N. En effet, si la dihydroxyacétone-phosphate (1) (DHAP), la spermine, le mannose et la tyrosine sont caractérisés par une abondance plus faible en 5 mM NO_3^- , ce n'est pas le cas du myo-inositol, du fructose et de la DHAP (2). L'autre caractéristique propre à la majorité des métabolites de cette catégorie est une abondance plus élevée en condition Abra43 - 5 mM NH_4^+ (sont concernés le myo-inositol, le fructose, le mannose, la tyrosine et la dihydroxyacétone phosphate (2)). Cette abondance plus forte en présence du champignon se retrouve également pour la tyrosine en présence de 0,1 mM NO_3^- et pour la dihydroxyacétone phosphate (2) dans les deux conditions NO_3^- . Au contraire, le myo-inositol est moins abondant en présence du champignon en condition 0,1 mM NO_3^- . Deux effets du génotype sont mis en évidence, pour le fructose et la spermine, plus abondants chez *Ler*, respectivement dans les conditions 5 mM NO_3^- - Abra43 et 5 mM NH_4^+ - H_2O .

Tableau 10 : Teneurs en ions inorganiques (en $\mu\text{mol} / \text{g MS} \pm \text{SEM}$) dans les plantules des deux géotypes Col-0 et *Ler* cultivées sur différents milieux nutritifs (5 mM NH_4^+ , 0,1 mM NO_3^- ou 5 mM NO_3^-) après traitement par H_2O ou inoculation par Abra43, 14 JAI. Les lettres en minuscule indiquent une différence statistique entre géotypes, à l'intérieur d'une condition azotée et d'une condition d'inoculation ou pour leur moyenne. Les lettres en majuscule indiquent une différence statistique entre conditions azotées, à l'intérieur d'un géotype et d'une condition d'inoculation ou pour leur moyenne. Les lettres grecques indiquent une différence statistique entre conditions d'inoculation, à l'intérieur d'un géotype et d'une condition azotée ou pour leur moyenne. Une absence de lettre indique une absence de différence statistique pour la comparaison. ND = non déterminé.

Teneur en ion inorganique ($\mu\text{mol} / \text{g MS}$)	5 mM NH_4^+				0.1 mM NO_3^-				5 mM NO_3^-				Moyenne des ions
	H2O		Abra43		H2O		Abra43		H2O		Abra43		
	Col-0	Ler	Col-0	Ler	Col-0	Ler	Col-0	Ler	Col-0	Ler	Col-0	Ler	
Fluore	27.27 ± 4.22 (B)	32.64 ± 5.07 (AB)	31.64 ± 1.09 (B)	29.07 ± 7.31	41.79 ± 4.69 (A)	43.59 ± 4.99 (A)	33.33 ± 4.92 (B)	37.58 ± 2.75	21.98 ± 2.16 (B, β)	23.75 ± 0.14 (B, β)	48.26 ± 9.23 (A, α)	41.15 ± 1.04 (α)	34.34 ± 1.75 (c')
Chlorure	611.63 ± 79.54 (A)	714.64 ± 39.26 (A, α)	426.59 ± 99.08 (a, A)	235.27 ± 103.24 (b, β)	366.52 ± 79.95 (B)	263.40 ± 90.48 (B)	221.15 ± 74.46 (B)	255.99 ± 27.77	65.89 ± 8.91 (C)	42.81 ± 3.50 (C)	121.52 ± 5.59 (B)	69.97 ± 2.74	282.95 ± 37.93 (a')
Nitrate	6.60 ± 0.93 (B)	17.35 ± 2.46 (B)	5.24 ± 0.44 (B)	12.43 ± 2.52 (B)	15.21 ± 0.36 (B)	43.19 ± 24.38 (B)	53.16 ± 48.05 (B)	42.43 ± 36.10 (B)	978.49 ± 193.70 (A, α)	1036.22 ± 86.52 (A, α)	613.76 ± 51.70 (A, β)	441.35 ± 131.19 (A, β)	272.12 ± 66.54 (a')
Sulfate	58.93 ± 3.84 (B)	110.66 ± 23.28	52.13 ± 18.41 (B)	32.00 ± 15.81 (B)	175.75 ± 37.45 (A)	138.14 ± 51.26	186.46 ± 46.65 (A)	157.89 ± 41.30 (A)	159.88 ± 20.09 (A)	122.21 ± 3.00	188.83 ± 3.15 (A)	141.60 ± 10.98 (A)	127.04 ± 11.01 (b')
Phosphate	97.78 ± 13.31	90.71 ± 4.82	98.46 ± 60.54	62.28 ± 29.05	110.47 ± 10.41	42.99 ± 13.24	175.11 ± 19.36 (a)	93.43 ± 22.48 (b)	76.70 ± 11.43	33.51 ± 2.53	100.40 ± 50.23	41.97 ± 5.26	85.32 ± 8.92 (bc')
Ammonium	58.58 ± 3.99 (b, A, β)	128.36 ± 8.82 (a, A, α)	92.01 ± 13.61 (a, A, α)	37.03 ± 8.20 (b, A, β)	15.76 ± 11.27 (B)	7.23 ± 3.67 (B)	15.88 ± 6.42 (B)	12.91 ± 4.17 (B)	8.39 ± 1.73 (B)	10.39 ± 1.94 (B)	13.08 ± 2.01 (B)	12.83 ± 1.20 (B)	34.29 ± 6.61 (c')
	Moyenne pour Col-0				Moyenne pour Ler								
Fluore	34.05 ± 2.75				34.63 ± 2.24								
Chlorure	302.22 ± 51.14				263.68 ± 57.13								
Nitrate	278.74 ± 96.82				265.50 ± 94.09								
Sulfate	137.00 ± 16.91				117.08 ± 14.19								
Phosphate	109.82 ± 13.89 (a)				60.82 ± 8.01 (b)								
Ammonium	33.95 ± 7.97				34.79 ± 10.87								
	Moyenne pour 5 mM NH_4^+				Moyenne pour 0.1 mM NO_3^-				Moyenne pour 5 mM NO_3^-				
Fluore	30.16 ± 2.21 (B)				39.07 ± 2.24 (A)				33.79 ± 3.95 (AB)				
Chlorure	497.03 ± 65.83 (A)				276.77 ± 34.89 (B)				75.05 ± 9.01 (C)				
Nitrate	10.41 ± 38.50 (B)				38.50 ± 14.47 (B)				767.45 ± 92.51 (A)				
Sulfate	63.43 ± 11.34 (B)				164.56 ± 19.76 (A)				153.13 ± 8.91 (A)				
Phosphate	87.31 ± 15.29 (AB)				105.50 ± 15.99 (A)				63.15 ± 13.71 (B)				
Ammonium	78.99 ± 10.89 (A)				12.95 ± 3.19 (B)				11.17 ± 0.94 (B)				
	Moyenne pour H2O				Moyenne pour Abra43								
Fluore	31.84 ± 2.45				36.84 ± 2.41								
Chlorure	344.15 ± 64.86 (α)				221.75 ± 35.71 (β)								
Nitrate	349.51 ± 116.82 (α)				194.73 ± 62.29 (β)								
Sulfate	127.59 ± 13.47				126.49 ± 17.81								
Phosphate	75.36 ± 7.68				95.27 ± 16.03								
Ammonium	38.12 ± 10.91				30.62 ± 7.56								
	Effet Azote (N)		Effet Inoculation (I)		Effet Génotype (G)		Effet N x I		Effet N x G		Effet I x G		Effet N x I x G
Fluore	0.043 *		0.079		0.832		6.248e-4 ***		0.685		0.388		0.648
Chlorure	1.087e-8 ***		2.973e-3 **		0.308		1.307e-3 **		0.994		0.414		0.075
Nitrate	1.579e-13 ***		1.70e-3 **		0.765		1.036e-4 ***		0.778		0.310		0.533
Sulfate	5.126e-5 ***		0.947		0.235		0.213		0.312		0.467		0.578
Phosphate	0.101		0.209		4.051e-3 **		0.186		0.388		0.533		0.976
Ammonium	1.17e-13 ***		0.215		0.857		0.014 *		0.093		1.323e-4 ***		7.586e-7 ***

IV.3.3.3. Teneurs en ions inorganiques dans les plantules

Les teneurs en ions inorganiques (en $\mu\text{mol} / \text{g MS}$) sont présentées dans le tableau 10. Les ions les plus présents dans les plantules sont le nitrate et le chlorure, suivis du sulfate.

La teneur en fluorure dépend d'un effet global N, l'ion étant moins abondant en présence de 5 mM NH_4^+ (en moyenne 30,16 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$) qu'en présence de 0,1 mM NO_3^- (en moyenne 39,07 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$), et de l'interaction N x I, l'inoculation ayant un effet positif sur les teneurs en fluorure en condition 5 mM NO_3^- .

La teneur en chlorure dépend des effets globaux N et I, ainsi que de l'interaction N x I. En effet, les milieux azotés influent énormément sur l'abondance du chlorure, qui est en moyenne de 497,03 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ en condition 5 mM NH_4^+ , de 267,77 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ en condition 0,1 mM NO_3^- et de 75,05 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ en condition 5 mM NO_3^- . L'inoculation a une influence globalement négative sur la présence de chlorure, et en particulier chez les plantules *Ler* cultivées sous milieu 5 mM NH_4^+ .

Concernant le nitrate, ses teneurs sont influencées par les effets globaux N, I et par l'interaction entre ces deux effets. La teneur en nitrate est plus élevée en condition 5 mM NO_3^- (en moyenne 767,45 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$) que dans les deux autres conditions de milieu (respectivement et en moyenne 10,41 et 38,50 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ pour 5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^-). Enfin, l'inoculation par le champignon provoque une baisse de la teneur en nitrate dans les plantules cultivées dans la condition azotée la plus riche, 5 mM NO_3^- .

Le sulfate n'est influencé que par l'effet de N, sa teneur étant plus faible en condition NH_4^+ (63,43 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ en moyenne) que dans les deux conditions NO_3^- (164,56 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ pour 0,1 mM et 153,13 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ pour 5 mM, en moyenne).

Seul le génotype affecte la teneur en phosphate observée, les plantules Col-0 étant en moyenne plus riches en phosphate que les plantules *Ler* (109,82 vs 60,82 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ en moyenne, respectivement).

Enfin, les teneurs en ammonium des plantules sont influencées par l'effet global N et par les interactions N x I, I x G et N x I x G. Pour ce qui est de l'effet N, les plantules cultivées en présence de 5 mM NH_4^+ sont les plus riches en ammonium, avec en moyenne 78,99 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ contre 12,95 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ pour 0,1 mM NO_3^- et 11,17 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ pour 5 mM NO_3^- . Pour ce qui est des interactions, elles s'observent au sein de la condition NH_4^+ , pour laquelle les teneurs en ammonium chez les plantules inoculées sont plus élevées pour le génotype Col-0, et moines élevées pour le génotype *Ler*.

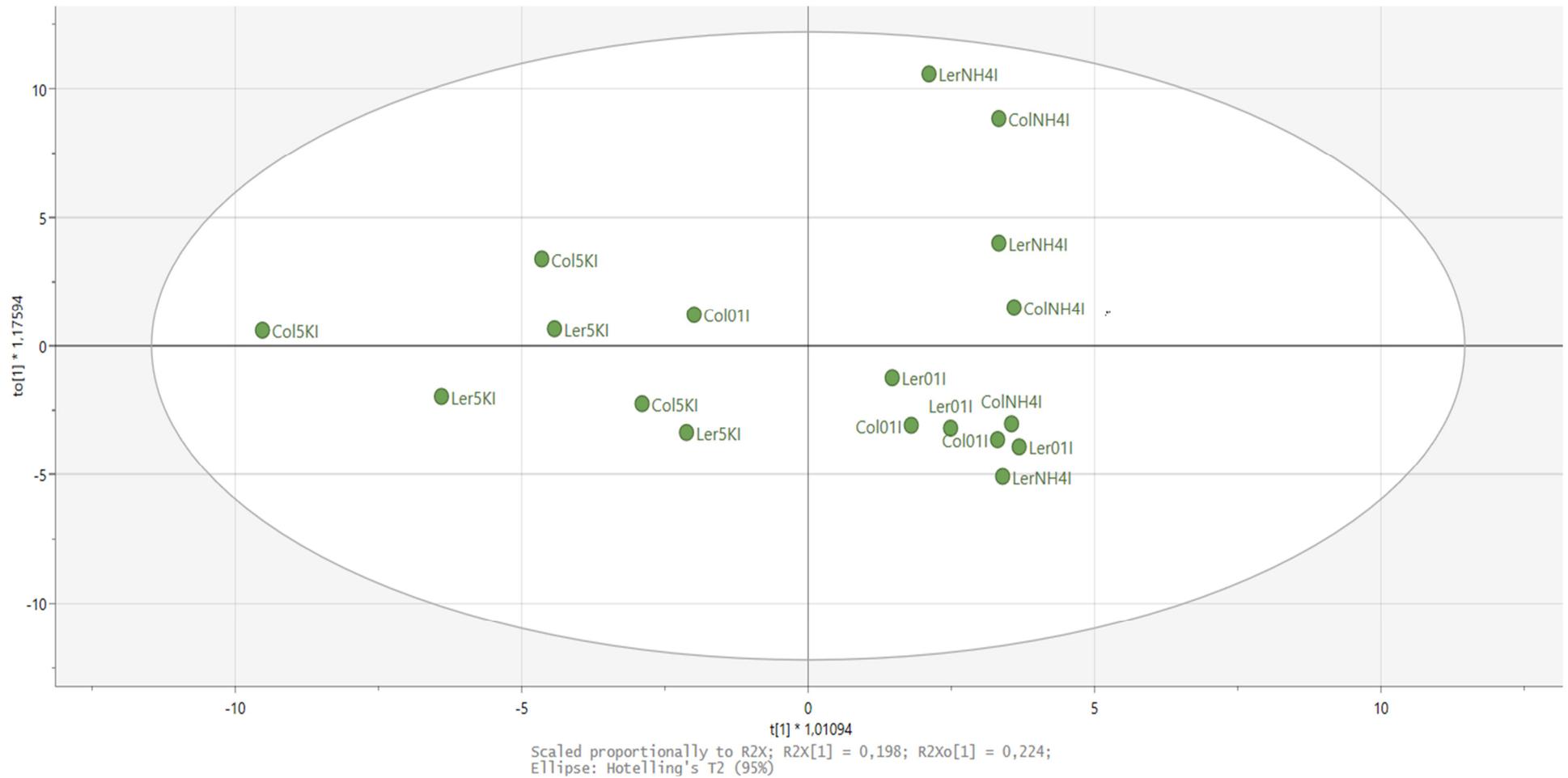


Figure 4 : OPLS (Orthogonal Projections to Latent Structures) des teneurs en métabolites (AA, AO, sucres, polyamines, ions) dans les plantules. L'axe horizontal discrimine les échantillons en fonction de l'impact quantitatif du champignon (en %) sur les plantules correspondant à chaque échantillon. L'axe vertical explique quant à lui une autre part de la variance entre les échantillons. Chaque point représente un échantillon, correspondant au dosage des métabolites dans une condition de génotype, d'inoculation et de nutrition azotée.

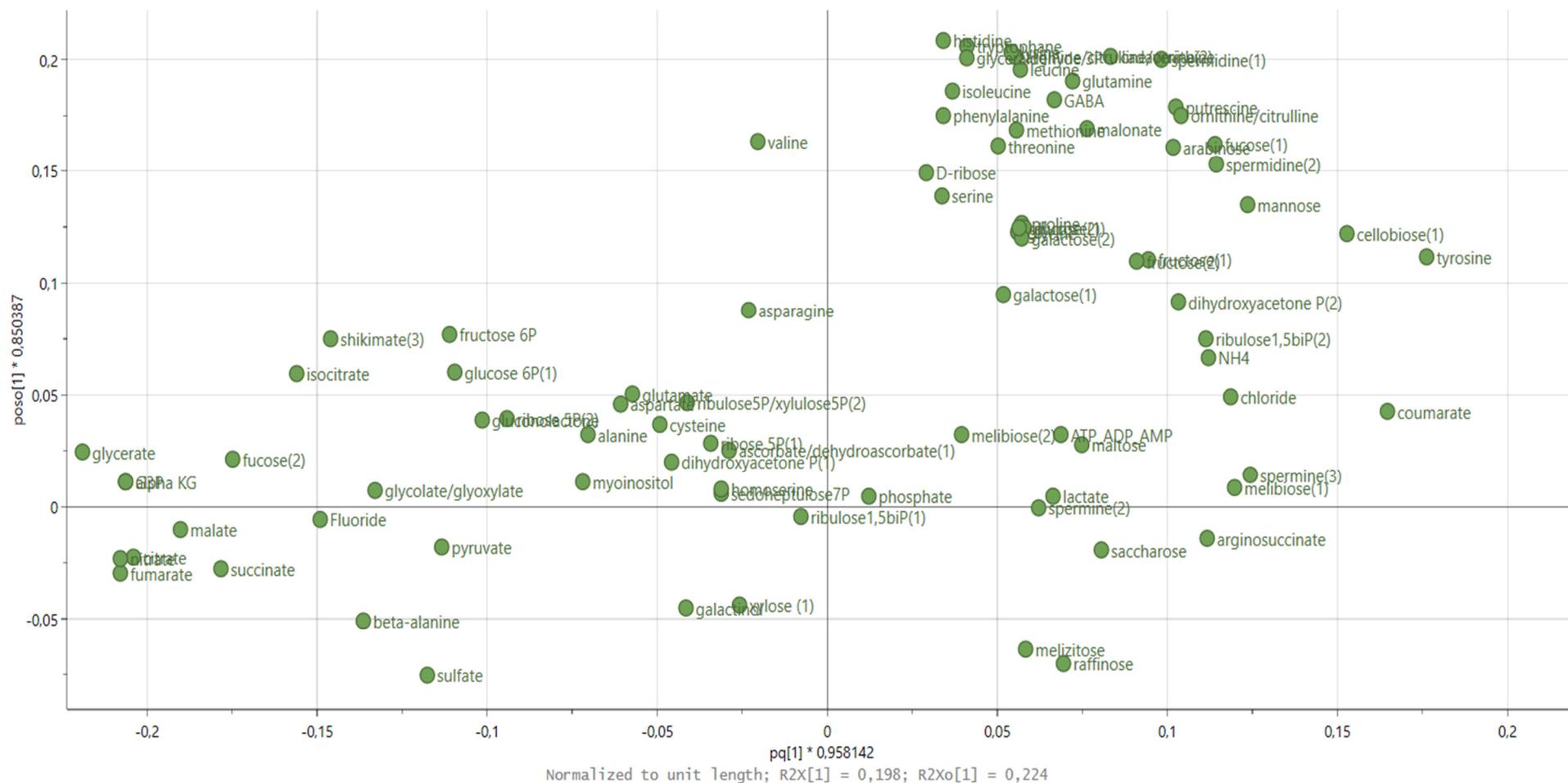


Figure 5 : OPLS (Orthogonal Projections to Latent Structures) présentée en Figure 4, représentant la structuration de chaque métabolites chez les plantules. L'axe horizontal discrimine les échantillons en fonction de l'impact quantitatif du champignon (en %) sur les plantules correspondant à chaque échantillon. L'axe vertical explique quant à lui une autre part de la variance entre les échantillons. Les numéros après les noms des métabolites (par exemple fucose (1)) correspondent à différents produits de dérivation associés à la même molécule.

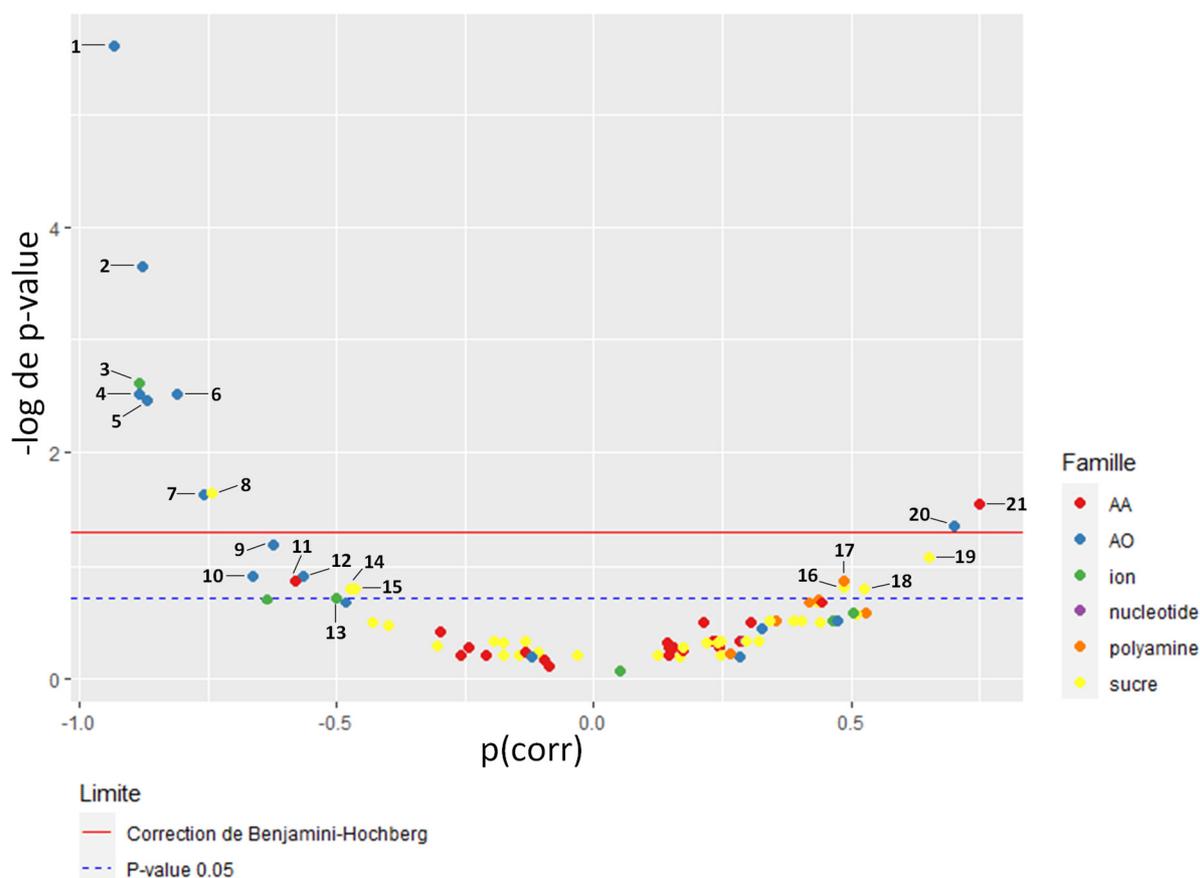


Figure 6 : Volcano plot représentant la corrélation entre chaque métabolite dosé et l'impact du champignon sur les plantules. Chaque point correspond à un métabolite. L'abscisse correspond au poids dans la corrélation de chaque métabolite, plus la valeur est positive et plus le métabolite est lié à un impact du champignon important, et inversement pour les valeurs négatives. L'ordonnée correspond à $-\log$ de la p -value de la régression linéaire de l'impact du champignon (HAI) et de la teneur d'un métabolite donné dans chaque condition expérimentale, pour chaque métabolite. Ainsi, plus la teneur d'un métabolite est significativement corrélée à l'impact du champignon et plus celui-ci sera positionné haut sur le graphique du volcano plot. La ligne bleu en pointillée correspond à $-\log$ de la p -value pour le seuil $\alpha = 5\%$ et la ligne rouge à cette même p -value après correction par la méthode de Benjamini et Hochberg. Les teneurs des métabolites dont les points sont situés au-dessus de ces lignes sont considérées significativement corrélées à l'impact du champignon, et inversement pour les métabolites en dessous des lignes. Liste des métabolites significatifs : 1. glycérate ; 2. fumarate ; 3. nitrate ; 4. alpha-cétoglutarate ; 5. citrate ; 6. malate ; 7. succinate ; 8. fucose (2) ; 9. shikimate ; 10. isocitrate ; 11. beta-alanine ; 12. glycolate / glyxolate ; 13. sulfate ; 14. fructose-6-phosphate ; 15. glucose-6-phosphate ; 16. fucose (1) ; 17. spermidine ; 18. mannose ; 19. cellobiose ; 20. coumarate ; 21. tyrosine. Les numéros après les noms des métabolites (par exemple fucose (1)) correspondent à différents produits de dérivation associés à la même molécule.

IV.3.3.4. Corrélacion entre l'impact du champignon sur les plantules et les teneurs en métabolites

Une analyse multivariée supervisée de type OPLS a été effectuée (Fig. 4). L'axe 1 (horizontal) défini par l'utilisateur correspond ici à l'impact quantitatif du champignon (HAI en %) sur les plantules, la discrimination sur l'axe 1 se faisant ainsi par rapport à cet indice d'impact. La répartition des échantillons sur les deux axes permet de voir sur la gauche de l'axe 1 les échantillons des plantules les moins sensibles au champignon (ici celles en condition 5 mM NO_3^- majoritairement) et sur la droite de l'axe 1 les échantillons des plantules les plus sensibles (5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^- dans notre cas). L'axe 2 (vertical) explique quant à lui une autre part de la variance entre les échantillons et permet de séparer grossièrement les échantillons correspondant aux plantules cultivées en présence de 5 mM NH_4^+ et en présence de 0,1 mM NO_3^- . En plus des échantillons, cette modélisation permet également de répartir les différents métabolites en fonction de l'axe 1 (et donc de l'impact du champignon ; Fig. 5), et d'obtenir le poids dans la corrélation $p(\text{corr})$ de chaque métabolite. Ce $p(\text{corr})$ a été ensuite utilisé en abscisse du volcano plot permettant la représentation de la significativité de la corrélation entre teneurs en métabolites et impact du champignon (Fig. 6). Cette significativité est représentée par l'ordonnée du volcano plot : plus la teneur d'un métabolite est significativement corrélée à l'impact du champignon et plus celui-ci sera positionné haut sur le graphique du volcano plot.

Les métabolites au-dessus de la ligne rouge sont significativement corrélés aux symptômes après correction de la p -value par la méthode de Benjamini et Hochberg (Fig. 6). Les métabolites dont la teneur est significativement négativement corrélée à l'impact du champignon sont essentiellement des AO (le glycérate, le fumarate, l'alpha-cétooglutarate, le citrate, le malate et le succinate), ainsi que le nitrate et le fucose (2). Au contraire, les teneurs en tyrosine et coumarate sont significativement positivement corrélées à l'impact du champignon. Sans correction de la valeur de p -value (ligne bleue pointillée), des métabolites supplémentaires (situés entre la ligne bleue pointillée et la ligne rouge sur la figure 6) ont des teneurs significativement corrélées avec l'impact du champignon : les teneurs en glycolate/glyxolate, shikimate, fructose-6-phosphate, glucose-6-phosphate, la beta-alanine, l'isocitrate et le sulfate sont corrélées négativement, et le mannose, le cellobiose, le fucose (1) et la spermidine sont corrélés positivement.

Polyamines in higher plants

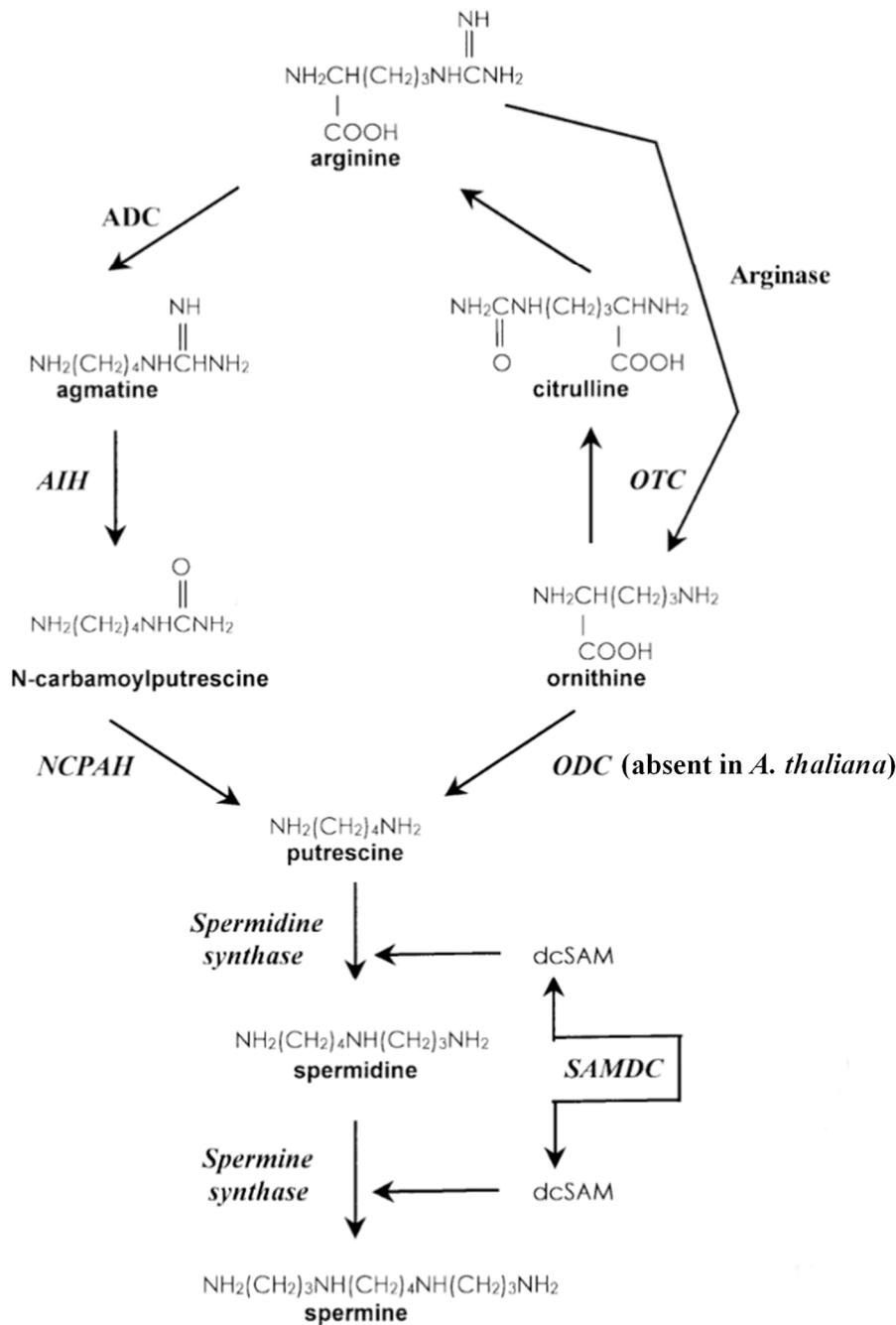


Figure 7 : Voie de biosynthèse des polyamines (Put, Spd, Spm) chez les plantes. (adapté de Bagni & Tassoni, 2001).

ADC = arginine décarboxylase ; AIH = agmatine iminohydrolase ; dcSAM = S- adénylméthionine décarboxylée ; NCPAH = N-carbamoylputrescine amidohydrolase ; OTC = ornithine transcarbamoylase ; SAMDC = S- adénylméthionine décarboxylase.

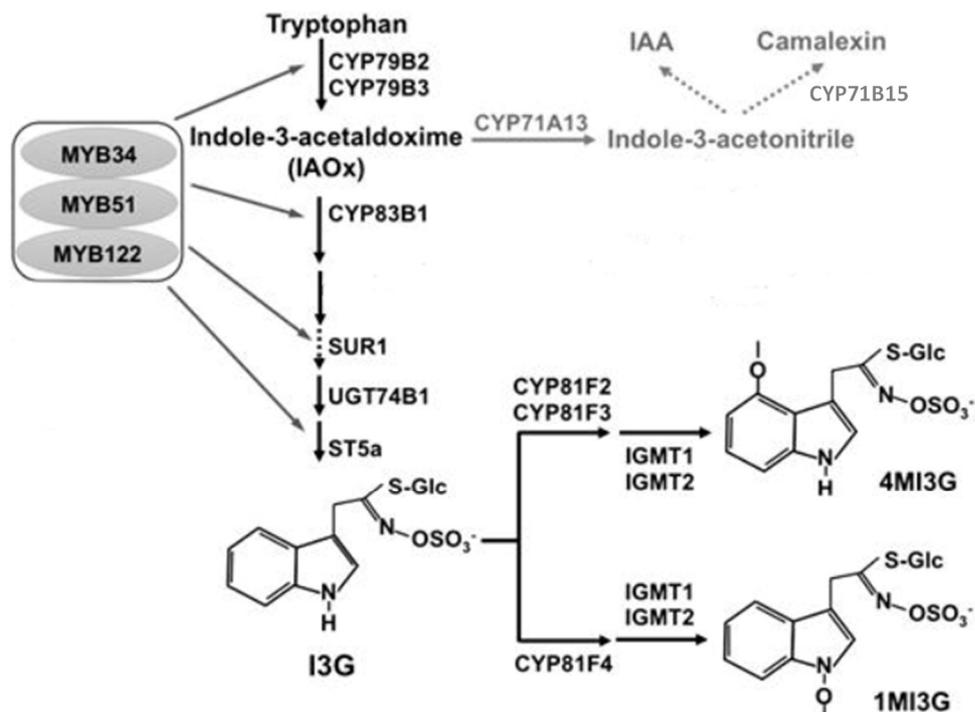


Figure 8 : Voie de biosynthèse des glucosinolates indoliques et de la camalexine. (adapté de Xu *et al.*, 2016)

I3G = 3-indolylméthyl glucosinolate ; 4MI3G = 4-méthoxy-3-indolylméthyl glucosinolate ; 1MI3G = 1-méthoxy-3-indolylméthyl glucosinolate.

Tableau 11 : Effet de l'inoculation sur l'expression de gènes de défense, des voies de synthèse et de dégradation des composés de défense dérivant du tryptophane, des polyamines et de transporteurs de N en fonction du milieu azoté et du génotype, 14 JAI. Les valeurs correspondent au Log2 du ratio de l'expression en condition Abra43 / H₂O, un ratio positif indiquant une expression plus importante en condition Abra43 et un ratio négatif le contraire. Une couleur rouge représente une différence significative entre les deux conditions dans le cas d'un ratio positif. Une couleur verte représente une différence significative entre les deux conditions dans le cas d'un ratio négatif. Une couleur noire représente une absence de différence significative. Significativité de P : $0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05$.

Gène	Effet Inoculation					
	5 mM NH ₄ ⁺		0,1 mM NO ₃ ⁻		5 mM NO ₃ ⁻	
	Col-0	Ler	Col-0	Ler	Col-0	Ler
	Abra43/H ₂ O	Abra43/H ₂ O	Abra43/H ₂ O	Abra43/H ₂ O	Abra43/H ₂ O	Abra43/H ₂ O
log2 du ratio						
Gènes de défense						
<i>PDF1.2</i>	8.70	5.20	2.85	2.98	9.66	9.34
<i>PR1</i>	9.04	8.55	6.00	3.96	7.92	9.43
Synthèse des composés de défense dérivant du tryptophane						
<i>CYP79B2</i>	3.41	3.28	3.34	3.74	3.81	4.00
<i>CYP71B15</i>	4.64	6.84	3.53	5.83	8.01	9.57
<i>CYP83B1</i>	0.07	0.84	0.37	0.30	2.30	2.80
<i>MYB51</i>	2.37	2.54	0.73	0.23	2.14	3.25
<i>ST5A</i>	2.61	2.45	1.05	1.03	1.87	2.07
<i>CYP81F2</i>	4.53	4.89	2.74	1.62	3.22	4.72
Myrosinases						
<i>TGG1</i>	-3.04	-1.57	-1.29	-2.01	0.22	-0.38
<i>TGG2</i>	-6.07	1.43	-5.33	2.43	0.59	0.42
Synthèse des polyamines						
<i>ADC1</i>	2.17	1.38	0.23	0.98	0.80	0.42
<i>ADC2</i>	0.29	0.80	0.56	2.33	1.61	1.62
<i>SPDS1</i>	-2.44	-1.42	-0.63	-0.10	0.06	0.09
<i>SPDS2</i>	-1.78	-1.01	-0.79	-0.51	-0.56	-0.26
<i>ACL5</i>	-3.07	-2.24	-1.57	-0.47	-0.62	-0.35
<i>SPMS</i>	-0.04	0.42	0.58	1.34	0.46	0.46
Oxydation des polyamines						
<i>PAO1</i>	1.71	1.69	-0.15	1.74	0.21	0.36
<i>PAO3</i>	-0.20	0.56	-0.15	0.19	0.55	-0.43
<i>PAO4</i>	1.08	0.45	-0.32	0.36	0.56	0.20
Transporteurs de N						
<i>NPF6.3</i>	-5.09	-3.28	-2.81	-1.11	0.66	-0.50
<i>AMT1.1</i>	-4.69	-2.79	-2.64	-1.15	0.68	0.04
<i>AMT2.1</i>	-0.29	0.44	-1.67	-1.02	-0.32	-2.19

Ratio positif	*	**	***	Significativité de la comparaison
Ratio négatif	*	**	***	
				Pas d'effet significatif

IV.3.4. Analyse de l'expression de gènes du métabolisme d'*A. thaliana* et d'*A. brassicicola* en lien avec les résultats de dosages métaboliques

L'expression de plusieurs gènes de plante et de champignon a été analysée afin de compléter l'étude des métabolites et d'expliquer les différences d'accumulation majeures observées en lien avec la sensibilité des plantules au champignon. Les polyamines et leurs précurseurs étant ressortis fortement de l'analyse métabolique (Figures 3 et 6), il a été décidé d'étudier l'expression des gènes de leur voie de synthèse (de la synthèse de la putrescine à celle de la spermine ; Fig. 7) ainsi que ceux responsables de leur oxydation, une étape importante pour leur rôle dans les interactions entre plante et pathogène. Le tryptophane est un autre métabolite important mis en évidence par l'étude du métabolisme, étant un précurseur à la synthèse de molécules très importantes pour la défense d'*A. thaliana*, comme les GLS indoliques et la camalexine (Fig. 8). Des gènes impliqués dans la synthèse de ces composés ont donc été choisis, ainsi que des gènes de myrosinases, responsables de l'hydrolyse des GLS nécessaire à leur rôle dans les défenses. En plus de ces gènes, les gènes *PDF1.2* et *PRI*, respectivement marqueurs des voies de défense de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique ont été étudiés pour estimer les réponses de défense des plantules. Enfin, l'expression d'un transporteur de NO_3^- , *NPF6.3*, ainsi que de deux transporteurs de NH_4^+ , *AMT1.1* et *AMT2.1*, a été étudiée, les transporteurs de N étant connus pour leur rôle et dans la nutrition azotée des plantes et dans les défenses de celles-ci.

Les résultats sont présentés dans des tableaux récapitulatifs regroupant toutes les comparaisons et les effets significatifs. Le Tableau 11 correspond à l'effet de l'inoculation sur l'expression des gènes, le Tableau 12 à l'effet du milieu azoté et le Tableau 13 à l'effet du génotype. Chacune des cases des tableaux contient le \log_2 du ratio de la comparaison étudiée et une couleur : rouge quand la comparaison est significative statistiquement et le ratio positif, vert quand la comparaison est significative statistiquement et le ratio négatif, et noir quand la comparaison n'est pas significative statistiquement.

En plus des gènes de plante, l'expression de gènes d'*A. brassicicola* a été étudiée, en utilisant les mêmes échantillons que les études métaboliques et d'expression des gènes de plante. Deux gènes du métabolisme de l'azote (*AB05765.1* qui code pour la nitrite réductase, et *AREA* qui est potentiellement impliqué dans la régulation de l'utilisation de l'azote par le champignon), deux gènes de transporteurs de N (un transporteur de NO_3^- , *AB08716.1*, et un transporteur de NH_4^+ , *AB09447.1*), ainsi que deux gènes liés à la pathogénicité (codant pour une glutathion transférase (*GST1*) et pour la chymotrypsine) ont été choisis. Les glutathion transférases (GST) sont une famille de protéines impliquées dans la résistance aux stress, notamment causés par les défenses de la plante. Le gène de la chymotrypsine, codant pour une enzyme hydrolytique, est fortement surexprimé en condition d'inoculation.

Tableau 12 : Effet du milieu azoté sur l'expression de gènes de défense, des voies de synthèse et de dégradation des composés de défense dérivant du tryptophane, des polyamines et de transporteurs de N en fonction du génotype et de l'inoculation, 14 JAI. Les valeurs correspondent au Log2 du ratio de l'expression en condition (i) 0,1 mM NO₃⁻ / 5 mM NH₄⁺ pour les quatre premières colonnes, (ii) 5 mM NO₃⁻ / 0,1 mM NO₃⁻ pour les quatre suivantes et (iii) 5 mM NO₃⁻ / 5 mM NH₄⁺ pour les quatre dernières, un ratio positif indiquant une expression plus importante du dividende et un ratio négatif le contraire. Une couleur rouge représente une différence significative entre les deux conditions dans le cas d'un ratio positif. Une couleur verte représente une différence significative entre les deux conditions dans le cas d'un ratio négatif. Une couleur noire représente une absence de différence significative. Significativité de P : 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05.

Gène	Effet Azote											
	0,1 mM NO ₃ ⁻ / 5 mM NH ₄ ⁺				5 mM NO ₃ ⁻ / 0,1 mM NO ₃ ⁻				5 mM NO ₃ ⁻ / 5 mM NH ₄ ⁺			
	Col-0		Ler		Col-0		Ler		Col-0		Ler	
	H2O	Abra43	H2O	Abra43	H2O	Abra43	H2O	Abra43	H2O	Abra43	H2O	Abra43
	log2 du ratio											
	Gènes de défense											
<i>PDF1.2</i>	3.74	-2.11	3.83	1.61	0.12	6.93	-3.12	3.24	3.86	4.82	0.71	4.85
<i>PR1</i>	3.44	0.39	4.37	-0.21	-4.98	-3.05	-3.49	1.98	-1.54	-2.66	0.88	1.76
	Synthèse des composés de défense dérivant du tryptophane											
<i>CYP79B2</i>	0.21	0.14	0.71	1.17	-3.05	-2.58	-2.24	-1.98	-2.84	-2.44	-1.54	-0.82
<i>CYP71B15</i>	1.21	0.10	2.73	1.71	-5.97	-1.49	-3.73	0.00	-4.76	-1.40	-1.01	1.72
<i>CYP83B1</i>	0.51	0.81	1.07	0.54	-2.27	-0.34	-2.56	-0.06	-1.76	0.48	-1.49	0.48
<i>MYB51</i>	1.48	-0.16	3.19	0.88	-2.45	-1.04	-4.03	-1.00	-0.97	-1.20	-0.83	-0.12
<i>ST5A</i>	0.13	-1.43	0.48	-0.94	-1.80	-0.98	-1.90	-0.87	-1.67	-2.41	-1.42	-1.80
<i>CYP81F2</i>	1.45	-0.34	4.20	0.94	-2.58	-2.09	-5.69	-2.60	-1.12	-2.43	-1.49	-1.66
	Myrosinases											
<i>TGG1</i>	-1.43	0.32	0.63	0.19	1.45	2.96	1.89	3.53	0.01	3.28	2.52	3.71
<i>TGG2</i>	-2.05	-1.31	1.46	2.45	2.38	8.30	2.33	0.33	0.33	6.99	3.79	2.78
	Synthèse des polyamines											
<i>ADC1</i>	0.96	-0.98	0.86	0.45	-0.84	-0.28	-0.47	-1.03	0.11	-1.26	0.39	-0.57
<i>ADC2</i>	-1.90	-1.62	-1.87	-0.35	-1.78	-0.73	-1.13	-1.84	-3.68	-2.36	-3.01	-2.18
<i>SPDS1</i>	-0.17	1.64	-0.21	1.11	-0.25	0.43	-0.07	0.12	-0.42	2.07	-0.28	1.23
<i>SPDS2</i>	-0.37	0.62	0.04	0.54	0.51	0.74	0.40	0.65	0.14	1.36	0.44	1.19
<i>ACL5</i>	-0.19	1.30	0.05	1.82	0.57	1.53	1.04	1.16	0.38	2.83	1.09	2.98
<i>SPMS</i>	0.90	1.52	1.85	2.77	-1.63	-1.75	-0.81	-1.69	-0.73	-0.23	1.05	1.09
	Oxydation des polyamines											
<i>PAO1</i>	1.28	-0.58	1.23	1.29	-1.15	-0.80	0.00	-1.37	0.13	-1.38	1.24	-0.08
<i>PAO3</i>	0.80	0.85	0.94	0.57	-1.29	-0.59	-0.31	-0.94	-0.49	0.26	0.63	-0.36
<i>PAO4</i>	0.91	-0.49	0.44	0.35	-1.96	-1.07	-1.19	-1.35	-1.05	-1.57	-0.75	-1.00
	Transporteurs de N											
<i>NPF6.3</i>	-0.35	1.93	0.26	2.43	-1.69	1.78	-1.12	-0.51	-2.04	3.71	-0.86	1.92
<i>AMT1.1</i>	-0.22	1.84	0.76	2.40	-1.72	1.60	-1.52	-0.34	-1.94	3.43	-0.77	2.07
<i>AMT2.1</i>	0.48	-0.91	3.03	1.57	-2.12	-0.76	-0.40	-1.58	-1.64	-1.68	2.63	-0.01

Ratio positif	*	**	***	Significativité de la comparaison
Ratio négatif	*	**	***	
				Pas d'effet significatif

IV.3.4.1. Analyse de l'expression des gènes de défense *PDF1.2* et *PRI*

L'inoculation affecte l'expression de *PDF1.2* et *PRI* dans les plantules, qui augmente très fortement en présence du champignon, dans toutes les conditions de génotype et de milieu (Tableau 11). Le milieu azoté a également un impact sur l'expression de ces gènes (Tableau 12). L'expression de *PDF1.2* est plus élevée dans le milieu 0,1 mM NO₃⁻ pour la double condition H₂O - *Ler*, et dans le milieu 5 mM NO₃⁻ en condition *Abra43* pour les deux génotypes. Ces résultats sont observés également pour le gène *PRI*, à l'exception de la double condition *Abra43* - *Col-0*, pour laquelle l'expression du gène est plus faible dans le milieu 5 mM NO₃⁻ que dans les autres. Enfin, un effet génotype très important existe pour *PDF1.2*, qui est surexprimé chez *Col-0* dans toutes les conditions (Tableau 13).

IV.3.4.2. Analyse de l'expression des gènes liés aux composés de défense dérivant du tryptophane

La Figure 8 présente les voies métaboliques partant du tryptophane pour aboutir à la synthèse de camalexine et de GLS indoliques, ainsi que la place des gènes étudiés dans ces voies. *CYP79B2* permet la réalisation de la première étape de la voie de la biosynthèse des GLS indoliques et de la camalexine. *CYP71B15* effectue la dernière étape de la formation de la camalexine. *CYP83B1*, *ST5A* et *CYP81F2* sont impliquées dans la voie de biosynthèse des GLS indoliques. Enfin, *MYB51* est un facteur de transcription régulant l'ensemble de cette voie de biosynthèse.

Globalement les gènes liés aux composés de défense dérivant du tryptophane sont plus fortement exprimés en présence du champignon (Tableau 11). En effet, l'expression de *CYP79B2*, *CYP71B15*, *ST5A* et *CYP81F2* augmente en présence du champignon quels que soient le génotype et le milieu. L'expression de *MYB51*, augmente en présence du champignon dans les conditions 5 mM NO₃⁻ et 5 mM NH₄⁺. Enfin, l'expression de *CYP83B1* augmente dans les plantules inoculées cultivées sous milieu 5 mM NO₃⁻ et dans la double condition *Col-0* - 0,1 mM NO₃⁻. Un effet global de la condition azotée sur l'expression de ces gènes est également observé, ces gènes étant en général moins exprimés en condition 5 mM NO₃⁻ que dans les 2 autres milieux, malgré l'existence de quelques comparaisons individuelles non significatives statistiquement (Tableau 12). Cet effet global est particulièrement notable en condition d'inoculation H₂O, où 22 comparaisons individuelles sur 24 sont significatives. Concernant l'effet génotypique sur l'expression de ces gènes, aucune tendance ne semble se dégager malgré l'existence de différences significatives entre comparaisons individuelles (Tableau 13).

Les gènes *TGG1* et *TGG2* codent des myrosinases qui ont pour rôle d'hydrolyser les GLS, permettant ainsi l'activation de leur toxicité vis-à-vis des pathogènes. L'inoculation par *A. brassicicola* a un effet sur l'expression de *TGG1*, réduisant celle-ci en condition 0,1 mM NO₃⁻ et 5 mM NH₄⁺. L'expression de *TGG2* est également affectée en présence du champignon dans ces mêmes conditions azotées, diminuant chez les plantules *Col-0* et augmentant chez les plantules *Ler*. Globalement, un effet de N est observé, les deux gènes étant plus exprimés en

Tableau 13 : Effet du génotype sur l'expression de gènes de défense, des voies de synthèse et de dégradation des composés de défense dérivant du tryptophane, des polyamines et de transporteurs de N en fonction du milieu azoté et de l'inoculation, 14 JAI. Les valeurs correspondent au Log2 du ratio de l'expression en condition Col-0 / Ler, un ratio positif indiquant une expression plus importante en condition Col-0 et un ratio négatif le contraire. Une couleur rouge représente une différence significative entre les deux conditions dans le cas d'un ratio positif. Une couleur verte représente une différence significative entre les deux conditions dans le cas d'un ratio négatif. Une couleur noire représente une absence de différence significative. Significativité de P : 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05.

	Effet Génotype					
	5 mM NH4+		0,1 mM NO3-		5 mM NO3-	
	Col-0 / Ler					
	H2O	Abra43	H2O	Abra43	H2O	Abra43
Gène	log2 du ratio					
Gènes de défense						
<i>PDF1.2</i>	4.18	7.67	4.08	3.95	7.32	7.64
<i>PR1</i>	-0.07	0.42	-1.01	1.03	-2.49	-4.00
Synthèse des composés de défense dérivant du tryptophane						
<i>CYP79B2</i>	0.58	0.71	0.08	-0.33	-0.73	-0.92
<i>CYP71B15</i>	3.90	1.70	2.38	0.08	0.15	-1.41
<i>CYP83B1</i>	0.30	-0.47	-0.26	-0.19	0.03	-0.47
<i>MYB51</i>	1.04	0.87	-0.67	-0.17	0.90	-0.21
<i>ST5A</i>	-0.11	0.05	-0.46	-0.44	-0.36	-0.56
<i>CYP81F2</i>	1.30	0.93	-1.45	-0.34	1.67	0.16
Myrosinases						
<i>TGG1</i>	2.43	0.96	0.37	1.10	-0.07	0.53
<i>TGG2</i>	11.45	3.95	7.95	0.19	7.99	8.16
Synthèse des polyamines						
<i>ADC1</i>	-0.18	0.61	-0.08	-0.83	-0.45	-0.08
<i>ADC2</i>	0.01	-0.50	-0.01	-1.78	-0.66	-0.67
<i>SPDS1</i>	-0.18	-1.20	-0.14	-0.67	-0.32	-0.36
<i>SPDS2</i>	0.54	-0.23	0.13	-0.15	0.24	-0.06
<i>ACL5</i>	1.34	0.52	1.10	0.00	0.63	0.36
<i>SPMS</i>	0.96	0.50	0.00	-0.76	-0.82	-0.82
Oxydation des polyamines						
<i>PAO1</i>	0.68	0.71	0.73	-1.16	-0.43	-0.59
<i>PAO3</i>	0.21	-0.55	0.07	-0.27	-0.90	0.08
<i>PAO4</i>	-0.62	0.01	-0.15	-0.83	-0.92	-0.56
Transporteurs de N						
<i>NPF6.3</i>	1.08	-0.73	0.48	-1.23	-0.10	1.06
<i>AMT1.1</i>	1.48	-0.42	0.51	-0.98	0.31	0.95
<i>AMT2.1</i>	2.38	1.65	-0.17	-0.83	-1.89	-0.02

Ratio positif	*	**	***	Significativité de la comparaison
Ratio négatif	*	**	***	
				Pas d'effet significatif

nutrition 5 mM NO₃⁻ (pour 13 comparaisons individuelles sur 16). Enfin, les plantules Col-0 expriment significativement plus *TGG2* que les plantules *Ler*, sauf dans le cas de la double condition Abra43 - 0,1 mM NO₃⁻.

IV.3.4.3. Analyse de l'expression des gènes du métabolisme des polyamines

La voie de biosynthèse des polyamines est présentée en Figure 7. Les gènes *ADC1* et *ADC2* codent l'arginine décarboxylase, permettant la biosynthèse de putrescine à partir d'arginine. La putrescine est ensuite convertie en spermidine par la spermidine synthase (gènes *SPDS1* et *SPDS2*), puis en spermine / thermospermine par la spermine synthase / thermospermine synthase (respectivement, gènes *SPMS* et *ACL5*). L'inoculation des plantules a un effet très variable sur l'expression des différents gènes associées aux voies de synthèse des polyamines (Tableau 11). La présence du champignon induit l'expression des gènes codant l'arginine décarboxylase, pour toutes les conditions dans le cas d'*ADC1* et en condition 5 mM NO₃⁻ et *Ler* - 0,1 mM NO₃⁻ dans le cas d'*ADC2*. Par contre, les gènes codant la spermidine synthase sont sous exprimés en présence du champignon, dans toutes les conditions de génotype et de milieu azoté pour *SPDS2*, et en condition 5 mM NH₄⁺ et Col-0 -0,1 mM NO₃⁻ dans le cas de *SPDS1*. L'expression des deux gènes codant la spermine synthase est différente en présence du champignon. L'expression de *SPMS* est globalement induite par la présence du champignon, en particulier dans le milieu 0,1 mM NO₃⁻ et dans la double condition *Ler* - 5 mM NO₃⁻, alors que c'est l'inverse pour *ACL5* qui est globalement moins exprimé en présence d'*A. brassicicola*, et ce, en particulier pour Col-0 dans tous les milieux et pour *Ler* en condition 5 mM NH₄⁺. Tout comme pour l'inoculation, il n'y a pas d'effet commun du milieu azoté sur tous les gènes de la voie de synthèse des polyamines (Tableau 12). *SPMS* est plus exprimé en condition 0,1 mM NO₃⁻ et *SPDS2* en condition 5 mM NO₃⁻, tandis que *ADC2* est moins exprimé dans cette dernière condition, pour tous les génotypes, en présence comme en absence de champignon. *ACL5* est dans l'ensemble plus exprimé en condition 5 mM NO₃⁻ (pour 6 comparaisons sur 8). *SPDS1*, enfin, est moins exprimé en condition 5 mM NO₃⁻ en absence d'*A. brassicicola*, et plus exprimé dans cette même condition de N en présence d'*A. brassicicola* (à l'exception des comparaisons avec la double condition *Ler* - 0,1 mM NO₃⁻). Malgré un nombre assez conséquent de comparaisons génotypiques individuelles significatives, il est difficile de définir de vraies tendances applicables à l'ensemble des gènes de la voie de biosynthèse des polyamines (Tableau 13). On notera tout de même que *ADC2*, *SPDS1* et *SPMS* sont plus fortement exprimés chez *Ler* que chez Col-0 chez les plantules cultivées en présence de 5 mM NO₃⁻.

Les gènes *PAO1*, *PAO3* et *PAO4* codent des polyamines oxydases, l'oxydation des polyamines étant une étape importante pour leur rôle dans les défenses des plantes. La présence du champignon induit l'expression de ces gènes, même si ce n'est pas le cas dans toutes les conditions. Concernant l'effet du milieu azoté, *PAO1* et *PAO3* sont plus exprimés en condition 0,1 mM NO₃⁻ (pour 13 comparaisons individuelles sur 16), tandis que *PAO4* est moins exprimé en condition 5 mM NO₃⁻. Aucune tendance ne se dégage vraiment entre les deux génotypes.

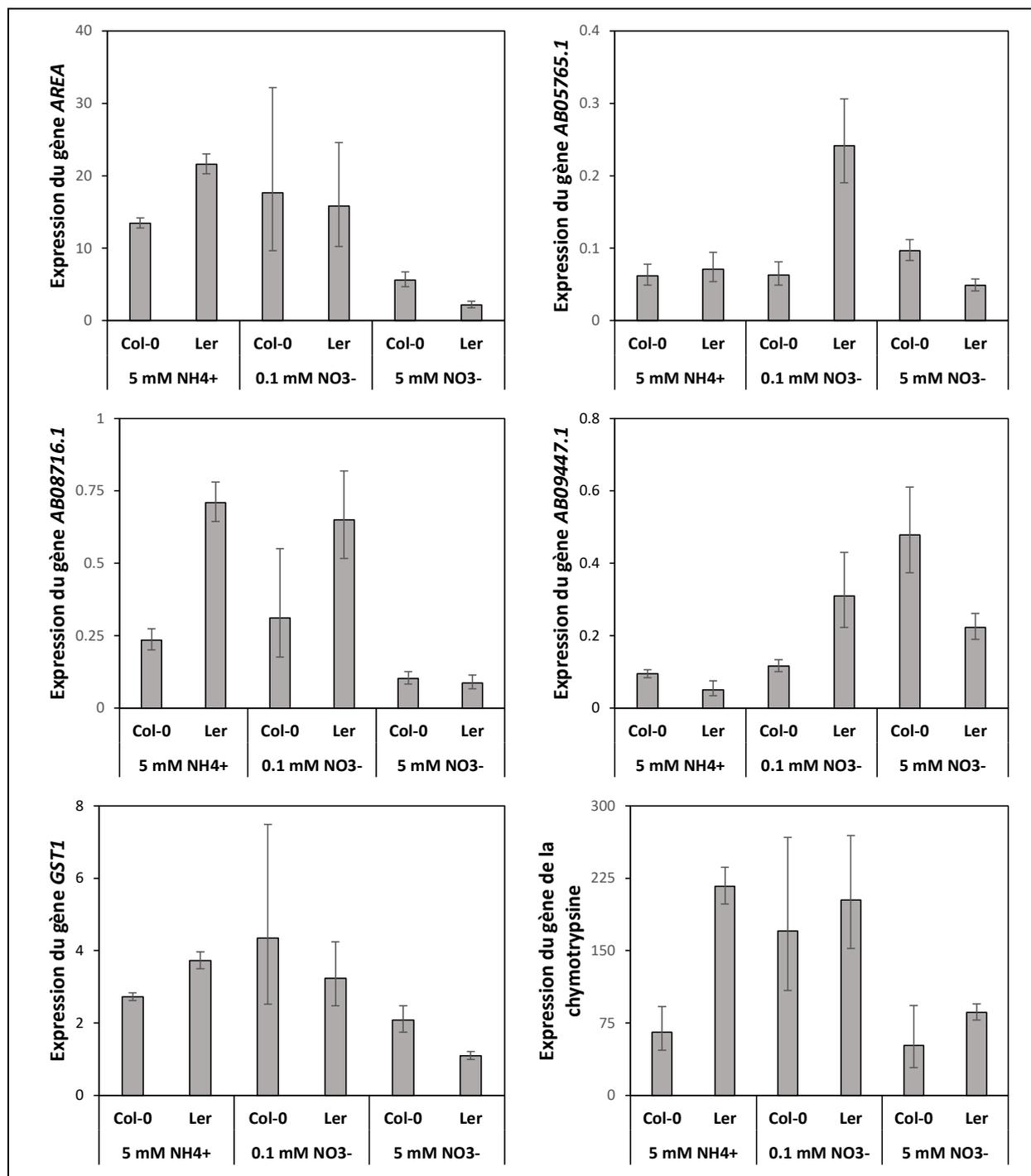


Figure 9 : Expression de gènes d'*A. brassicicola*, associés au métabolisme azoté, au transport de N et à la pathogénicité du champignon. Leur expression a été mesurée au contact des plantules de génotype Col-0 et *Ler* cultivées dans différentes conditions de milieu (5 mM NH₄⁺, 0,1 mM NO₃⁻ ou 5 mM NO₃⁻), 14 JAI. Les niveaux d'ARNm d'*AREA* (a), de *AB05765.1* (b), de *AB08716.1* (c), de *AB09774.1* (d), de *GST1* (e) et de la *chymotrypsine* (f) ont été déterminés par RT-qPCR et normalisés par rapport à l'expression de l'actine et de la tubuline. Les barres d'erreur correspondent au SEM.

IV.3.4.4. Analyse d'expression des gènes de transporteurs d'azote

Les gènes codant pour les transporteurs de N sont en général plus exprimés chez les plantules cultivées en condition H₂O que dans les plantules cultivées en condition Abra43 (Tableau 11). C'est le cas pour *NPF6.3* et *AMT1.1* dans les deux conditions de milieu 5 mM NH₄⁺ et 0,1 mM NO₃⁻, et pour *AMT2.1* mais dans deux comparaisons sur six seulement. Comme pour l'effet de l'inoculation, l'effet de N sur l'expression des gènes est similaire pour *NPF6.3* et *AMT1.1*, ces deux gènes étant plus exprimés en absence de champignon en condition 5 mM NO₃⁻ et moins exprimés chez les plantules Col-0 en présence de champignon (Tableau 12). Dans le cas d'*AMT2.1*, le gène est sous exprimé en condition 5 mM NO₃⁻ pour Col-0 - H₂O, sous exprimé en condition 5 mM NH₄⁺ pour *Ler* - H₂O et surexprimé en condition 5 mM NH₄⁺ pour Col-0 - Abra43. Concernant l'effet du génotype, aucun effet général fort ne se dégage (Tableau 13). Les trois gènes sont plus fortement exprimés chez Col-0 dans la double condition H₂O - 5 mM NH₄⁺, et plus exprimés chez *Ler* dans la double condition Abra43 - 0,1 mM NO₃⁻.

IV.3.4.5. Analyse d'expression des gènes d'*A. brassicicola*

L'expression de tous les gènes d'*A. brassicicola* est significativement affectée par les différentes conditions de milieux (Figure Y). *AB08716.1* (transporteur de NO₃⁻) et *AREA* sont moins exprimés en condition 5 mM NO₃⁻ que dans les deux autres conditions de milieu. *GST1* et le gène codant pour la chymotrypsine sont eux moins exprimés dans la condition 5 mM NO₃⁻ que dans la condition 0,1 mM NO₃⁻. En plus de l'effet du milieu, l'interaction entre génotypes de la plante et milieu azoté est significative pour les deux gènes *AB09447.1* (transporteur de NH₄⁺) et *AB05765.1* (nitrite réductase). L'expression de *AB09447.1* est plus importante chez les plantules Col-0 en condition 5 mM NO₃⁻ et moins importante chez les plantules *Ler* en condition 5 mM NH₄⁺. *AB05765.1* est, quant à lui, plus exprimé chez les plantules *Ler* en condition 0,1 mM NO₃⁻ que dans toutes les autres conditions.

IV.4 Discussion

Comme attendu, les plantules d'*A. thaliana* cultivées en condition 5 mM NO₃⁻ présentent à la fois un développement aérien plus important et une sensibilité à *A. brassicicola* plus réduite que celles cultivées en condition 5 mM NH₄⁺ et 0,1 mM NO₃⁻. Le génotype des plantules a également un impact sur leur sensibilité, les plantes Col-0 étant moins sensibles à *A. brassicicola* que celles de *Ler*. Dans le but d'expliquer les différences de sensibilité des plantules au champignon observées entre génotypes et entre conditions nutritives azotées, un profilage métabolique des plantules a été effectué. Par ailleurs, au stade plantule, la composition métabolique des graines, pré-établie au cours de leur développement, constitue un stock de molécules (N et C entre autres) pouvant être mobilisées. Ces ressources métaboliques initiales pourraient donc contribuer à la synthèse de molécules de défense et / ou à la nutrition du champignon, pouvant limiter ou au contraire stimuler son développement. Les dosages métaboliques ont donc également été effectués à partir des graines, dans le but d'identifier des différences métaboliques pouvant contribuer à expliquer les différences de sensibilité observées au stade plantule entre génotypes.

IV.4.1. La composition des graines de Col-0 et de *Ler* peut-elle expliquer la plus grande sensibilité de *Ler* à *A. brassicicola* ?

L'analyse de la composition métabolique des graines a permis de révéler des différences entre les deux génotypes étudiés. Ces différences sont quantitatives (certains composés présentent des différences d'abondance entre les graines des deux génotypes) ou qualitatives (profils différents comme pour les GLS), et pourraient pour certaines être associées à une différence génotypique de sensibilité au pathogène au stade plantule.

Premièrement, les graines de *Ler* sont plus riches en NO₃⁻ que les graines de Col-0 (Tableau 6). Cette différence suggère que les graines de *Ler* ont accumulé plus de nitrate que celles de Col-0 au cours de leur développement, ce qui pourrait résulter d'une plus faible assimilation de ce métabolite dans les graines. Par ailleurs, même si nous avons montré que pour le pathosystème *A. thaliana* / *A. brassicicola*, l'apport de 5 mM de NO₃⁻ favorise globalement les plantules dans l'interaction (Barrit *et al.*, soumis), la plus forte teneur en NO₃⁻ dans les graines ne semble pas procurer un avantage aux plantules de *Ler* comparativement à celles de Col-0, moins sensibles au pathogène. Concernant les AA, les plus abondants dans les graines de Col-0 et *Ler* sont le glutamate et la proline, suivis de l'alanine, de l'asparagine et de la thréonine (Tableau 4). Les graines de *Ler* sont aussi plus riches en AA que les graines de Col-0, en particulier pour ce qui est de l'alanine, de l'asparagine, du GABA, de la glutamine, de l'isoleucine, de la leucine, de la proline, de la sérine et de la valine. Certains AA plus abondants chez *Ler* que chez Col-0 dans les graines sont connus pour leurs effets dans les interactions entre plantes et champignons.

C'est par exemple le cas de la glutamine, qui augmenterait la résistance de la plante face aux deux champignons hémibiotrophes *Fusarium oxysporum* (Lopez-Berges *et al.*, 2010) et *Magnaporthe oryzae* (Marroquin-Guzman & Wilson, 2015 ; Huang *et al.*, 2017). Des teneurs plus élevées en asparagine pourraient également bénéficier à la plante dans l'interaction avec le champignon. Il a en effet été montré qu'il était possible que l'asparagine soit plus difficile à métaboliser que d'autres AA pour les champignons nécrotrophes (Dulermo *et al.*, 2009). Ces plus fortes teneurs en glutamine et asparagine dans les graines de *Ler* ne semblent pas procurer dans nos conditions d'étude un avantage à ce génotype face au champignon. Il semble par contre possible de voir un lien entre les teneurs en proline et en GABA, plus abondants dans les graines de *Ler*, et la sensibilité des plantules. La proline est liée aux réponses de défense d'*A. thaliana*, sa teneur augmentant en présence de *P. syringae*, favorisant une réponse hypersensible (RH) liée à la voie du SA (Fabro *et al.*, 2004). Or, la RH peut favoriser la colonisation des tissus de plantes par un pathogène nécrotrophe (Glazebrook, 2005). Enfin, il a été montré que, dans l'interaction *A. thaliana* / *A. brassicicola*, l'infection par le champignon augmentait la teneur en GABA dans la plante, et qu'un apport de GABA exogène augmentait la sévérité de la maladie (Botanga *et al.*, 2012). La proline et le GABA auraient également un rôle dans la protection des cellules végétales face aux stress oxydatifs et osmotiques (Bouche & Fromm, 2004 ; Szabados & Savoré, 2010).

L'étude de métabolites carbonés des graines a également permis de mettre en évidence des différences de teneurs en composés pouvant avoir un rôle dans les défenses des plantes. Le rôle le plus important du métabolisme primaire du C dans les interactions biotiques est énergétique (Scheideler *et al.*, 2002). Le métabolisme et le transport des sucres, notamment, est important dans la modulation des interactions plantes-pathogènes, pour plusieurs raisons (Rojas *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2022). Premièrement, les sucres fournissent des squelettes C et de l'énergie pour alimenter les réponses de défense. Il y a en effet une augmentation de la demande en sucres pour les réponses de défense, comme le renforcement de la paroi cellulaire, la biosynthèse de phytoalexines, et l'induction de protéines liées à la défense, par exemple les protéines PR (Heil & Bostock, 2002 ; Swarbrick *et al.*, 2006 ; Berger *et al.*, 2007). Ensuite, les sucres solubles accumulés (en particulier les hexoses) peuvent eux-mêmes activer l'expression de gènes liés à la défense, tels que divers gènes *PR*, par le biais de la signalisation des sucres (Herbers *et al.*, 1996, 2000 ; Sonnewald *et al.*, 2012 ; Gebauer *et al.*, 2017 ; Ru *et al.*, 2017). Enfin, les sucres solubles, notamment ceux de la matrice extracellulaire, servent souvent de source de C pour la croissance des pathogènes (Talbot, 2010 ; Pommerrenig *et al.*, 2020). Ainsi, les sucres pourraient jouer un rôle positif ou négatif dans la défense des plantes dans l'infection par des agents pathogènes, en fonction du devenir des ressources en sucres, contestées à la fois par les agents pathogènes et les cellules végétales. La teneur totale en sucres solubles des graines de Col-0 et de *Ler* sont similaires (Tableau 5). Le sucre le plus abondant dans les graines des deux génotypes est le saccharose, suivi du raffinose et du stachyose, ces résultats se retrouvant tant au niveau des proportions que des teneurs brutes dans la littérature (Bentsink *et al.*, 2000 ; Baud *et al.*, 2002). Des différences entre ces 2 génotypes ont été identifiées pour le fructose, le raffinose (plus abondants dans les graines *Ler*) et le stachyose (plus abondant dans les graines

Col-0). Un rôle du fructose, dont les teneurs sont plus élevées dans les graines de *Ler*, a par exemple été démontré dans l'induction de certains gènes de protéines PR chez le tabac (Herbers *et al.*, 1996). L'induction de ces protéines dont les fonctions sont très variées, telles que des chitinases, des chitosanases ou des β -glucanases capables de dégrader les parois bactériennes ou fongiques, est liée à une moindre sensibilité des plantes (Sarowar *et al.*, 2005). Les graines de *Ler* et de Col-0 diffèrent aussi par leurs proportions de raffinose et de stachyose, deux métabolites de la voie des RFO. Il existe des indices montrant une implication de la voie des RFO, à travers la galactinol synthase, dans la signalisation des voies de défense de la plante en réponse aux pathogènes (Couée *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2008 ; Valluru & van den Ende, 2011), mais ceux-ci ne semblent pas être d'une importance cruciale et donc pas à même d'expliquer la différence de sensibilité entre *Ler* et Col-0.

Les sucres ne sont pas les seuls métabolites carbonés ayant un rôle dans les défenses des plantes, c'est également le cas des lipides (Welti *et al.*, 2007). Les teneurs en huile un peu moins de 30% du poids de la graine, sont similaires dans les deux génotypes (Tableau 7), et du même ordre de grandeur que la teneur moyenne des 360 accessions d'*A. thaliana* étudiées par O'Neill *et al.* (2003). Dans notre étude, les acides gras les plus abondants dans les graines sont l'acide linoléique, l'acide gondoïque, l'acide linoléique et l'acide oléique (Tableau 7). Ce résultat est cohérent avec les études de la composition de graines des génotypes Col-0 et *Ws* menées respectivement par O'Neill *et al.* (2003) et Baud *et al.* (2002). Le métabolisme des acides gras est très lié aux réponses de défense des plantes, étant, d'après Rojas *et al.* (2014), à un point de convergence entre les voies de défense du SA, du JA et du NO. L'inactivation de la stéaroyl désaturase (*SSI2*) (permettant la désaturation de l'acide stéarique en acide oléique) provoque, en plus d'une baisse de teneur en acide oléique, une activation de la voie du SA et des gènes *PR1*, *PR2* et *PR5* (Shah *et al.*, 2001). Le mutant *ssi2* devient ainsi résistant à l'oomycète *H. arabidopsidis* et à *P. syringae* (Nandi *et al.*, 2003). Les graines de *Ler* sont plus riches en acide oléique que les graines de Col-0, ce qui pourrait traduire une activité plus forte de *SSI2* et donc une sensibilité accrue aux pathogènes. Il serait donc intéressant de comparer l'expression du gène *SSI* chez *Ler* et Col-0 pour déterminer si la plus forte teneur en acide oléique chez *Ler* est liée à une différence de niveau d'expression de ce gène. La désaturation des acides gras par les désaturases *FAD7* et *FAD8* (fatty acid desaturase 7/8) est une autre étape importante de la biosynthèse des acides gras impliquée dans les réponses de défense de la plante. Chez *A. thaliana*, le double mutant *fad7/fad8* accumule moins d'ions superoxyde (O_2^-) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en réponse à l'inoculation par *P. syringae*, ce qui pourrait expliquer sa plus grande sensibilité à ce pathogène (Yaeno *et al.*, 2004). Ce déficit en O_2^- a été lié à un déficit d'acide linoléique dans le double mutant *fad7/fad8*, l'acide linoléique activant la NADPH oxydase permettant la production d' O_2^- (Yaeno *et al.*, 2004). Les graines de Col-0, plus riches en acide linoléique que les graines de *Ler*, pourraient avoir un potentiel de production de ROS plus important.

Certains métabolites secondaires soufrés, comme les phytoalexines indoliques ou les GLS, sont très importants dans les réponses de défense d'*A. thaliana* (Bednarek, 2012 ; Macioszek *et al.*,

2020). La camalexine n'a pas été détectée dans les graines, ce qui est cohérent avec les résultats de Rauhut et al. (2009) qui ont reporté une synthèse faible de camalexine dans les organes reproducteurs d'*A. thaliana*, comparés aux tissu végétatif. La camalexine étant toxique pour les plantes également, il est possible de faire l'hypothèse que sa synthèse dans les fleurs, siliques et graines pourraient causer une diminution de la fitness des plantes. Les GLS sont des phytoanticipines dérivées de la méthionine, du tryptophane et de la phénylalanine, présentes dans les plantes de la famille des Brassicacées (Wittstock & Halkier, 2002) et présentent une activité toxique pour une gamme d'insectes, de bactéries et de champignons (Kliebenstein, 2004). Etant donné que la teneur en sulfate dans les graines de *Ler* est plus importante que dans les graines de Col-0, il est possible de faire l'hypothèse que les graines de *Ler* sont plus riches en composés soufrés. Cette hypothèse se vérifie notamment sur les teneurs en GLS, qui sont en effet plus abondants dans les graines de *Ler*. Les profils des différents GLS sont par contre très différents entre les deux génotypes, *Ler* contenant surtout de la glucomalcolmiine, du glucoerysimumhieracifolium et de la glucojirsutine / glucoarabishirsuine, alors que le GLS le plus abondant chez Col-0 est la glucoérucine. Ces profils sont retrouvés très fidèlement dans les dosages de glucosinolates effectués par Kliebenstein *et al.* (2001), la principale différence étant une teneur plus faible de glucomalcolmiine dans les graines de *Ler* dosées par ces derniers par rapport aux nôtres. Il est aussi à noter que dans leurs expérimentations les graines de Col-0 étaient plus riches en glucosinolates que les graines de *Ler*. Les glucosinolates dosés dans les graines d'*A. thaliana*, que ce soit par nous ou Kliebenstein *et al.*, sont très majoritairement aliphatiques, l'exception étant la glucobrassicine, un glucosinolate indolique bien plus abondant chez Col-0 que chez *Ler*. Ce résultat est important, les glucosinolates aliphatiques, aromatiques et indoliques pouvant avoir des effets très différents sur *A. brassicicola*. Il a par exemple été montré que le produit majeur d'hydrolyse des GLS chez Col-0 au stade rosette, le 4-méthylsulphinylisothiocyanate (4-MSOITC) (produit à partir du GLS majoritaire dans les feuilles de Col-0, la glucoraphanine qui est un GLS aliphatique), est toxique *in vitro* sur de nombreux champignons et bactéries. Les pathogènes biotrophes testés étaient tous sensibles au 4-MSOITC, alors que les champignons nécrotrophes *B. cinerea* et *A. brassicicola* y étaient résistants (Tierens *et al.*, 2001). De même, l'accumulation de GLS aliphatiques néo-formés chez *A. thaliana*, des isopropyl-GSL et méthylpropyl-GSL, ne provoquerait aucune diminution de la sensibilité de la plante à *A. brassicicola*, alors que l'accumulation de GLS aromatiques néo-formés provoquerait même une augmentation de la sensibilité (Brader *et al.*, 2006). Enfin, quant aux GLS indoliques, Tao *et al.* (2022) ont montré que leur biosynthèse, et notamment celle du 4-méthoxyindole-3-ylméthyl glucosinolate à partir de la glucobrassicine, diminuait la sensibilité d'*A. thaliana* et de *Brassica oleracea* à *A. brassicicola*. La différence de composition en GLS indoliques observée dans les graines pourrait donc procurer un avantage pour le génotype Col-0 dans l'interaction avec le champignon.

En résumé, les graines de *Ler* et de Col-0 présentent des profils métaboliques différents, quantitativement mais aussi qualitativement. Certains métabolites pourraient donc être associés aux différences de sensibilités des plantules au champignon des deux génotypes. En se basant sur les connaissances issues de la littérature évoquées précédemment, il semble difficile de

relier directement la plupart des résultats obtenus sur les graines à la différence de sensibilité des deux génotypes étudiés. Cependant l'abondance de composés azotés chez *Ler*, notamment le NO_3^- et le GABA, ou la présence de GLS indoliques chez *Col-0*, des phénomènes spécifiquement montrés dans la littérature sur le pathosystème *A. thaliana* / *A. brassicicola*, distinguent clairement les deux génotypes et pourraient expliquer au moins en partie la différence de sensibilité au pathogène entre génotype au stade plantule. Il est enfin à noter que la grande majorité des résultats connus dans la littérature ont été obtenus sur des plantes adultes, et qu'il est difficile d'en conclure un effet direct sur les graines et la germination.

IV.4.2. Rôle du métabolisme primaire du N, du C et du S et des voies de défense sur la sensibilité des plantules à *A. brassicicola*

Afin d'évaluer l'influence de la nutrition azotée et du génotype sur l'induction des réponses de défense d'*A. thaliana* à la suite de l'inoculation par *A. brassicicola*, l'expression de deux gènes de défense a été étudiée. Les deux gènes testés, *PRI* (marqueur de la voie de défense liée à l'acide salicylique) et *PDF1.2* (marqueur de la voie de défense liée au JA / éthylène) sont significativement induits par l'inoculation fongique dans toutes les conditions de milieu et de génotype (Tableau 11). L'expression du gène *PDF1.2* dépend également du génotype, elle est plus importante chez les plantules *Col-0* que chez les plantules *Ler* (Tableau 13). Il est à savoir qu'en général, JA et l'éthylène sont deux phytohormones ayant un rôle important dans la régulation de la résistance systémique induite contre les pathogènes nécrotrophes, tandis que le SA joue un rôle central dans la résistance systémique acquise contre les pathogènes biotrophes (Dong, 1998). L'induction de ces deux gènes permet de faire l'hypothèse que les voies du SA et du JA sont induites par la présence de *A. brassicicola*. La voie du JA semble également plus induite dans les plantules *Col-0* que dans les plantules *Ler*, ce qui pourrait en partie expliquer la sensibilité plus importante de ce dernier génotype au champignon nécrotrophe étudié.

Les proportions atomiques de N dans les plantules (Tableau 9), ainsi que les teneurs en nitrate et ammonium (Tableau 10) ont également été évaluées, afin de clarifier le lien entre N et sensibilité. Concernant les proportions atomiques, les plantules cultivées en présence de 5 mM de N (NO_3^- comme NH_4^+) sont sans surprise plus riches en N que les plantules cultivées en présence de 0,1 mM NO_3^- . Un effet de la présence du champignon a également été détecté sur les plantules *Ler* cultivées en condition 5 mM NO_3^- , qui sont moins riches en N en présence du champignon qu'en son absence. Pour ce qui est des teneurs en nitrate, elles sont logiquement plus élevées en condition 5 mM NO_3^- que dans les deux autres conditions azotées. Un effet de l'inoculation par le champignon similaire à celui observés dans le cas des teneurs en N est également observé, le nitrate étant moins abondant dans les plantules des deux génotypes cultivés en condition 5 mM NO_3^- en présence d'*A. brassicicola*. Enfin, l'ammonium est logiquement plus abondant chez les plantules cultivées en condition 5 mM NH_4^+ que dans les deux autres conditions de nutrition azotée. Il y a une interaction entre condition d'azote, inoculation et génotype dans le cas des teneurs en ammonium : la présence du champignon

augmentant la teneur en ammonium des plantules Col-0 et diminuant celle des plantules *Ler*, en condition 5 mM NH_4^+ . Ces résultats permettent premièrement de mettre en évidence que les différences de forme et de concentration en N du milieu nutritif se retrouvent dans les teneurs observées dans les plantules 14 jours après semis et inoculation, et que l'effet du milieu azoté sur la sensibilité de la plantule au champignon correspond en réalité à l'effet des teneurs azotées dans les plantules. Une teneur élevée en NO_3^- dans les plantules apparaît ainsi associée à une moindre sensibilité des plantules d'*A. thaliana* à *A. brassicicola*, à l'inverse d'une teneur élevée en NH_4^+ ou faible en N de manière générale.

Une des principales différences induites par la nutrition NO_3^- par rapport à la nutrition NH_4^+ est la production de NO, une molécule signal majoritairement issue de la réduction du nitrite (NO_2^-) par NR (Kaiser *et al.*, 2002 ; Rockel *et al.*, 2002 ; Planchet *et al.*, 2005). La production de NO_2^- étant dépendante du NO_3^- , la production de NO dans des plantes nourries entièrement avec du NH_4^+ comme seule source de N est très limitée, ce qui a été confirmé dans notre pathosystème au stade rosette (Barrit *et al.*, 2022). Le NO est rapidement accumulé en condition de stress biotique, jouant le rôle d'une molécule signal importante dans la régulation de la défense des plantes face aux pathogènes (Delledonne *et al.*, 1998 ; Planchet *et al.*, 2006 ; Martínez-Medina *et al.*, 2019 ; Jedelská *et al.*, 2021). Il a notamment un rôle dans l'induction de la voie du SA (Durner *et al.*, 1998) et dans l'accumulation de phytoalexines (Noritake *et al.*, 1996 ; Martínez-Medina *et al.*, 2019), comme la camalexine dont l'importance dans la réponse de la plante à *A. brassicicola* a été prouvée (Thomma *et al.*, 1999 ; Kruse *et al.*, 2012 ; Kosaka *et al.*, 2021). La sensibilité moindre des plantules en condition 5 mM NO_3^- , associée à ces résultats de littérature présentant l'effet du NO sur les défenses des plantes, permettrait de faire l'hypothèse que la production de NO est induite dans cette condition de nutrition et aurait un rôle dans la défense de la plante. L'effet du NO est cependant complexe, et il convient de nuancer son effet sur les défenses des plantes. Il a en effet été montré que la synthèse du NO pouvait favoriser le pathogène dans l'interaction, en accélérant la colonisation de l'hôte dans le cas d'un pathogène nécrotrophe (Turrión-Gómez & Benito, 2011 ; Arasimowicz-Jelonek & Floryszak-Wieczorek, 2016 ; Zhao *et al.*, 2020), ou en induisant la conidiation du champignon (Wang & Higgins, 2005 ; Gong *et al.*, 2007 ; Samalova *et al.*, 2013). La diminution des teneurs induites par la présence du champignon (teneurs en N pour *Ler* en condition 5 mM NO_3^- ; teneurs en nitrate en condition 5 mM NO_3^- ; teneurs en ammonium pour *Ler* en condition 5 mM NH_4^+) pourrait être due à la consommation des ressources azotées de la plante par le champignon, celui-ci en étant dépendant pour sa croissance (Mur *et al.*, 2016). Ces diminutions s'observent cependant surtout en condition 5 mM NO_3^- et ne semblent donc pas être associées à un développement plus important du champignon sur les plantules, à l'exception peut-être du cas des plantules *Ler* en condition 5 mM NH_4^+ . Ces variations de teneurs pourraient également être dues à des variations de synthèse des AA ou d'absorption de N par les transporteurs.

L'expression des gènes codant un transporteur de NO_3^- (*NPF6.3*) et deux transporteurs de NH_4^+ (*AMT1.1* et *AMT2.1*) a d'ailleurs été étudiée. L'expression des gènes *NPF6.3* et *AMT1.1* est réprimée par la présence d'*A. brassicicola* dans les deux conditions 5 mM NH_4^+ et 0,1 mM

NO_3^- . Cette répression semble donc associée à une sensibilité plus importante au champignon. Ces deux gènes sont aussi plus fortement exprimés en condition 5 mM NO_3^- dans les plantules du génotype Col-0 en présence du champignon, par rapport aux deux autres conditions de N (Tableau 13), reliant encore un peu plus l'expression de ces gènes associés au transport à une moindre sensibilité au pathogène. Il est important de rappeler que notre étude a été réalisée dans les parties aériennes seulement (expressions de gènes et abondance des métabolites). Nos résultats ne permettent donc pas de conclure de manière claire sur des différences d'absorption de formes et de teneurs de N entre les plantules cultivées dans les différents milieux / modalités étudiées. On peut faire l'hypothèse que la diminution des teneurs en composés N provoquées par le champignon en condition 5 mM NO_3^- pourrait peut-être être due à un transport plus important de ces composés des parties aériennes (étudiées) aux parties racinaires (non étudiées), limitant l'accès d'*A. brassicicola* à ces ressources, ce dernier s'attaquant aux parties aériennes des plantes seulement (Köhl *et al.*, 2010). Il a de plus été démontré que certains transporteurs de NO_3^- étaient impliqués dans les défenses des plantes, tels que *NRT2.1* dans le pathosystème *P. syringae* / *A. thaliana* (Camañes *et al.*, 2012), *NRT2.6-1* dans l'interaction entre *Erwinia amylovora* et *A. thaliana* (Dechorgnat *et al.*, 2012) et *NRT2.5* chez *A. thaliana* en réponse à l'infection par *A. brassicae* (Vahabi *et al.*, 2018). Il a par exemple été montré que *NRT2.1* avait un effet négatif sur la résistance d'*A. thaliana* à *P. syringae*, l'inactivation de *NRT2.1* rendant *A. thaliana* plus résistant à ce pathogène biotrophe. Cette différence de sensibilité s'expliquerait par une répression des voies de défense des plantes liées au SA par *NRT2.1*.

Par ailleurs, l'importance d'autres composés liés au métabolisme primaire de N a été montrée dans notre étude, comme certains AA ou les polyamines ayant des rôles très importants dans la défense des plantes. Les résultats concernant les polyamines et leurs précurseurs sont détaillés dans la partie IV.4.3 de cette discussion, tandis que les résultats concernant le tryptophane et les métabolites secondaires dont il est le précurseur sont détaillés dans la partie IV.4.4. En plus de ceux-ci, un AA ressort très fortement des analyses effectuées pour expliquer la différence de sensibilité des plantules au champignon dans les différentes conditions de milieu N : la tyrosine. Cet AA est fortement accumulé en présence du champignon, dans les deux conditions azotées 5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^- (Figure 3), et il est le métabolite le plus fortement corrélé positivement à l'impact du champignon (Figure 6). La tyrosine est le précurseur d'un composé de défense des plantes, la dhurrine qui est un glucoside cyanogénique (Celenza, 2001 ; Schenk & Maeda, 2018). *A. thaliana* ne produisant pas de glucosides cyanogéniques, l'effet de la tyrosine que nous constatons ne peut pas être lié à cette voie de synthèse. La tyrosine est également un précurseur de GLS aromatiques, comme le p-hydroxybenzylglucosinolate qui est le GLS majeur chez *Sinapis alba* (Du & Halkier, 1998). Les 23 GLS présents chez *A. thaliana* ne dérivent cependant que du tryptophane, de la méthionine et de la phénylalanine (Hogge *et al.*, 1988), et le rôle de la tyrosine ne semble donc pas pouvoir s'expliquer par la synthèse de GLS dans les plantules. *Le mode d'action de cet AA dans l'interaction ne semble pas pouvoir être clairement défini grâce à la littérature, et mériterait d'être étudié plus en détail.*

L'étude du métabolisme primaire du C est également importante pour comprendre les interactions entre plante et pathogène. Il a premièrement un rôle énergétique, l'induction des défenses de la plante étant très coûteuse, et le pathogène ayant besoin de C pour son développement, qu'il prélève chez la plante (Heil & Bostock, 2002 ; Scheideler *et al.*, 2002 ; Swarbrick *et al.*, 2006 ; Talbot, 2010). Nous avons trouvé une proportion atomique en C plus faible dans les plantules cultivées en condition 5 mM NO₃⁻, en particulier chez les plantules Col-0, qui sont les modalités associées à une sensibilité moins importante au pathogène. Nos résultats sont également cohérents avec l'étude de Guo *et al.* (2006) qui montre que l'assimilation du CO₂ étant plus élevée chez les plantes en condition de NH₄⁺ par rapport à NO₃⁻. Il est donc logique qu'elles soient plus riches en C. Quant à la proportion atomique en C plus élevée chez les plantules cultivées en 0,1 mM NO₃⁻, par rapport à 5 mM NO₃⁻, le résultat s'explique par la proportion bien plus faible en N de la condition faiblement concentrée en NO₃⁻. Les AO, et notamment ceux du cycle de Krebs (le fumarate, le malate, le citrate, l'alpha-cétoglutarate, l'isocitrate et le succinate) sont plus abondants en absence du champignon dans les plantules en condition 0,1 et 5 mM NO₃⁻. Ce résultat s'explique par la nécessité pour la plante de détoxifier NH₄⁺ en l'assimilant dans les AA, consommant les squelettes C provenant du cycle de Krebs *via* le cycle GS / GOGAT (Guo *et al.*, 2006).

Nous avons mis en évidence que la présence du champignon n'affecte pas les teneurs en AO des plantules cultivées en condition 5 mM NO₃⁻ alors que celles des plantules cultivées en condition 0,1 mM NO₃⁻ s'effondrent (Figure 3). Deux hypothèses peuvent être faites pour expliquer cette chute en AO : la diminution de l'activité métabolique de la plantule et donc de leur production à cause des symptômes très importants causés par le champignon dans cette condition, et/ou la consommation par le champignon de ces composés. Enfin, les fortes teneurs en AO sont corrélés très fortement à un impact faible du champignon (Figure 6). Cette corrélation semble plus liée à la forte teneur de ces composés en présence du champignon en condition 5 mM NO₃⁻, associée à peu de symptômes, qu'à un rôle de ces composés dans la défense de la plante. On notera tout de même la présence du shikimate dans les AO corrélés à un impact faible du champignon, précurseur du tryptophane. Des sucres en lien avec la glycolyse, comme le fructose, le fructose-6-phosphate (F6P) et le glucose-6-phosphate (G6P) se distinguent également. Le fructose est plus accumulé en présence du champignon en condition 5 mM NH₄⁺, et les teneurs en F6P et G6P sont corrélés à l'impact du champignon. En plus de leur rôle énergétique, les sucres associés à la glycolyse ont également un lien avec la défense des plantes. Par exemple, le saccharose, le glucose et le fructose induisent l'expression de protéines PR chez le tabac (Herbers *et al.*, 1996) et l'hexokinase 1 (phosphorylant le glucose en G6P) induit l'expression de protéines PR chez *Arabidopsis* (Xiao *et al.*, 2000). Rojas *et al.* (2014) concluent que le métabolisme des sucres a un rôle dans les réponses de défense telles que l'accumulation de H₂O₂, l'expression des gènes PR, l'accumulation du SA et l'élicitation de la RH. Or, la RH pourrait avantager les nécrotrophes, ces derniers se nourrissant des restes de cellules mortes (Glazebrook, 2005). Cette hypothèse semble compatible avec nos résultats, les composés du métabolisme des sucres se distinguant étant plutôt lié à la sensibilité d'*A. thaliana* à *A. brassicicola*. Nous avons également mis en

évidence une corrélation (positive) entre l'abondance en cellobiose et l'impact du champignon. Il est possible de faire l'hypothèse que ce métabolite est un marqueur de l'impact du champignon sur les cellules des plantules, provenant de la décomposition de la cellulose dans parois cellulaires de la plante (Pettipher & Latham, 1979 ; Zhou *et al.*, 2012), par les cellulases produites par *A. brassicicola* (Deep *et al.*, 2014). Enfin, la présence du champignon provoque également l'accumulation de dihydroxyacétone phosphate, dans toutes les conditions d'azote, ceci pour les deux génotypes, mais il est difficile de lier ce métabolite aux défenses des plantes. Ce lien pourrait peut-être être associé à un effet du glycérol-3-phosphate, synthétisé à partir de la dihydroxyacétone phosphate, qui est essentiel à la résistance systémique acquise chez *A. thaliana* (Chanda *et al.*, 2011).

Enfin, il convient de discuter du soufre (S), un composé impliqué dans la synthèse de molécules de défense d'*A. thaliana* importantes pour la défense face aux pathogènes, comme les GLS et les phytoalexines indoliques (Bednarek, 2012 ; Macioszek *et al.*, 2020). La proportion atomique de S est très stable entre les différentes conditions étudiées. Le sulfate est au contraire plus abondant dans les plantules cultivées en nutrition NO_3^- par rapport à la nutrition NH_4^+ . Le statut nutritionnel de la plante en ce qui concerne le sulfate a un rôle dans la défense d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*, des teneurs plus élevées favorisant la plante dans l'interaction et induisant notamment la production de camalexine (Kruse *et al.*, 2012). Les effets des métabolites secondaires soufrés comme la camalexine et les GLS indoliques sont discutés en détail dans la partie IV.4.4 de cette discussion.

IV.4.3. Impact des polyamines sur les différences de sensibilité observées entre conditions azotées et génotypes

Des polyamines ainsi que leurs précurseurs (arginine (Arg), citrulline (Cit) et ornithine (Orn)) ont été mis en évidence dans notre étude métabolique des plantules, en lien avec leur sensibilité au champignon en fonction de la condition nutritive azotée. Il a été précédemment montré que les polyamines, comme la putrescine (Put), la spermidine (Spd), la spermine (Spm), la thermospermine (Tspm) et la cadaverine (Cad), ont un rôle actif dans les interactions entre plantes et pathogènes (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). Ce rôle peut, soit être exercé directement par les polyamines, soit dépendre de leur catabolisme. Par exemple, les teneurs en polyamines, ainsi que l'activité des enzymes liées à leur synthèse augmentent dans les tissus infectés, que ce soit en présence d'un pathogène biotrophe comme d'un nécrotrophe (Walters, 2003 ; Hussain *et al.*, 2011). Cette accumulation de polyamines libres s'accompagne généralement de deux phénomènes importants pour la réponse de défense des plantules : une augmentation de la concentration en polyamines conjuguées (Rodriguez-Kessler *et al.*, 2008 ; Muroi *et al.*, 2009) et une induction de l'activité des PAO (Marini *et al.*, 2001 ; Cowley & Walters, 2002) catabolisant les polyamines. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'expression d'un panel de gènes impliqués dans la synthèse et dans l'oxydation des polyamines. Tout d'abord, une

abondance très variable des polyamines et de certains de leurs précurseurs a été mise en évidence en fonction de la condition nutritive azotée (Tableau X). L'Arg, la Cit, l'Orn, la Cad, la Put et la Spd sont en effet plus abondantes en condition 5 mM NH₄⁺ et moins abondantes en condition 5 mM NO₃⁻ et 0,1 mM NO₃⁻. Quant à la Spm, celle-ci est plus abondante en condition 5 mM NH₄⁺ et 0,1 mM NO₃⁻ qu'en condition 5 mM NO₃⁻. L'accumulation de polyamines libres en condition NH₄⁺ par rapport aux condition NO₃⁻ est classique, et pourrait avoir un rôle de maintien du pH cellulaire lors d'un stress ammoniacal (Altman & Levin, 1993 ; Houdusse *et al.*, 2005). Certaines études ont également montré une corrélation positive entre la concentration exogène en N et en NO₃⁻ et les teneurs en polyamines (Serapiglia *et al.*, 2008 ; Paschalidis *et al.*, 2019), mais ce résultat ne se retrouve pas dans notre étude, les teneurs de polyamines en condition 5 mM NO₃⁻ n'étant pas supérieures à celles en condition 0,1 mM NO₃⁻. L'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des polyamines permet d'expliquer la faible teneur de Put en condition 5 mM NO₃⁻ : *ADC2*, qui permet la formation de Put, est moins exprimé dans cette condition de N, tandis que *SPDS2* permettant la formation de Spd à partir de Put est plus exprimé dans cette condition. Il est à noter que l'Arg, l'Orn et la Cit, qui sont donc moins consommées en condition 5 mM NO₃⁻ pour former de la Put, sont tout de même plus abondantes en condition 5 mM NH₄⁺, laissant penser que leur production est bien plus forte dans cette condition. Concernant les gènes en lien avec la synthèse de Spd, l'expression de *SPDS2* est plus importante en condition 5 mM NO₃⁻, ce qui est aussi le cas de *SPDS1* en présence du champignon. En son absence, *SPDS1* est au contraire moins exprimé en condition 5 mM NO₃⁻. Si l'expression des gènes liés à la synthèse de Spd est liée à la condition 5 mM NO₃⁻ c'est également le cas de *ACL5* permettant la formation de Tspm à partir de Spd. La production (à partir de la Put) et consommation de Spd (pour former de la Tspm) étant toutes les deux *a priori* plus importantes en condition 5 mM NO₃⁻, il n'est finalement pas surprenant d'observer un même effet de la condition azotée sur les abondances de cette polyamine et de son précurseur, *i.e.* la Put. La teneur en Spm diffère de celles des autres polyamines de la voie de biosynthèse. En effet cette dernière n'est pas seulement plus abondante en condition 5 mM NH₄⁺, elle l'est aussi en condition 0,1 mM NO₃⁻, ce qui pourrait s'expliquer par l'expression plus importante du gène *SPMS* en condition 0,1 mM NO₃⁻.

La Spm et la Put sont plus abondantes en présence du champignon en condition 5 mM NH₄⁺, et la Cad en condition 5 mM NO₃⁻. Cette relation entre accumulation de polyamines et infection par un champignon nécrotrophe est cohérente avec la littérature (Walters, 2003 ; Hussain *et al.*, 2011). L'Orn et la Cit sont au contraire moins abondantes en présence d'*A. brassicicola* en condition 5 mM NH₄⁺, un résultat explicable par la consommation de ces deux AA afin de produire de la Put, et à terme de la Spm. L'expression de *ADC1*, *ADC2* et *SPMS* est globalement induite en présence du champignon, ce qui semble cohérent avec d'autres études (Coghlan & Walters, 1990 ; Moschou *et al.*, 2008). Cependant, l'expression d'*ADC2* et de *SPMS* n'est pas spécifiquement induite en condition 5 mM NH₄⁺. L'expression de *SPDS1* et *SPDS2* est quant à elle globalement plus faible en présence du champignon, ce qui pourrait expliquer que les teneurs en Spd n'augmentent pas.

Le rôle des polyamines dans les défenses des plantes est, de manière générale, surtout relié à la Spm (Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). L'augmentation des teneurs en Spm dans l'apoplasme de plants de tabac en réponse à l'infection par le virus de la mosaïque du tabac est par exemple responsable d'une induction de l'expression de différentes *PR*, provoquant une sensibilité moindre de la plante (Yamakawa *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, l'accumulation de Spm induit l'expression de gènes liés à la perception des pathogènes et à la défense, en présence de la bactérie *Pseudomonas viridiflava* (Gonzalez *et al.*, 2011). La Put a également un rôle dans les réponses de défense d'*A. thaliana*. Il a en effet été montré qu'un apport exogène en Put réduisait la sensibilité d'un mutant *ADC2* à *P. syringae* (Kim *et al.*, 2013). Un rôle de la Spd a été démontré chez le tabac dans la résistance au virus de la mosaïque du tabac (Lazzarato *et al.*, 2009). Il est cependant difficile dans ces deux cas de conclure de manière sûre à un effet direct de la Put et de la Spd, plutôt qu'à un effet lié à une production de Spm à partir de la Put et de la Spd. Quant à la Tspm, elle semble aussi efficace pour l'induction des défenses de la plante que son isomère, la Spm, un apport exogène de cette dernière réduisant la sensibilité d'*A. thaliana* au virus de la mosaïque du concombre et à *P. syringae* (Sagor *et al.*, 2012 ; Marina *et al.*, 2013 ; Jiménez-Bremont *et al.*, 2014). Il est à noter qu'une explication pour l'effet des polyamines pourrait être lié au NO, l'apport exogène de Spd et de Spm induisant la production de NO dans les plantules d'*A. thaliana* (Wimalasekera *et al.*, 2011). Les polyamines libres ne sont pas les seules à avoir un impact sur les défenses des plantes. En effet, l'accumulation de polyamines libres lors d'une interaction biotique s'accompagne généralement d'une augmentation de la concentration en polyamines conjuguées (Rodriguez-Kessler *et al.*, 2008 ; Muroi *et al.*, 2009), ces dernières ayant des propriétés antifongiques (Mackintosh *et al.*, 1997 ; Walters *et al.*, 2001). Muroi *et al.* (2009) ont notamment montré que l'accumulation de polyamines conjuguées, comme la p-coumaroylputrescine ou la feruloylputrescine, dans les feuilles d'*Arabidopsis* en réponse à l'inoculation par *A. brassicicola* diminuait la sensibilité de la plante au champignon. L'effet de ces métabolites a été conforté par l'inactivation du gène *AtACT* (codant pour une enzyme conjuguant les polyamines) qui provoque une hausse de la sensibilité de la plante. L'étude de l'expression de ce gène, ainsi que des teneurs en polyamines conjuguées pourrait aider à la compréhension de nos résultats.

Les effets des polyamines libres et conjuguées que nous avons présentés jusqu'à présent semblent promouvoir très fortement l'idée d'une diminution de la sensibilité des plantes liées aux polyamines, notamment dans le pathosystème *A. thaliana* / *A. brassicicola*. Or, la Cad, la Put, la Spd et les précurseurs de polyamines sont plus abondants en condition 5 mM NH₄⁺, une condition nutritive azotée associée à une forte sensibilité des plantules au champignon pathogène. Quant à la Spm, *a priori* la polyamine libre la plus importante pour les défenses des plantes, sa teneur est non seulement plus importante dans les deux conditions de N où la plantule est la plus sensible au champignon, *i.e.* 5 mM NH₄⁺ et 0,1 mM NO₃⁻, mais son accumulation est également positivement corrélée à l'impact du champignon, déterminé grâce au HAI (Figure 6). Cette apparente contradiction pourrait s'expliquer par les phénomènes d'oxydation des polyamines.

L'oxydation des polyamines est réalisée par des oxydases, les DAO dans le cas du catabolisme de la Put et de la Cad, et par les PAO dans le cas de la Spd et de la Spm. L'induction de l'expression de *PAO1*, *PAO3* et *PAO4* en présence du champignon révélée dans notre étude (Tableau X) est cohérente avec les observations de Marini *et al.* (2001) et de Cowley & Walters (2002) montrant que l'activité des PAO est induite au contact de pathogènes. Par ailleurs, l'expression des gènes codant les PAO est plus importante pour les conditions nutritives associées à une plus grande sensibilité au champignon (0,1 mM NO₃⁻ pour les trois gènes *PAO*, 5 mM NH₄⁺ pour *PAO4*) comparativement à celle associée à une sensibilité au champignon plus faible (5 mM NO₃⁻). L'action des PAO et des DAO dans les défenses des plantes résulte en partie de la production d'H₂O₂ découlant du catabolisme des polyamines, un phénomène qui contribue à la mort cellulaire chez l'hôte *via* la RH (Marini *et al.*, 2001 ; Cowley & Walters, 2002 ; Rea *et al.*, 2004). Les pathogènes nécrotrophes fonctionnant en tuant les cellules de leur hôte et en se nourrissant de leurs restes, il est raisonnable de penser que la RH pourrait les avantager (Glazebrook, 2005). Cette hypothèse est confirmée par l'effet différent de l'oxydation des polyamines en fonction du mode de vie du pathogène. En effet, la RH causée par l'oxydation des polyamines a un effet positif sur la résistance des plantes aux pathogènes biotrophes et hémibiotrophes comme *P. syringae*, *Magnaporthe grisea*, *Pseudomonas cichorii* ou *Phytophthora parasitica* (Moschou *et al.*, 2009 ; Yoda *et al.*, 2009). De plus, Marina *et al.* (2008) ont démontré que, si l'oxydation des polyamines réduisait la colonisation de la bactérie biotrophe *P. viridiflava*, elle favorisait le développement du champignon nécrotrophe *Sclerotinia sclerotiorum*. La littérature présentée précédemment sur l'importance du rôle de la Spm sur les défenses des plantes est en réalité également liée à l'oxydation des polyamines et à la RH. La résistance du tabac au virus de la mosaïque du tabac est en effet liée à une oxydation de la Spm conduisant à la RH (Takahashi *et al.*, 2003, 2004). De même, l'inhibition des PAO réduit très fortement l'induction par la Spm de gènes liés à la perception des pathogènes et à la défense chez *Arabidopsis* (Gonzalez *et al.*, 2011), montrant l'importance de l'oxydation dans le rôle de la spm. Il est tout de même important de remarquer que le rôle de l'oxydation des polyamines ne se limite pas à la production d'H₂O₂ et à la RH. L'oxydation de la Put et de la Spd peut en effet mener à la production de delta-pyrroline, un précurseur du GABA, un AA impliqué dans la sensibilité d'*A. thaliana* à *A. brassicicola* (Botanga *et al.*, 2012).

Il est clair à la vue de tous ces éléments que les polyamines ont un rôle important dans l'interaction entre la plante et le champignon dans notre étude. Son rôle exact est par contre plus difficile à percevoir clairement tant les effets que les polyamines peuvent avoir sont opposés. L'abondance des polyamines dans les deux conditions de N augmentant la sensibilité de la plante au champignon laisse penser que l'effet négatif de l'oxydation des polyamines sur la résistance des plantes face aux pathogènes nécrotrophes l'emporte sur l'effet positif des polyamines conjuguées sur les défenses d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*. De manière générale, l'effet des polyamines sur les pathogènes nécrotrophes reste difficile à prévoir et est dépendant du pathosystème (Edreva, 1997 ; Rea *et al.*, 2002 ; Moschou *et al.*, 2008 ; Nambeesan *et al.*, 2012). Il serait intéressant d'éclaircir ce rôle en contrôlant leur synthèse, en éteignant les gènes codant l'ADC par exemple.

IV.4.4. Impact des composés de défense dérivant du tryptophane sur les différences de sensibilité observées entre conditions azotées et génotypes

Dans notre étude, il a été mis en évidence que le tryptophane est plus abondant dans les plantules cultivées en condition 5 mM NH_4^+ par rapport à celles cultivées en conditions 5 mM NO_3^- et 0,1 mM NO_3^- (Figure Y). Une augmentation de la teneur en tryptophane est également induite par la présence du champignon en condition 5 mM NO_3^- , pouvant laisser présager, soit d'une induction des voies de biosynthèse de composés de défense dérivant du tryptophane dans cette condition de N, soit d'une diminution de la synthèse de ces composés et donc une consommation moindre de leur précurseur. Le tryptophane est en effet un précurseur de molécules indoliques impliquées dans les défenses des plantes de la famille des Brassicacées face aux pathogènes. Il est converti en indole-3-acétaldoxime (IAOx) par CYP79B2 et CYP79B3, qui est ensuite impliqué dans les voies de biosynthèse des GLS indoliques et de la camalexine (Hansen & Halkier, 2005). Nous n'avons pas pu doser les GLS et la camalexine par manque de matériel biologique, mais nous avons étudiés l'expression de plusieurs gènes liés à leur métabolisme afin d'étudier indirectement leur accumulation dans les plantules, et donc leur rôle dans les défenses d'*A. thaliana* à *A. brassicicola*.

L'expression de deux gènes de la voie de biosynthèse de la camalexine a été étudiée, celle de CYP79B2, et celle de CYP71B15 (aussi appelée PAD3) qui code l'enzyme responsable de la dernière étape de la biosynthèse (Schuhegger *et al.*, 2006). Ces deux gènes sont très fortement surexprimés en présence d'*A. brassicicola*, quels que soient le génotype et les conditions de N. Ce résultat est cohérent avec la littérature, la synthèse de la camalexine étant induite lors de l'infection par un pathogène nécrotrophe comme *A. brassicicola* ou *Botrytis cinerea* (Thomma *et al.*, 1999). Concernant l'effet de la nutrition N sur l'expression de ces gènes, CYP79B2 est sous exprimé en condition 5 mM NO_3^- . CYP71B15 l'est également mais seulement en absence du champignon. Le fait que CYP71B15 ne soit pas sous exprimé en condition 5 mM NO_3^- (favorisant les défenses de la plante) lors de l'infection par le champignon est rassurant, la camalexine ayant un rôle important dans la défense d'*A. thaliana*. Il a en effet été montré que la camalexine avait un rôle dans la défense face au pathogène *Phytophthora brassicae* (Schlaeppli *et al.*, 2010) et dans notre pathosystème, face au pathogène *A. brassicicola* (Kruse *et al.*, 2012 ; Kosaka *et al.*, 2021). L'effet de la camalexine sur *A. brassicicola* a également été démontré *via* l'étude d'un mutant de CYP71B15, incapable de synthétiser de la camalexine, la taille des nécroses et le nombre de conidies étant en effet bien plus importants chez les feuilles des mutants par rapport aux plantes sauvages (Thomma *et al.*, 1999, Joubert *et al.*, 2011).

En plus de CYP79B2, quatre gènes de la voie de biosynthèse des GLS indoliques ont été étudiés : CYP83B1, MYB51, ST5A et CYP81F2. Ces gènes sont globalement surexprimés en condition d'infection par le champignon, ce qui est cohérent avec la littérature, les teneurs en GLS et l'expression des gènes de leur synthèse étant plus élevées en présence de pathogènes (Siemens & Mitchell-Olds, 1998 ; Schlaeppli *et al.*, 2010). Tous ces gènes sont par contre sous exprimés en présence de 5 mM NO_3^- par rapport aux deux autres conditions de N. Ce résultat n'est pas très étonnant en ce qui concerne la comparaison $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$, les GLS s'accumulant

chez *Arabidopsis* en cas de nutrition NH_4^+ (Marino *et al.*, 2016), même s'il convient de nuancer en ajoutant que cette accumulation concerne surtout des GLS aliphatiques. L'expression moindre des gènes de biosynthèse des GLS indoliques en condition 5 mM NO_3^- par rapport à la condition 0,1 mM NO_3^- est par contre plus surprenante, les teneurs en GLS étant en général plus élevées en condition de N élevé (Yan & Chen, 2007). Enfin, il est important de remarquer que l'expression des gènes de biosynthèse des GLS indoliques est plus faible dans la condition de N pour laquelle les plantules sont le moins sensibles au champignon (5 mM NO_3^-), alors que leur expression est plus forte dans les conditions de N pour lesquelles les plantules sont le plus sensibles (0,1 mM NO_3^- et 5 mM NH_4^+). Ce résultat est contradictoire avec l'effet des GLS indoliques, qui augmenterait les défenses d'*A. thaliana* face à *Phytophthora brassicae* (Schlaeppli *et al.*, 2010) mais face à *A. brassicicola* (Tao *et al.*, 2022). Ces derniers ont montré que leur biosynthèse, et notamment celle du 4-méthoxyindole-3-ylméthyl glucosinolate par CYP81F2 à partir de la glucobrassicine, diminuait la sensibilité d'*A. thaliana* et de *B. oleracea* à *A. brassicicola*. Une explication pour ce résultat pourrait être liée au fait que l'expression des gènes a été mesurée 14 JAI, soit très tardivement par rapport au début de l'induction des défenses des plantes. Le turnover en GLS est très important à ce stade et les profils de GLS dosés ne correspondent pas à ceux du début de l'interaction. De plus, les tissus des plantules de ces conditions de N, plus affectées par le champignon, subissent des dégâts importants et donc une mise en contact des GLS et des myrosinases, se traduisant par une plus grande consommation de GLS, et donc peut-être un besoin plus important de les renouveler. Il est également possible d'imaginer les plantules les plus riches en ressources N synthétiseraient plus rapidement des composés de défense, et que ce qui est observé à 14 JAI pourrait refléter l'effet d'un décalage temporel de l'induction des défenses de la plante.

Un facteur d'explication de ces résultats pourrait être lié aux myrosinases. Ces enzymes, TGG1 et TGG2 chez *Arabidopsis*, sont capables d'hydrolyser les GLS, ce qui est absolument nécessaire à l'expression de leur activité biologique, contre les pathogènes notamment (Xue *et al.*, 1995 ; Andersson *et al.*, 2009). La présence du champignon a un effet négatif sur l'expression du gène *TGG1* pour les deux conditions sensibles 0,1 mM NO_3^- et 5 mM NH_4^+ . L'expression des deux gènes *TGG1* et *TGG2* est par contre induite par la condition 5 mM NO_3^- . Enfin, l'expression de *TGG2* est influencée par le génotype des plantules, elle est plus importante chez Col-0 que chez *Ler*. Contrairement aux GLS, les teneurs en myrosinases n'augmentent pas nécessairement à la suite de l'infection par un pathogène (Siemens & Mitchell-Olds, 1998), il n'est donc pas surprenant qu'il n'y ait pas d'augmentation de l'expression de ces gènes en présence du champignon. L'expression plus importante des gènes codant pour les myrosinases en condition 5 mM NO_3^- est par contre en contradiction avec la littérature, TGG1 et TGG2 étant d'après Marino *et al.* (2016) plus abondantes chez *A. thaliana* en condition NH_4^+ par rapport à NO_3^- . Enfin, que ce soit pour le milieu azoté (5 mM NO_3^-) ou le génotype (Col-0), l'induction de l'expression des gènes codant des myrosinases semble corrélée à une plus faible sensibilité des plantules au champignon *A. brassicicola*. Ces résultats suggèrent que les différences de sensibilité observées pourraient être en partie liées à l'activité des GLS permise par les myrosinases.

En conclusion, le profil des teneurs en tryptophane (plus élevée en condition NH_4^+ et moins élevées en condition NO_3^-) à 14 JAI pourrait ne pas être liée à une synthèse plus importante de la camalexine et des GLS indoliques en condition de NO_3^- , l'expression des gènes de synthèse de ces derniers étant globalement plus faible dans ces conditions de N. L'expression de *CYP71B15* étant induite en présence d'*A. brassicicola*, il est possible de faire l'hypothèse d'un rôle de la camalexine dans les défenses de la plante face au champignon. Sur la base des profils d'expression des gènes étudiés, les GLS indoliques semblent également accumulés en présence du champignon, et donc jouer un rôle dans les défenses de la plante face au champignon. Les gènes de leur biosynthèse sont cependant plus exprimés dans les conditions de N les plus sensibles ce qui semble contradictoire. Il est tout de même possible de relier les GLS et la condition 5 mM NO_3^- grâce aux myrosinases qui sont plus exprimées dans cette condition et semblent très liées au succès de la plante face à *A. brassicicola*. Il faudrait doser les GLS et la camalexine dans les plantules pour élucider leur rôle dans l'interaction biotique, ce qui n'a pu être effectué par manque de matériel biologique. Il serait aussi intéressant d'évaluer les teneurs en myrosinase par immunoélectrophorèse et leur activité, en mesurant la consommation d'un de leur substrat, comme la sinigrine, par spectrophotométrie (Barth & Jander, 2006 ; Marino *et al.*, 2016).

Annexes

Tableau S1 : Séquence des amorces pour l'amplification par RT-qPCR. (a) gènes d'*A. thaliana*, (b) gènes d'*A. brassicicola*.

(a) gènes d'*A. thaliana*

Gène	Séquence amorce Forward	Séquence amorce Reverse
<i>AtActine</i>	GGTAACATTGTGCTCAGRGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
<i>AtUBQ1</i>	TTCCTTGATGATGCTTGCTC	TTGACAGCTCTTGGGTGAAG
<i>AtACL5</i>	TGGGAAAATGCAAAGTGCTG	ATAACAACCTTTCTCGATCGTCGTGT
<i>AtADC1</i>	GTGGTGATAAGGGGAACGACA	CAACCGAAATAAGACCAATTCTCAT
<i>AtADC2</i>	GCGATGGACCACACAGCTT	AGAACATCCGCTGAGGACTGA
<i>AtAMT1.1</i>	ACGACATTATCAGTCGC	CTGTCCTGTGTAGATTAACG
<i>AtAMT2.1</i>	AGAAGATGAGATGGCAGGAATG	AAACAGTCAAGGTCGGTGTAG
<i>AtCYP71B15</i>	AACCCACCATTAAGGAGC	TCATAAAATATATACGGCGTCG
<i>AtCYP79B2</i>	CTCGCGAGACTTCTTCAAGG	CCATAACCAACGGTTTAGCC
<i>AtCYP79B3</i>	ACGTACGGCGAGGATAATTC	CAAAGGACCAAACCGAAC
<i>AtCYP81F2</i>	TGGCTATGCGTAAACTCGTG	CCGGTAAACTTCAAATGGTG
<i>AtCYP83B1</i>	TTCATGAACGAGCACAAAGG	CATTGCAATCCCAAGATGC
<i>AtMYB51</i>	TCGAACTTTGACGTTGATGG	CGAAATTATCGCAGTACATTAGAGG
<i>AtNPF6.3</i>	AAAGCTGCCACACACTGAAC	ATTGTGCGACTGATAATGTCTG
<i>AtPAO1</i>	GCTCTAACATTCTGGTGGTGACG	CCCAAACATGTCCCTGAGAACAC
<i>AtPAO3</i>	ACAAACCTCACGACCTCTATG	TCAAGCACACGCATCCTG
<i>AtPAO4</i>	GGGAACAGTGACATTCTCGAAAC	AATTGGAACCCTGCTTCTGTCTG
<i>AtPDF1.2</i>	TTGCTGCTTTTCGACGCA	TGTCCCCTTGGCTTCTCG
<i>AtPR1</i>	GGTTAGCGAGAAGGCTAACTAC	CATCCGAGTCTCACTGACTTTC
<i>AtSPDS1</i>	GGATCCTCGCGTGAACCTT	CGTATGATCCTTCAGCAGCATTC
<i>AtSPDS2</i>	AATCGGTCCAGCAAAGAGC	GGTCCAAGCGTAGTTAACAGATCC
<i>AtSPMS</i>	TGCTGCTGAGTTCCTCCGTA	AGCAGGACCTACGGGATCTG
<i>AtST5a</i>	ATGGCTGCTCGTATTGATGG	CCGCACCAAATAACAGAAGG
<i>AtTGG1</i>	GTTGGTGATCGGCTTCCAGA	GAGAGTTGTGCGTGAGTCCA
<i>AtTGG2</i>	GGCTTCACTCACCGATACCC	AGGCGTTATGTTCTTGCGA

(b) gènes d'*A. brassicicola*

Gène	Séquence amorce Forward	Séquence amorce Reverse
<i>AbActine</i>	GGCAACATTGTCATGTCTGG	GAGCGAAGCAAGAATGGAAC
<i>AbTubuline</i>	TTCAACGAAGCCTCCAACAAC	GTGCCGGGCTCGAGAT
<i>Ab05765.1</i>	CCTCGTTGGCACCTTCTTCT	CTTTGGGCCAGTAAGAGGGG
<i>Ab08716.1</i>	GCTTTGTGCGCCGATGTCATC	TGAGGTACGAGCGCAAAGTT
<i>Ab09447.1</i>	GTCGTAATCATGGGTCGGTC	ATAAGGGAGAGGGCGGACTT
<i>AbAREA</i>	CCCTGCTACTTGGAGTCGAG	ATGGTGCTTCTCTGTCACC
<i>AbChymotrypsine</i>	CGGTACCACTGGAAACACT	TGGGTGAGACCAGTAACACG
<i>AbGST1</i>	GCCCTAGTCACCGGAAACATC	CGACGCCGTTGGTAATGG

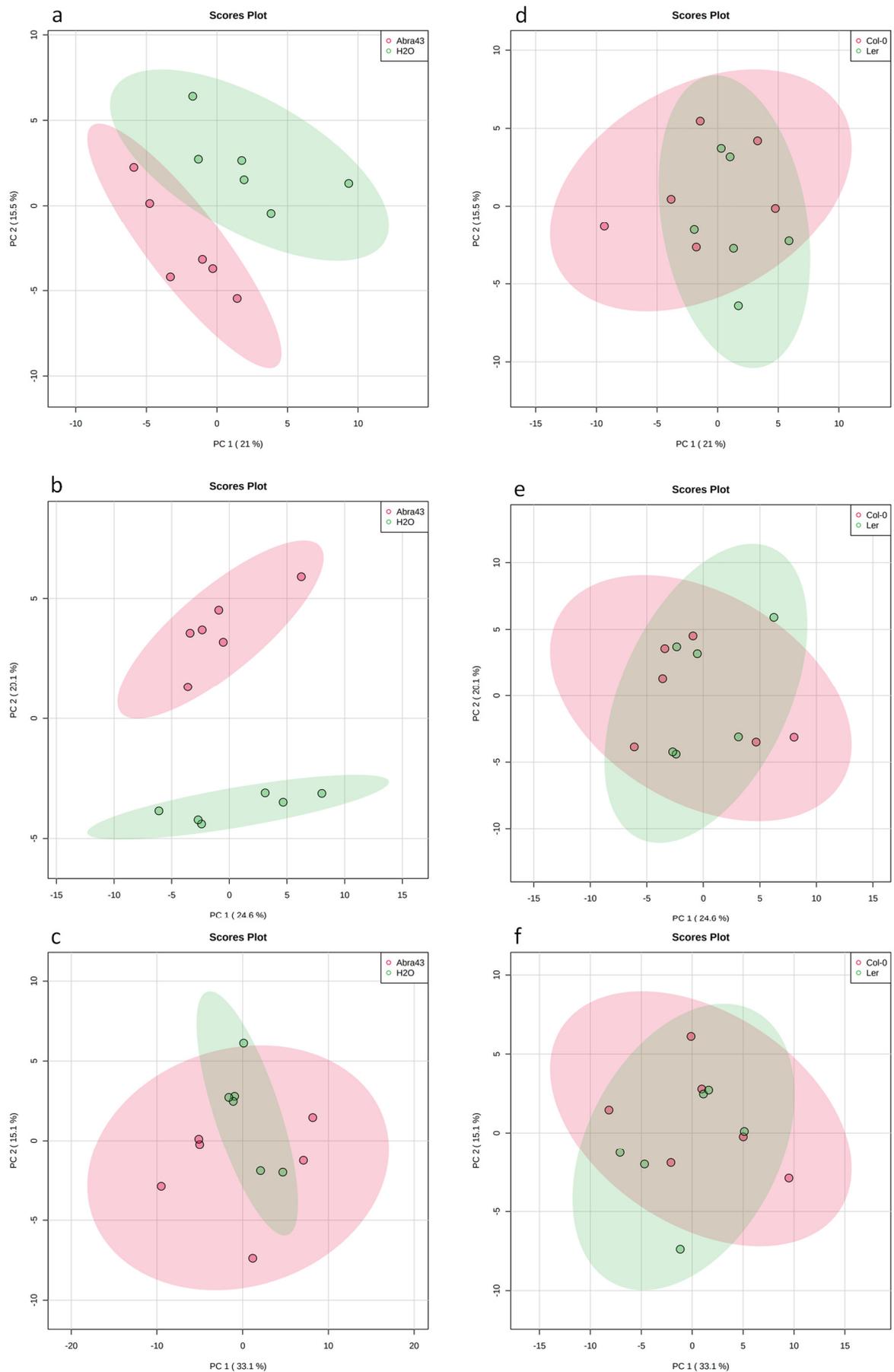


Figure S1 : Analyse en Composantes Principales des teneurs en métabolites (AA, AO, sucres, polyamines) comparant les conditions d'inoculation et de génotype au sein des différents milieux azotés. Comparaison entre échantillons traités par H2O et inoculés par Abra43, (a) au sein de la condition 5 mM NH_4^+ , (b) au sein de la condition 0,1 mM NO_3^- , (c) au sein de la condition 5 mM NO_3^- . Comparaison entre échantillons Col-0 et Ler, (d) au sein de la condition 5 mM NH_4^+ , (e) au sein de la condition 0,1 mM NO_3^- , (f) au sein de la condition 5 mM NO_3^- . Chaque point représente un échantillon, correspondant à la moyenne des dosages de métabolites dans une condition de génotype, d'inoculation et de nutrition azotée.

IV.5. Conclusion

Les expériences présentées dans ce chapitre ont tout d'abord montré que les résultats relatifs à la sensibilité des plantules d'*A. thaliana* à *A. brassicicola*, en fonction la condition nutritive azotée, et cultivées grâce au dispositif expérimental développé (Barrit *et al.* soumis) sont cohérents avec ceux présentés dans le chapitre 2. On retrouve en effet dans ces expérimentations que les plantules cultivées en condition 5 mM NO₃⁻ présentent plus de développement aérien et moins de sensibilité au pathogène, et que les plantules de *Ler* sont plus sensibles au pathogène que celles de Col-0. Ceci témoigne de la répétabilité des résultats obtenus grâce au dispositif. Dans le but d'expliquer ces différences de sensibilité au champignon, le profilage métabolique des plantules a été effectué. Ces analyses, centrées sur les métabolites du métabolisme primaire du C et du N et sur certains métabolites secondaires associés à la défense de la plante (polyamines, camalexine, GLS), ont permis d'élaborer des hypothèses concernant le rôle du N dans la variation de la sensibilité des plantules.

Premièrement, les tissus des plantules cultivées en condition 5 mM NO₃⁻ sont, logiquement, les plus riches en nitrate. Ce résultat pourrait être liée à leur sensibilité plus faible par une plus grande production de NO (à partir du nitrite), un molécule signal très importante dans la régulation des défenses des plantes face aux organismes pathogènes. Le dosage du NO dans les plantules semble donc nécessaire à la poursuite de l'étude de l'effet du N sur cette interaction. Ensuite, certains composés du métabolisme C se distinguent également. Les AO du cycle de Krebs sont très abondants dans les plantules des deux conditions NO₃⁻ en absence du champignon, mais leurs teneurs chutent en présence du champignon dans le cas de la condition 0,1 mM NO₃⁻. Ce résultat pourrait être dû, soit à une consommation de ces métabolites par le champignon, soit à une chute de leur production causée par l'impact très fort du champignon dans cette condition. Les teneurs en certains métabolites liés à la glycolyse sont corrélées à l'impact du champignon sur les plantules ; ces composés pourraient être importants dans l'interaction notamment en participant à l'induction de la réponse hypersensible qui peut être bénéfique pour le pathogène dans le cas d'un organisme nécrotrophe.

Pour ce qui est de l'expression des gènes de défense, l'expression du gène *PDF1.2*, un marqueur de la voie du JA, est plus élevée chez le génotype Col-0, ce qui pourrait contribuer à sa moindre sensibilité au champignon.

Les polyamines semblent jouer un rôle important dans l'interaction et dans l'effet de la condition azotée sur celle-ci. La nature exacte de ce rôle est par contre plus difficile à définir tant les effets des polyamines décrits dans la littérature sont contradictoires : la conjugaison des polyamines favorise la défense d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*, tandis que leur oxydation aurait *a priori* un effet opposé. Les polyamines sont plus abondantes dans les deux conditions de N étudiées favorisant le développement de la maladie, ce qui laisse cependant penser qu'elles favoriseraient plutôt le champignon dans l'interaction. Les métabolites secondaires de défense

dérivés du tryptophane, camalexine et GLS indoliques, semblent également avoir un rôle, les gènes de leurs voies de biosynthèse étant induits en présence du champignon. Il a été montré dans notre étude que les gènes de la voie des GLS indoliques, connus pour leur rôle dans la défense d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*, étaient sous exprimés dans la condition de N favorisant la plante par rapport au champignon (concentration de NO_3^- élevée), ce qui est inattendu. Il est tout de même possible de relier l'activité biologique des GLS à cette condition de N. Elle est en effet dépendante des myrosinases dont les gènes sont plus exprimés dans cette condition de N, et semblent donc liées au succès de la plante face à *A. brassicicola*. Les dosages effectués dans les graines ont permis de révéler de nombreuses différences métaboliques entre les graines des deux génotypes. Se sont notamment distinguées l'abondance plus élevée de composés azotés (NO_3^- et AA) dans les graines du génotype sensible, et la présence dans les graines du génotype moins sensible de GLS indoliques, permettant cette fois encore de relier sensibilité réduite et GLS indoliques. Les GLS n'ont pas été dosés au stade plantule par manque de matériel biologique, il apparaît pourtant crucial de le faire pour approfondir l'étude de leur rôle. De même, il serait intéressant de doser les myrosinases et leur activité dans les différentes conditions étudiées.

Enfin, les résultats ont été obtenus 14 jours après l'inoculation, et une étude cinétique semble nécessaire afin de visualiser l'évolution des teneurs métaboliques et l'induction des voies de défense au cours du temps. Il serait particulièrement intéressant d'étudier l'interaction très précocement (sur des graines imbibées, quelques heures ou un jour après inoculation par exemple), afin de visualiser les premiers changements métaboliques effectués par la plante en réponse à l'infection par le champignon.

Conclusion générale et perspectives

L'azote, en plus d'être l'un des macronutriments les plus importants pour les plantes, a également un rôle central et complexe (dépendant de sa forme et de sa concentration) dans les interactions entre plantes et pathogènes. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'étudier, dans un premier temps au stade rosette, l'effet du régime de nutrition azotée (NO_3^- vs NH_4^+) de la plante sur la sensibilité de la plante modèle des Brassicacées *A. thaliana* au champignon nécrotrophe *A. brassicicola*. Cette étude a permis de mettre en évidence, sur un génotype (Col-0), que la nutrition NO_3^- (5 mM) augmente la sévérité des symptômes causés par *A. brassicicola* sur les feuilles d'*A. thaliana* au stade rosette (Barrit *et al.*, 2022), comparée à la nutrition NH_4^+ (5 mM). Trois aspects principaux ont été retenus pour expliquer cette sensibilité plus élevée de la plante en condition NO_3^- . Premièrement, la plus faible sensibilité au champignon des plantes cultivées en condition NH_4^+ pourrait s'expliquer par une modulation des teneurs en NH_4^+ de la plante. En effet, l'induction des gènes codant pour des transporteurs de NH_4^+ et la baisse significative des concentrations de NH_4^+ dans les feuilles en présence du champignon, suggèrent l'existence d'un transport de NH_4^+ dans la plante, des parties malades vers les parties saines, privant potentiellement le pathogène de ressources azotées. Deuxièmement, l'existence d'une interaction significative entre la source de N et l'infection par le champignon a été montrée sur les teneurs totales en AA, la nutrition N reconfigurant de plus les profils des principaux AA. Typiquement, une teneur plus élevée en AA totaux est observée en condition de nutrition NH_4^+ par rapport à une nutrition avec du NO_3^- , principalement due à une hausse des concentrations en asparagine et en glutamine. Les plantes cultivées sur du NO_3^- se distinguent par le glutamate qui est le seul AA dont la teneur augmente significativement après l'inoculation fongique. Ces changements de statut nutritionnel des plantes au stade rosette pourraient jouer un rôle dans leur sensibilité au champignon, en lui fournissant des sources de nutrition plus ou moins faciles à assimiler ou en étant responsables d'une modulation des voies de défense. Les AA sont également des précurseurs de métabolites secondaires liés aux défenses de la plante (polyamines, phytoalexines, phytoanticipines) et il serait intéressant d'étudier leur devenir dans les rosettes. Enfin, la nutrition des plantes avec du NO_3^- entraîne une production plus importante de NO, dépendante de la NR, qui, au-delà de son rôle connu dans l'induction des voies de défenses (Delledonne *et al.*, 1998 ; Durner *et al.*, 1998), pourrait affecter le métabolisme de la plante, facilitant ainsi l'infection fongique. Il faudrait améliorer notre compréhension de l'impact du NO dans les réponses de défense dans le cas de notre pathosystème, lié notamment à l'effet des modifications post-traductionnelles (nitration des tyrosines et S-nitrosylation) des protéines impliquées dans la réponse de défense et dans le métabolisme azoté et carboné des plantes.

Nous avons ensuite étudié le rôle de la nutrition azotée (différentes formes et concentrations) sur l'interaction entre *A. thaliana* et *A. brassicicola* au stade plantule, l'étude à ce stade étant inédite et d'un intérêt particulier. Nous avons pour cela développé un nouveau dispositif *in vitro* en condition stérile permettant d'étudier l'impact du champignon sur la croissance des plantules d'*A. thaliana*, tout en modulant la nutrition azotée (Barrit *et al.*, soumis). Un protocole spécifique d'analyse d'image semi-automatique a été développé pour quantifier l'impact du champignon sur le développement des plantules (parties aériennes). Il a permis de calculer un indice prenant indirectement en compte tous les aspects de l'impact du champignon sur les parties aériennes (à savoir la mort des plantules, les surfaces nécrosées et le retard de développement des plantules induit par la présence du champignon), mettant ainsi en évidence l'influence de la nutrition azotée sur l'infection fongique au stade plantule. Les plantules cultivées en condition NH_4^+ et en concentration faible de NO_3^- (0,1 mM) se sont révélées plus sensibles au champignon que celles cultivées à une concentration élevée de NO_3^- (5 mM). Cette étude au stade plantule a été réalisée avec trois génotypes, et a permis de mettre en évidence la sensibilité plus importante du génotype *Ler* au champignon, par rapport aux deux génotypes Col-0 et *Ws*. La vitesse de germination des graines pourrait participer à la plus grande sensibilité de *Ler* au stade plantule, sa germination étant en effet plus lente que celle des deux autres génotypes, entraînant potentiellement un retard dans son développement et dans l'induction de ses réponses de défenses. Cette hypothèse liée à l'influence de la vitesse de germination pourrait être vérifiée en comparant la sensibilité au champignon de plantules provenant de graines du même génotype germant à des vitesses différentes (graines du même lot stratifiées ou non, graines de lots différents variant en qualité). Afin de comparer l'influence de la nutrition azotée entre les stades plantule et adulte (rosette), une nouvelle analyse, complémentaire à la première (Barrit *et al.*, 2022) a été effectuée sur des plantes adultes au stade rosette, avec les mêmes génotypes et dans les mêmes conditions de nutrition que pour les plantules. Cette analyse élargie confirme les résultats de la première étude précédente. Ainsi, les plantes adultes sont moins sensibles à *A. brassicicola* en condition NH_4^+ par rapport aux conditions de NO_3^- , contrastant fortement avec les résultats obtenus au stade plantule. L'influence de la nutrition azotée sur la sensibilité d'*A. thaliana* à *A. brassicicola* n'avait jamais été étudiée au stade plantule, et son étude a permis de mettre en évidence qu'elle dépend du stade de développement de la plante.

Les métabolismes primaire et secondaire étant d'une importance capitale pour l'effet de N dans l'interaction plante-pathogène, une analyse a été réalisée, ciblée sur les changements métaboliques causés par les différences de nutrition azotée et associés à la sensibilité des plantules dans les différentes conditions de N (variation de concentration et de forme de N). Les génotypes Col-0 et *Ler* ont été choisis pour cette étude, en raison de leur sensibilité contrastée à *A. brassicicola*, *Ler* étant plus sensible au stade plantule comme au stade rosette, résultat possiblement influencé (au stade plantule) par leur différence de vitesse de germination. Les teneurs métaboliques des graines des deux génotypes ont également été analysées, afin d'identifier des métabolites présents initialement dans les graines pouvant contribuer à expliquer les différences génotypiques de sensibilité des plantules au pathogène. L'analyse des

graines a permis de mettre en avant l'existence de nombreuses différences métaboliques entre les graines des deux génotypes. Se sont notamment distinguées l'abondance plus élevée de composés azotés (NO_3^- et AA) dans les graines du génotype sensible (*Ler*), et la présence de glucosinolates indoliques, connus pour leur rôle dans la défense d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*, dans les graines du génotype moins sensible (*Col-0*). Une autre différence génotypique pouvant avantager *Col-0*, à savoir une expression plus forte du gène *PDF1.2* associé à la voie de défense du JA, a été observée dans les plantules. La richesse en nitrate intracellulaire des plantules cultivées en condition 5 mM NO_3^- pourrait, comme chez les rosettes, être associée à une production importante de NO. L'étude de ce métabolite semble donc nécessaire à la poursuite de l'analyse de l'influence du N sur la sensibilité au stade plantule. Ensuite, certains composés du métabolisme C se distinguent également. Les AO du cycle de Krebs sont très abondants dans les plantules des deux conditions NO_3^- en absence du champignon, mais leurs teneurs chutent en présence du champignon dans le cas de la condition 0,1 mM NO_3^- . Ce résultat pourrait être dû, soit à une consommation de ces métabolites par le champignon, soit à une chute de leur production causée par l'impact très fort du champignon dans cette condition. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en évaluant leur production dans les plantules. Les polyamines, dont les teneurs varient en fonction des conditions azotées, semblent jouer un rôle important dans l'interaction. La teneur exacte de ce rôle est par contre plus difficile à percevoir tant les effets que les polyamines peuvent avoir sont opposés, la conjugaison des polyamines favorisant la défense d'*A. thaliana* face à *A. brassicicola*, tandis que leur oxydation aurait un effet opposé. L'abondance des polyamines dans les deux conditions de N (5 mM NH_4^+ et 0,1 mM NO_3^-) augmentant la sensibilité de la plante au champignon laisse cependant penser qu'elles favoriseraient le champignon dans l'interaction. Il serait intéressant d'étudier l'évolution des teneurs en polyamines conjuguées par HPLC, et l'expression des gènes liés à leur conjugaison (comme *AtACT* par exemple), en fonction de la nutrition azotée, du génotype et de la présence / absence du champignon, afin d'élucider leur rôle dans l'interaction. Les métabolites secondaires de défense dérivés du tryptophane, la camalexine et les glucosinolates, semblent également avoir un rôle, les gènes de leurs voies de biosynthèse étant induits en présence de *A. brassicicola*. Il a été montré que les gènes de la voie des glucosinolates indoliques étaient sous exprimés dans la condition de N favorisant la plante par rapport au champignon (concentration de NO_3^- élevée), ce qui est inattendu. Il est tout de même possible de relier l'activité biologique des glucosinolates à cette condition de N, cette première étant dépendante des myrosinases dont les gènes sont plus exprimés en présence de 5 mM NO_3^- et semblant donc liées au succès de la plante face à *A. brassicicola*. Les dosages de glucosinolates et de camalexine, qui ont pu être effectués dans les graines mais pas dans les plantules ou dans les rosettes faute de quantité de matière suffisante, semblent nécessaires à l'interprétation plus complète des résultats de sensibilité au champignon des plantes, en complément de l'étude de l'expression des gènes réalisée. Il serait aussi intéressant d'évaluer les teneurs en myrosinase par immunoélectrophorèse et leur activité, en mesurant la consommation d'un de leur substrat, comme la sinigrine, par spectrophotométrie. Enfin, l'étude de la myrosinase atypique PEN2 qui est impliquée dans l'hydrolyse de glucosinolates indoliques, pourrait compléter l'étude des myrosinases. Enfin, de nombreux facteurs nous

poussent à étudier l'assimilation du N dans les plantules, que ce soit le NO produit par la NR, les métabolites dérivant d'AA (glucosinolates, polyamines, camalexine), leur production nécessitant des squelettes carbonés provenant du cycle de Krebs.

L'élucidation de l'effet opposé de N sur la sensibilité des plantes au stade rosette et plantule nécessiterait la comparaison complète des métabolismes primaires et secondaires de la plante. Or, les métabolites pour lesquels les teneurs ont été obtenues dans les deux stades de développement (AA, AO, sucres solubles, ions inorganiques), ainsi que les gènes étudiés dans les deux cas (transporteurs de N, gènes de défense) ne sont pas suffisants pour pouvoir tirer une conclusion définitive. Il serait donc nécessaire de compléter les résultats obtenus sur plantule et sur rosette pour obtenir le pool commun de résultats le plus complet possible (NO, métabolisme primaire du N, polyamines, glucosinolates, etc). Il serait également intéressant d'étudier plus en détail les voies de défense de la plante, notamment celles liées au JA et au SA, en lien avec l'induction de ces voies de défense constatées *a priori* via la production de NO dans les rosettes, le catabolisme des polyamines dans les plantules, et l'induction des gènes *PDF1.2* et *PR1*, marqueurs de ces voies, dans les plantules comme dans les rosettes, en condition d'infection par le champignon.

Le rôle de N sur l'interaction a été étudié seulement 7 jours après inoculation dans le cas des rosettes, et 14 jours après inoculation dans le cas des plantules, ce qui est une des limites majeures de ce travail. Il apparaît nécessaire d'observer l'évolution du métabolisme, du développement de la plante et de l'impact du champignon sur celle-ci au cours du temps afin de pouvoir caractériser pleinement l'interaction et l'induction des changements causés par celle-ci. Les réponses de défenses de la plante à la suite immédiate du premier contact avec l'organisme pathogène sont par exemple primordiales, et ne peuvent être évaluées que très précocement. De même, le métabolisme des plantules évolue énormément entre la germination et 14 jours, ce qui rend l'analyse à ce stade difficile à étendre telle quelle aux autres stades de développement. Enfin, l'interaction entre *A. thaliana* et *A. brassicicola* a été principalement caractérisée à travers la plante, alors que le champignon est tout aussi important. Il apparaît de ce fait crucial d'étudier en détail le métabolisme primaire azoté et carboné du champignon, ainsi que l'implication de son métabolisme secondaire dans la pathogénie. Une piste pour l'étude du métabolisme azoté d'*A. brassicicola* pourrait être l'utilisation d'un mutant du gène *AREA*, régulateur potentiel de l'utilisation des sources de N par le champignon.

Ces résultats dans leur ensemble suggèrent qu'une fertilisation composée de NO_3^- pourrait être avantageuse pour l'établissement des cultures de plantes de la famille des Brassicacées, à la fois pour leur développement aérien et racinaire et pour leur résistance aux maladies causées par les champignons nécrotrophes du genre *Alternaria*. Aux stades plus tardifs, une fertilisation à base de NH_4^+ pourrait aider à limiter la maladie des taches noires sur leurs feuilles et la contamination des siliques et des graines par le champignon.

Références bibliographiques

A

- Aceves-García P, Álvarez-Buylla ER, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Muñoz R, Sánchez MD. Root architecture diversity and meristem dynamics in different populations of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 2016 Jun 16;7:858.
- Afanasiev MM, Carlson WE. The relation of phosphorus and nitrogen ratio to the amount of seedling diseases of sugar beets. *American Society of Sugar Beet Technologists*. 1942:407-11.
- Agrawal AA, Karban RI. Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. The ecology and evolution of inducible defenses. 1999;10:000331745.
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*. 2005 Apr;28(4):500-12.
- Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Bitrián M, Tiburcio AF, Altabella T. Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010 Jul 1;48(7):547-52.
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2004 Jul;219(3):479-88.
- Altman A, Levin N. Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. *Physiologia Plantarum*. 1993 Nov;89(3):653-8.
- Andersson D, Chakrabarty R, Bejai S, Zhang J, Rask L, Meijer J. Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry*. 2009 Jul 1;70(11-12):1345-54.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J. Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*. 2016 Mar 4;7:252.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J. Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*. 2016 Mar 4;7:252.
- Arst HN, Cove DJ. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*. 1973 Jun;126(2):111-41.
- Ashton, F.M. Mobilization of Storage Proteins of Seeds. *Annual Review of Plant Physiology*. 1976 27, 95-117.

B

- Bagni N, Tassoni A. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids*. 2001 Apr;20(3):301-17.
- Bak S, Feyereisen R. The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. *Plant physiology*. 2001 Sep;127(1):108-18.
- Bak S, Tax FE, Feldmann KA, Galbraith DW, Feyereisen R. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2001 Jan;13(1):101-11.
- Ballini E, Nguyen TT, Morel J. Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice*. 2013;6:32.

- Bang J, Kim H, Kim H, Beuchat LR, Ryu JH. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on radish seeds by sequential treatments with chlorine dioxide, drying, and dry heat without loss of seed viability. *Applied and environmental microbiology*. 2011 Sep 15;77(18):6680-6.
- Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual review of plant biology*. 2011 Jun 2;62:25-51.
- Barrit T, Porcher A, Cukier C, Satour P, Guillemette T, Limami AM, Teulat B, Campion C, Planchet E. Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the necrotrophic fungus, *Alternaria brassicicola*. *Physiologia Plantarum*. 2022;6:e13621.
- Barth C, Jander G. *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *The Plant Journal*. 2006 May;46(4):549-62.
- Batak I, Dević M, Gibal Z, Grubišić D, Poff KL, Konjević R. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research*. 2002 Dec;12(4):253-9.
- Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002 Feb 1;40(2):151-60.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L. Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*. 2008;6.
- Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*. 2009 Jan 2;323(5910):101-6.
- Bednarek P. Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity. *ChemBioChem*. 2012 Sep 3;13(13):1846-59.
- Bellin D, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Molecular plant-microbe interactions*. 2013 Mar;26(3):271-7.
- Belmas E, Briand M, Kwasiborski A, Colou J, N'Guyen G, Iacomi B, Grappin P, Campion C, Simoneau P, Barret M, Guillemette T. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Alternaria brassicicola* Abra43. *Genome Announcements*. 2018;6(6):e01559-17.
- Ben Hdech D, Aubry C, Alibert B, Beucher D, Prospero JM, Limami AM, Teulat B. Exploring natural diversity of *Medicago truncatula* reveals phenotypes and loci associated with the response of seedling performance to nitrate supply. *Physiologia Plantarum*. 2020 Oct;170(2):227-47.
- Bender J, Celenza JL. Indolic glucosinolates at the crossroads of tryptophan metabolism. *Phytochemistry Reviews*. 2009 Jan;8(1):25-37.
- Bentsink L, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D, Tesnier K, Groot SP, Koornneef M. Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 2000 Dec;124(4):1595-604.
- Bentsink L, Koornneef M. Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*. 2008;6.
- Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, Schiegg M, Ales J, Beier T, Rudy M, Eren K, Cervantes JI, Xu B, Beuttenmueller F, Wolny A, Zhang C, Koethe U, Hamprecht FA, Kreshuk A. ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nature Methods* 2019;16:1226-32.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of experimental botany*. 2007 Dec 1;58(15-16):4019-26.
- Bethke PC, Libourel IG, Jones RL. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*. 2006 Feb 1;57(3):517-26.

- Bewley JD. Seed germination and dormancy. *The plant cell*. 1997 Jul;9(7):1055.
- Bewley JD, Black M. *Seeds: physiology of development and germination*. Springer Science & Business Media; 2013 Jun 29.
- Bones AM, Rossiter JT. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*. 1996 May;97(1):194-208.
- Borrero C, Trillas MI, Delgado A, Avilés M. Effect of ammonium/nitrate ratio in nutrient solution on control of Fusarium wilt of tomato by *Trichoderma asperellum* T34. *Plant Pathology*. 2012;61(1):132-9.
- Bosch FV, Oliver R, Berg FV, Paveley N. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. *Annual Review of Phytopathology*. 2014 Aug 4;52:175-95.
- Botanga CJ, Bethke G, Chen Z, Gallie DR, Fiehn O, Glazebrook J. Metabolite profiling of *Arabidopsis* inoculated with *Alternaria brassicicola* reveals that ascorbate reduces disease severity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012 Dec;25(12):1628-38.
- Bouche N, Fromm H. GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in plant science*. 2004 Mar 1;9(3):110-5.
- Bouguyon E, Brun F, Meynard D, Kubeš M, Pervent M, Leran S, Lacombe B, Krouk G, Guiderdoni E, Zažímalová E, Hoyerová K. Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor NRT1. 1. *Nature Plants*. 2015 Mar 2;1(3):1-8.
- Bouguyon E, Gojon A, Nacry P. Nitrate sensing and signaling in plants. In *Seminars in cell & developmental biology* 2012 Aug 1 (Vol. 23, No. 6, pp. 648-654). Academic Press.
- Brader G, Mikkelsen MD, Halkier BA, Tapio Palva E. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *The Plant Journal*. 2006 Jun;46(5):758-67.
- Brauc S, De Vooght E, Claeys M, Höfte M, Angenon G. Influence of over-expression of cytosolic aspartate aminotransferase on amino acid metabolism and defence responses against *Botrytis cinerea* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*. 2011 Oct 15;168(15):1813-9.
- Breimer T. Environmental factors and cultural measures affecting the nitrate content in spinach. *Fertilizer research*. 1982 Sep;3(3):191-292.
- Britto DT, Kronzucker HJ. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*. 2002;159(6):567-84.
- Brown A, Heckman RW. Light alters the impacts of nitrogen and foliar pathogens on the performance of early successional tree seedlings. *PeerJ*. 2021;9:e11587.
- Brown PD, Tokuhisa JG, Reichelt M, Gershenzon J. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 2003 Feb 1;62(3):471-81.
- Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alschner A. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline?. *Scientific reports*. 2013 Jan 24;3(1):1-4.

C

- Caddick MX, Peters D, Platt A. Nitrogen regulation in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1994 Sep;65(3):169-77.
- Calmes B, Morel-Rouhier M, Bataillé-Simoneau N, Gelhaye E, Guillemette T, Simoneau P. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicicola*. *BMC microbiology*. 2015 Dec;15(1):1-0.

- Camanes G, Pastor V, Cerezo M, García-Andrade J, Vicedo B, García-Agustín P, Flors V. A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant physiology*. 2012 Feb;158(2):1054-66.
- Carbonell J, Blázquez MA. Regulatory mechanisms of polyamine biosynthesis in plants. *Genes & Genomics*. 2009 Apr;31(2):107-18.
- Castro Marín I, Loef I, Bartetzko L, Searle I, Coupland G, Stitt M, Osuna D. Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*. 2011 Mar;233(3):539-52.
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikkh H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J. The *Arabidopsis* ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant physiology*. 2005 Jan;137(1):253-62.
- Celenza JL. Metabolism of tyrosine and tryptophan—new genes for old pathways. *Current opinion in plant biology*. 2001 Jun 1;4(3):234-40.
- Chanda B, Xia YE, Mandal MK, Yu K, Sekine KT, Gao QM, Selote D, Hu Y, Stromberg A, Navarre D, Kachroo A. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature genetics*. 2011 May;43(5):421-7.
- Chi WJ, Wang ZY, Liu JM, Zhang C, Wu YH, Bai YJ. Ammonium uptake and assimilation are required for rice defense against sheath blight disease. *Cereal Research Communications*. 2019 Mar;47(1):98-110.
- Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant and Cell Physiology*. 2004 Sep 15;45(9):1139-48.
- Cho Y, Davis JW, Kim KH, Wang J, Sun QH, Cramer Jr RA, Lawrence CB. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. *Molecular plant-microbe interactions*. 2006 Jan;19(1):7-15.
- Cho Y. How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* kills plant cells remains an enigma. *Eukaryotic cell*. 2015 Apr;14(4):335-44.
- Coghlan SE, Walters DR. Polyamine metabolism in 'green-islands' on powdery mildew-infected barley leaves: possible interactions with senescence. *New phytologist*. 1990 Nov;116(3):417-24.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. Reactive oxygen species production in the plant apoplastic environment. *Trends in Plant Science*. 2006;2(11):80-8.
- Cools HJ, Fraaije BA. Are azole fungicides losing ground against *Septoria* wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*. 2008 Jul;64(7):681-4.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*. 2006 Feb 1;57(3):449-59.
- Cowley T, Walters DR. Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Plant, Cell & Environment*. 2002 Mar;25(3):461-8.
- Crawford NM. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The plant cell*. 1995 Jul;7(7):859.

D

- de Montaignu A, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E. A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*. 2010 May;22(5):1532-48.

- Debeaujon I, Koornneef M. Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant physiology*. 2000 Feb;122(2):415-24.
- Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F. Characterization of the Nrt2. 6 gene in Arabidopsis thaliana: a link with plant response to biotic and abiotic stress.
- Deep S, Sharma P, Behera N. Optimization of extracellular cellulase enzyme production from *Alternaria brassicicola*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014;3(9):127-39.
- Delahaie, J. Comparaison moléculaire des graines orthodoxes de *Medicago truncatula* et récalcitrantes de *Castanospermum australe* : une nouvelle approche pour comprendre l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. *Biologie végétale*. Université d'Angers. 2013.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. 1998 Aug;394(6693):585-8.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Nov 6;98(23):13454-9.
- Dickman MB, Patil SS. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. *Physiological and molecular plant pathology*. 1986 Mar 1;28(2):235-42.
- Dietrich R, Ploss K, Heil M. Constitutive and induced resistance to pathogens in Arabidopsis thaliana depends on nitrogen supply. *Plant, Cell & Environment*. 2004 Jul;27(7):896-906.
- Divon HH, Fluhr R. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS microbiology letters*. 2007 Jan 1;266(1):65-74.
- Divon HH, Ziv C, Davydov O, Yarden O, Fluhr R. The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Molecular plant pathology*. 2006 Nov;7(6):485-97.
- Dobermann A, Cassman KG. Plant nutrient management for enhanced productivity in intensive grain production systems of the United States and Asia. *Plant and soil*. 2002 Nov;247(1):153-75.
- Dong X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*. 1998 Aug 1;1(4):316-23.
- Dordas C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*. 2008 Mar;28(1):33-46.
- Douglas Grubb C, Zipp BJ, Ludwig-Müller J, Masuno MN, Molinski TF, Abel S. Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *The Plant Journal*. 2004 Dec;40(6):893-908.
- Du L, Halkier BA. Biosynthesis of glucosinolates in the developing silique walls and seeds of *Sinapis alba*. *Phytochemistry*. 1998 Aug 1;48(7):1145-50.
- Du L, Lykkesfeldt J, Olsen CE, Halkier BA. Involvement of cytochrome P450 in oxime production in glucosinolate biosynthesis as demonstrated by an in vitro microsomal enzyme system isolated from jasmonic acid-induced seedlings of *Sinapis alba* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995 Dec 19;92(26):12505-9.
- Duffy BK, Défago G. Macro-and microelement fertilizers influence the severity of *Fusarium* crown and root rot of tomato in a soilless production system. *HortScience*. 1999 Apr 1;34(2):287-91.
- Dulermo T, Bligny R, Gout E, Cotton P. Amino acid changes during sunflower infection by the necrotrophic fungus *B. cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*. 2009 Sep 1;4(9):859-61.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Aug 18;95(17):10328-33.

E

- Edreva A. Tobacco polyamines as affected by stresses induced by different pathogens. *Biologia Plantarum*. 1997 Sep;40(2):317-20.
- El Amrani A, Couée I, Berthomé R, Ramel F, Gouesbet G, Sulmon C. Involvement of polyamines in sucrose-induced tolerance to atrazine-mediated chemical stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*. 2019 Jul 1;238:1-1.
- Entry JA, Cromack Jr K, Hansen E, Waring R. Response of western coniferous seedlings to infection by *Armillaria ostoyae* under limited light and nitrogen. *Phytopathology*. 1991;81(1):89-94.

F

- Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004 Apr;17(4):343-50.
- Fagard M, Launay A, Clément G, Courtial J, Dellagi A, Farjad M, Krapp A, Soulié MC, Masclaux-Daubresse C. Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of experimental botany*. 2014 Oct 1;65(19):5643-56.
- Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*. 2017 Apr;40(4):462-72.
- Federico R, Angelini R. Polyamine catabolism in plants. *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*. 1991 Dec 20;41:56.
- Fernández-Crespo E, Scalschi L, Llorens E, García-Agustín P, Camañes G. NH₄⁺ protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by activation of systemic acquired acclimation. *Journal of Experimental Botany*. 2015 Nov 1;66(21):6777-90.
- Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *The Plant Journal*. 2003 Jul;35(2):193-205.
- Fincato P, Moschou PN, Spedaletti V, Tavazza R, Angelini R, Federico R, Roubelakis-Angelakis KA, Tavladoraki P. Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *Journal of Experimental Botany*. 2011 Jan 1;62(3):1155-68.
- Finch-Boekweg H, Allen P, Meyer S. Exposure to low water potentials and seed dormancy favour the fungus in the *Pyrenophora semeniperda*-*Bromus tectorum* pathosystem. *Plant Protection Science*. 2013 Nov 19;49(Special Issue):S15-21.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*. 2002 May;14(suppl_1):S15-45.
- Fleischmann F, Raidl S, Osswald WF. Changes in susceptibility of beech (*Fagus sylvatica*) seedlings towards *Phytophthora citricola* under the influence of elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilization. *Environmental pollution*. 2010 Apr 1;158(4):1051-60.
- Focks N, Benning C. wrinkled1: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant physiology*. 1998 Sep 1;118(1):91-101.
- Forde BG, Lea PJ. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of experimental botany*. 2007 Jul 1;58(9):2339-58.
- Forde BG. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2000 May 1;1465(1-2):219-35.
- Frerigmann H, Gigolashvili T. MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*. 2014 May 1;7(5):814-28.

Frerigmann H, Piślewska-Bednarek M, Sánchez-Vallet A, Molina A, Glawischnig E, Gigolashvili T, Bednarek P. Regulation of pathogen-triggered tryptophan metabolism in *Arabidopsis thaliana* by MYB transcription factors and indole glucosinolate conversion products. *Molecular Plant*. 2016 May 2;9(5):682-95.

Fu YH, Marzluf GA. Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and cellular biology*. 1987 May;7(5):1691-6.

Fu YH, Marzluf GA. Metabolic control and autogenous regulation of nit-3, the nitrate reductase structural gene of *Neurospora crassa*. *Journal of bacteriology*. 1988 Feb;170(2):657-61.

Fu YH, Marzluf GA. nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Molecular and Cellular Biology*. 1990 Mar;10(3):1056-65.

Fuell C, Elliott KA, Hanfrey CC, Franceschetti M, Michael AJ. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010 Jul 1;48(7):513-20.

G

Galloway GL, Malmberg RL, Price RA. Phylogenetic utility of the nuclear gene arginine decarboxylase: an example from Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution*. 1998 Oct 1;15(10):1312-20.

Gamir J, Pastor V, Kaefer A, Cerezo M, Flors V. Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *The Plant Journal*. 2014 Apr;78(2):227-40.

Gao K, Zhou T, Hua Y, Guan C, Zhang Z. Transcription factor WRKY23 is involved in ammonium-induced repression of *Arabidopsis* primary root growth under ammonium toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020 May 1;150:90-8.

Gebauer P, Korn M, Engelsdorf T, Sonnewald U, Koch C, Voll LM. Sugar accumulation in leaves of *Arabidopsis* sweet11/sweet12 double mutants enhances priming of the salicylic acid-mediated defense response. *Frontiers in Plant Science*. 2017 Aug 8;8:1378.

Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe RG, Sattelmacher B. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 1997;160(2):239-51.

Gigolashvili T, Berger B, Mock HP, Müller C, Weisshaar B, Flügge UI. The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 2007 Jun;50(5):886-901.

Gigolashvili T, Engqvist M, Yatusovich R, Müller C, Flügge UI. HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2008 Feb;177(3):627-42.

Glawischnig E, Hansen BG, Olsen CE, Halkier BA. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 May 25;101(21):8245-50.

Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 2005 Jul 28;43:205-27.

Glazebrook J, Ausubel FM. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Sep 13;91(19):8955-9.

Glazebrook J, Zook M, Mert F, Kagan I, Rogers EE, Crute IR, Holub EB, Hammerschmidt R, Ausubel FM. Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics*. 1997 May 1;146(1):381-92.

- Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E. Nitrate transceptor (s) in plants. *Journal of experimental botany*. 2011 Apr 1;62(7):2299-308.
- Goldberg, R. B., De Paiva, G., and Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266, 605-614.
- Gong X, Fu Y, Jiang D, Li G, Yi X, Peng Y. L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genetics and Biology*. 2007 Dec 1;44(12):1368-79.
- Gonzalez ME, Marco F, Minguet EG, Carrasco-Sorli P, Blázquez MA, Carbonell J, Ruiz OA, Pieckenstein FL. Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*. 2011 Aug;156(4):2266-77.
- González-Hernández AI, Fernández-Crespo E, Scalschi L, Hajirezaei MR, von Wirén N, García-Agustín P, Camañes G. Ammonium mediated changes in carbon and nitrogen metabolisms induce resistance against *Pseudomonas syringae* in tomato plants. *Journal of plant physiology*. 2019 Aug 1;239:28-37.
- Gorfer M, Blumhoff M, Klaubauf S, Urban A, Inselsbacher E, Bandian D, Mitter B, Sessitsch A, Wanek W, Strauss J. Community profiling and gene expression of fungal assimilatory nitrate reductases in agricultural soil. *The ISME Journal*. 2011 Nov;5(11):1771-83.
- Gould J, Northcote DH. Cell-cell recognition of host surfaces by pathogens. The adsorption of maize (*Zea mays*) root mucilage by surfaces of pathogenic fungi. *Biochemical journal*. 1986 Jan 15;233(2):395-405.
- Guan M, de Bang TC, Pedersen C, Schjoerring JK. Cytosolic glutamine synthetase Gln1; 2 is the main isozyme contributing to GS1 activity and can be up-regulated to relieve ammonium toxicity. *Plant Physiology*. 2016 Jul;171(3):1921-33.
- Guo S, Zhou Y, Shen Q, Zhang F. Effect of ammonium and nitrate nutrition on some physiological processes in higher plants-growth, photosynthesis, photorespiration, and water relations. *Plant Biology*. 2007 Jan;9(01):21-9.
- Gupta KJ, Brotman Y, Segu S, Zeier T, Zeier J, Persijn ST, Cristescu SM, Harren FJ, Bauwe H, Fernie AR, Kaiser WM. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco. *Journal of Experimental Botany*. 2013 Jan 1;64(2):553-68.

H

- Halkier BA, Du L. The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in plant science*. 1997 Nov 1;2(11):425-31.
- Hansen BG, Halkier BA. New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2005 Jul;221(5):603-6.
- Hansen CH, Du L, Naur P, Olsen CE, Axelsen KB, Hick AJ, Pickett JA, Halkier BA. CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jan 1;276(27):24790-6.
- Hao DL, Zhou JY, Yang SY, Qi W, Yang KJ, Su YH. Function and regulation of ammonium transporters in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jan;21(10):3557.
- Harris CR, Millman KJ, van der Walt SJ, Gommers R, Virtanen P, Cournapeau D, Wieser E, Taylor J, Berg S, Smith NJ, Kern R, Picus M, Hoyer S, van Kerkwijk MH, Brett M, Haldane A, Del Río JF, Wiebe M, Peterson P, Gérard-Marchant P, Sheppard K, Reddy T, Weckesser W, Abbasi H, Gohlke C, Oliphant TE. Array programming with NumPy. *Nature*. 2020;585:357-62.
- Harun S, Abdullah-Zawawi MR, Goh HH, Mohamed-Hussein ZA. A comprehensive gene inventory for glucosinolate biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020 Jun 17;68(28):7281-97.

- Hashimoto M, Higuchi Y, Takahashi S, Osada H, Sakaki T, Toyomasu T, Sassa T, Kato N, Dairi T. Functional analyses of cytochrome P450 genes responsible for the early steps of brassicene C biosynthesis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2009 Oct 1;19(19):5640-3.
- Have AT, Mulder W, Visser J, van Kan JA. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1998 Oct;11(10):1009-16.
- Heath JD, Weldon R, Monnot C, Meinke DW. Analysis of storage proteins in normal and aborted seeds from embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 1986 Nov;169(3):304-12.
- Heil M, Bostock RM. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of botany*. 2002 May 1;89(5):503-12.
- Helling B, Reinecke SA, Reinecke AJ. Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and environmental safety*. 2000 May 1;46(1):108-16.
- Hemm MR, Ruegger MO, Chapple C. The *Arabidopsis* ref2 mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *The Plant Cell*. 2003 Jan;15(1):179-94.
- Hendricks SB, Taylorson RB. Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. *Plant Physiology*. 1974 Sep;54(3):304-9.
- Hensel M, Arst Jr HN, Aufauvre-Brown A, Holden DW. The role of the *Aspergillus fumigatus* areA gene in invasive pulmonary aspergillosis. *Molecular and General Genetics MGG*. 1998 Jun;258(5):553-7.
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell*. 1996 May;8(5):793-803.
- Herbers K, Takahata Y, Melzer M, Mock HP, Hajirezaei M, Sonnewald U. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology*. 2000 Jan;1(1):51-9.
- Herms DA, Mattson WJ. The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*. 1992 Sep 1;67(3):283-335.
- Hessini K, Kronzucker HJ, Abdelly C, Cruz C. Drought stress obliterates the preference for ammonium as an N source in the C4 plant *Spartina alterniflora*. *Journal of plant physiology*. 2017 Jun 1;213:98-107.
- Hilhorst HW, Smitt AI, Karssen CM. Gibberellin-biosynthesis and-sensitivity mediated stimulation of seed germination of *Sisymbrium officinale* by red light and nitrate. *Physiologia Plantarum*. 1986 Jun;67(2):285-90.
- Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Goda H. Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Apr 10;104(15):6478-83.
- Hoffland E, Jeger MJ, van Beusichem ML. Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant Soil*. 2000;218(1):239-47.
- Hogge LR, Reed DW, Underhill EW, Haughn GW. HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana* and their identification using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*. 1988 Nov 1;26(11):551-6.
- Holsbeeks I, Lagatie O, Van Nuland A, Van de Velde S, Thevelein JM. The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends in biochemical sciences*. 2004 Oct 1;29(10):556-64.
- Horst RJ, Zeh C, Saur A, Sonnewald S, Sonnewald U, Voll LM. The *Ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. *Eukaryotic cell*. 2012 Mar;11(3):368-80.

Houdusse F, Zamarreño AM, Garnica M, García-Mina J. The importance of nitrate in ameliorating the effects of ammonium and urea nutrition on plant development: the relationships with free polyamines and plant proline contents. *Functional Plant Biology*. 2005 Oct 28;32(11):1057-67.

Howarth RW, Sharpley A, Walker D. Sources of nutrient pollution to coastal waters in the United States: Implications for achieving coastal water quality goals. *Estuaries*. 2002 Aug;25(4):656-76.

Huang H, Nguyen Thi Thu T, He X, Gravot A, Bernillon S, Ballini E, Morel JB. Increase of fungal pathogenicity and role of plant glutamine in nitrogen-induced susceptibility (NIS) to rice blast. *Frontiers in plant science*. 2017 Feb 28;8:265.

Huber DM, Haneklaus S. Managing nutrition to control plant disease. *Landbauforschung Volkenrode*. 2007 Dec 1;57(4):313.

Huber DM, Watson RD. Nitrogen form and plant disease. *Annual review of phytopathology*. 1974 Sep;12(1):139-65.

Hull AK, Vij R, Celenza JL. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Feb 29;97(5):2379-84.

Hummel I, Bourdais G, Gouesbet G, Couée I, Malmberg RL, El Amrani A. Differential gene expression of arginine decarboxylase ADC1 and ADC2 in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytologist*. 2004 Sep;163(3):519-31.

Humpherson-Jones FM, Maude RB. Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in Brassica oleracea seed production crops. *Annals of Applied Biology*. 1982 Feb;100(1):61-71.

Hunter JD. Matplotlib: A 2D graphics. *Computer Science and Engineering*. 2007;9(3):90-5.

Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*. 2014 Aug 1;7(8):1267-87.

Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology advances*. 2011 May 1;29(3):300-11.

Hwang IS, An SH, Hwang BK. Pepper asparagine synthetase 1 (CaAS1) is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *The Plant Journal*. 2011 Sep;67(5):749-62.

I

Ito K, Tanaka T, Hatta R, Yamamoto M, Akimitsu K, Tsuge T. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism. *Molecular microbiology*. 2004 Apr;52(2):399-411.

J

Jacobs T. Postulation of virulence groups and resistance factors in the quinoa/downy mildew pathosystem using material from Ecuador. *Plant Pathology*. 1999;48(3):425-30.

Jacobsen JV, Pearce DW, Poole AT, Pharis RP, Mander LN. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum*. 2002 Jul;115(3):428-41.

Jedelská T, Luhová L, Petřivalský M. Nitric oxide signalling in plant interactions with pathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Experimental Botany*. 2021 Feb 11;72(3):848-63.

Jensen B, Munk L. Nitrogen-induced changes in colony density and spore production of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* on seedlings of six spring barley cultivars. *Plant Pathology*. 1997;46(2):191-202.

Jiménez Bremont JF, Marina M, Guerrero-Gonzalez MD, Rossi FR, Sánchez-Rangel D, Rodríguez-Kessler M, Ruiz OA, Gárriz A. Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science*. 2014 Mar 18;5:95.

Jiménez-Bremont JF, Camacho-Villasana YM, Cabrera-Ponce JL, de la Rosa AP, Ochoa-Alejo N. Sequence comparison of plant ornithine decarboxylases reveals high homology and lack of introns. *Biologia plantarum*. 2004 Jun;48(2):193-8.

Johnson RD, Johnson L, Itoh Y, Kodama M, Otani H, Kohmoto K. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2000 Jul;13(7):742-53.

Johnson ND, Liu B, Bentley BL. The effects of nitrogen fixation, soil nitrate, and defoliation on the growth, alkaloids, and nitrogen levels of *Lupinus succulentus* (Fabaceae). *Oecologia*. 1987 Dec;74(3):425-31.

Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. *nature*. 2006 Nov;444(7117):323-9.

Joubert A, Simoneau P, Campion C, Bataillé-Simoneau N, Iacomini-Vasilescu B, Poupard P, Francois JM, Georgeault S, Sellier E, Guillemette T. Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular microbiology*. 2011 Mar;79(5):1305-24.

K

Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai CB, Rockel P, Sonoda M, Planchet E. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of experimental botany*. 2002 Apr 15;53(370):875-82.

Kim MS, Cho SM, Kang EY, Im YJ, Hwangbo H, Kim YC, Ryu CM, Yang KY, Chung GC, Cho BH. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2008 Dec;21(12):1643-53.

Kim SH, Kim SH, Yoo SJ, Min KH, Nam SH, Cho BH, Yang KY. Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013 Aug 9;437(4):502-8.

Kim H, Woloshuk CP. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*. 2008 Jun 1;45(6):947-53.

Kinnersley AM, Turano FJ. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000 Nov 1;19(6):479-509.

Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant physiology*. 2001 Jun;126(2):811-25.

Kliebenstein DJ. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant, Cell & Environment*. 2004 Jun;27(6):675-84.

Köhl J, Van Tongeren CA, Groenenboom-de Haas BH, Van Hoof RA, Driessen R, Van Der Heijden L. Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower. *Plant pathology*. 2010 Apr;59(2):358-67.

Köhl J, Vlaswinkel M, Groenenboom-de Haas BH, Kastelein P, Van Hoof RA, Van der Wolf JM, Krijger M. Survival of pathogens of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* Gemmifera Group) in crop residues. *Plant pathology*. 2011 Aug;60(4):661-70.

Koornneef M, Karssen CM. Seed dormancy and germination. In *Arabidopsis* 1994 (pp. 313-334). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. Seed dormancy and germination. *Current opinion in plant biology*. 2002 Feb 1;5(1):33-6.
- Kosaka A, Pastorczyk M, Piślewska-Bednarek M, Nishiuchi T, Ono E, Suemoto H, Ishikawa A, Frerigmann H, Kaido M, Mise K, Bednarek P. Tryptophan-derived metabolites and BAK1 separately contribute to Arabidopsis postinvasive immunity against *Alternaria brassicicola*. *Scientific reports*. 2021 Jan 15;11(1):1-4.
- Krapp A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current opinion in plant biology*. 2015 Jun 1;25:115-22.
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince AS, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*. 2014 Mar 1;65(3):789-98.
- Kruse C, Haas FH, Jost R, Reiser B, Reichelt M, Wirtz M, Gershenzon J, Schnug E, Hell R. Improved sulfur nutrition provides the basis for enhanced production of sulfur-containing defense compounds in Arabidopsis thaliana upon inoculation with *Alternaria brassicicola*. *Journal of plant physiology*. 2012 May 1;169(7):740-3.
- Kubota M, Abiko K, Yanagisawa Y, Nishi K. Frequency of *Alternaria brassicicola* in commercial cabbage seeds in Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 2006 Aug;72(4):197-204.
- Kudla B, Caddick MX, Langdon T, Martinez-Rossi NM, Bennett CF, Sibley S, Davies RW, Arst Jr HN. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO journal*. 1990 May;9(5):1355-64.
- Kumar A, Yogendra KN, Karre S, Kushalappa AC, Dion Y, Choo TM. WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist Fusarium head blight in barley spikelets. *Journal of experimental botany*. 2016 Jul 1;67(14):4127-39.
- Kunkel BN, Brooks DM. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current opinion in plant biology*. 2002 Aug 1;5(4):325-31.
- Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK. Age-related resistance in Arabidopsis is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*. 2002;14(2):479-90.
- Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y. Advances in polyamine research in 2007. *Journal of plant research*. 2007 May;120(3):345-50.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiya T, Kamiya Y, Nambara E. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO journal*. 2004 Apr 7;23(7):1647-56.

L

- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual review of plant biology*. 1996 Jun;47(1):569-93.
- Lawrence CB, Mitchell TK, Craven KD, Cho YR, Cramer RA, Kim KH. At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *The Plant Pathology Journal*. 2008;24(2):101-11.
- Lazzarato L, Trebbi G, Pagnucco C, Franchin C, Torrigiani P, Betti L. Exogenous spermidine, arsenic and β -aminobutyric acid modulate tobacco resistance to tobacco mosaic virus, and affect local and systemic glucosylsalicylic acid levels and arginine decarboxylase gene expression in tobacco leaves. *Journal of plant physiology*. 2009 Jan 1;166(1):90-100.
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F, Gojon A. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell*. 2003 Sep;15(9):2218-32.

- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. Molecular and functional regulation of two NO₃-uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *The Plant Journal*. 1999 Jun;18(5):509-19.
- Leleu O, Vuylsteker C. Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany*. 2004 Apr 1;55(398):815-23.
- Léran S, Varala K, Boyer JC, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, Gassmann W. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in plant science*. 2014 Jan 1;19(1):5-9.
- Li B, Xu X. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *Journal of Phytopathology*. 2002 Dec;150(11-12):687-91.
- Li D, Ashby AM, Johnstone K. Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. *Molecular plant-microbe interactions*. 2003 Jun;16(6):545-52.
- Liu YH, Song YH, Ruan YL. Sugar conundrum in plant-pathogen interactions: roles of invertase and sugar transporters depend on pathosystems. *Journal of Experimental Botany*. 2022 Apr 5;73(7):1910-25.
- Liu KH, Tsay YF. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO journal*. 2003 Mar 3;22(5):1005-13.
- Liu Y, Shi L, Ye N, Liu R, Jia W, Zhang J. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in Arabidopsis. *New Phytologist*. 2009 Sep;183(4):1030-42.
- López-Berges MS, Rispail N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*. 2010 Jul;22(7):2459-75.
- Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H, Von Wirén N. Additive contribution of AMT1; 1 and AMT1; 3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *The Plant Journal*. 2006 Nov;48(4):522-34.
- Losada M, Paneque A, Aparicio PJ, Mvega J, Cardenas J, Herrera J. Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in *Chlorella*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1970 Mar 27;38(6):1009-15.
- Lu J, Zhang L, Lewis RS, Bovet L, Goepfert S, Jack AM, Crutchfield JD, Ji H, Dewey RE. Expression of a constitutively active nitrate reductase variant in tobacco reduces tobacco-specific nitrosamine accumulation in cured leaves and cigarette smoke. *Plant biotechnology journal*. 2016 Jul;14(7):1500-10.

M

- Macioszek VK, Wielanek M, Morkunas I, Ciereszko I, Kononowicz AK. Leaf position-dependent effect of *Alternaria brassicicola* development on host cell death, photosynthesis and secondary metabolites in *Brassica juncea*. *Physiologia Plantarum*. 2020 Mar;168(3):601-16.
- Mackintosh CA, Slater LA, McClintock CA, Walters DR, Havis ND, Robins DJ. Synthesis and antifungal activity of two novel spermidine analogues. *FEMS microbiology letters*. 1997 Mar 1;148(1):21-5.
- Majumdar, R., Minocha, R., Lebar, M.D., Rajasekaran, K., Long, S., Carter-Wientjes, C., Minocha, S.C. & Cary, J.W. (2019) Contribution of maize polyamine and amino acid metabolism toward resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Frontiers in Plant Science*, 10, 692.

Marina M, Maiale SJ, Rossi FR, Romero MF, Rivas EI, Gárriz A, Ruiz OA, Pieckenstain FL. Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*. 2008 Aug;147(4):2164-78.

Marina M, Sirera FV, Rambla JL, Gonzalez ME, Blázquez MA, Carbonell J, Pieckenstain FL, Ruiz OA. Thermospermine catabolism increases *Arabidopsis thaliana* resistance to *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of experimental botany*. 2013 Mar 1;64(5):1393-402.

Marini F, Betti L, Scaramagli S, Biondi S, Torrigiani P. Polyamine metabolism is upregulated in response to tobacco mosaic virus in hypersensitive, but not in susceptible, tobacco. *New Phytologist*. 2001 Feb;149(2):301-9.

Marino D, Ariz I, Lasa B, Santamaría E, Fernández-Irigoyen J, González-Murua C, Aparicio Tejo PM. Quantitative proteomics reveals the importance of nitrogen source to control glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *Journal of Experimental Botany*. 2016 May 1;67(11):3313-23.

Marroquin-Guzman M, Wilson RA. GATA-dependent glutaminolysis drives appressorium formation in *Magnaporthe oryzae* by suppressing TOR inhibition of cAMP/PKA signaling. *PLoS pathogens*. 2015 Apr 22;11(4):e1004851.

Marroquin-Guzman, M. Nutrient acquisition strategies employed by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* during infection. University of Nebraska. 2017: 203p.

Martin T, Oswald O, Graham IA. *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiology*. 2002;128(2):472-81.

Martin-Tanguy J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation*. 2001 May;34(1):135-48.

Martínez-Medina A, Pescador L, Terrón-Camero LC, Pozo MJ, Romero-Puertas MC. Nitric oxide in plant–fungal interactions. *Journal of Experimental Botany*. 2019 Aug 29;70(17):4489-503.

Marzluf GA. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997 Mar;61(1):17-32.

Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany*. 2010 Jun 1;105(7):1141-57.

Matakiadis T, Alboresi A, Jikumaru Y, Tatematsu K, Pichon O, Renou JP, Kamiya Y, Nambara E, Truong HN. The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene *CYP707A2* plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology*. 2009 Feb;149(2):949-60.

Maude RB, Humpherson-Jones FM. Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot *Alternaria brassicicola* and grey leaf spot *Alternaria brassicae* of brassicas. *Annals of Applied Biology*. 1980 Aug;95(3):311-9.

Mazzola M, Leach JE, Nelson R, White FF. Analysis of the interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and the rice cultivars IR24 and IRBB21. *Phytopathology*. 1994;84(4):392-7.

McCullough JM, Shropshire Jr W. Physiological predetermination of germination responses in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant and Cell Physiology*. 1970 Feb 1;11(1):139-48.

McSwiney CP, Robertson GP. Nonlinear response of N₂O flux to incremental fertilizer addition in a continuous maize (*Zea mays* L.) cropping system. *Global Change Biology*. 2005 Oct;11(10):1712-9.

Meyer SE, Nelson DL, Clement S. Evidence for resistance polymorphism in the *Bromus tectorum*-*Ustilago bullata* pathosystem: implications for biocontrol. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2001 Mar 1;23(1):19-27.

- Meyer C, Stitt M. Nitrate reduction and signalling. In *Plant nitrogen 2001* (pp. 37-59). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA. Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *Journal of biological chemistry*. 2000 Oct 27;275(43):33712-7.
- Mikkelsen MD, Naur P, Halkier BA. *Arabidopsis* mutants in the C–S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *The Plant Journal*. 2004 Mar;37(5):770-7.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM. Nitrate transport and signalling. *Journal of experimental Botany*. 2007 Jul 1;58(9):2297-306.
- Min K, Shin Y, Son H, Lee J, Kim JC, Choi GJ, Lee YW. Functional analyses of the nitrogen regulatory gene *areA* in *Gibberella zeae*. *FEMS microbiology letters*. 2012 Sep 1;334(1):66-73.
- Miquel M, Browse J. *Arabidopsis* lipids: a fat chance. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1998 Jan 1;36(1-2):187-97.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis GD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA. Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *The Plant Cell*. 2008 Jun;20(6):1708-24.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. Plant polyamine catabolism: the state of the art. *Plant signaling & behavior*. 2008 Dec 1;3(12):1061-6.
- Moschou PN, Sarris PF, Skandalis N, Andriopoulou AH, Paschalidis KA, Panopoulos NJ, Roubelakis-Angelakis KA. Engineered polyamine catabolism preinduces tolerance of tobacco to bacteria and oomycetes. *Plant Physiology*. 2009 Apr;149(4):1970-81.
- Mukherjee AK, Lev S, Gepstein S, Horwitz BA. A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with *Arabidopsis thaliana* ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. *BMC plant biology*. 2009 Dec;9(1):1-1.
- Mukherjee AK, Carp MJ, Zuchman R, Ziv T, Horwitz BA, Gepstein S. Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *Journal of proteomics*. 2010 Feb 10;73(4):709-20.
- Mur LA, Prats E, Pierre S, Hall MA, Hebelstrup KH. Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science*. 2013 Jun 27;4:215.
- Mur LA, Simpson C, Kumari A, Gupta AK, Gupta KJ. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of botany*. 2017 Mar 1;119(5):703-9.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962 Jul;15(3):473-97.
- Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2009 Aug;230(3):517-27.
- Muños S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A. Transcript profiling in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1. 1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2. 1. *The Plant Cell*. 2004 Sep;16(9):2433-47.
- Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*. 2001 Sep 1;52(362):1741-52.

N

- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil*. 2013 Sep;370(1):1-29.
- Nambeesan S, AbuQamar S, Laluk K, Mattoo AK, Mickelbart MV, Ferruzzi MG, Mengiste T, Handa AK. Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiology*. 2012 Feb;158(2):1034-45.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of integrative plant biology*. 2010 Feb;52(2):195-204.
- Nandi A, Krothapalli K, Buseman CM, Li M, Welti R, Enyedi A, Shah J. *Arabidopsis* sfd mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase. *The Plant Cell*. 2003 Oct;15(10):2383-98.
- Naur P, Petersen BL, Mikkelsen MD, Bak S, Rasmussen H, Olsen CE, Halkier BA. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 2003 Sep;133(1):63-72.
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass AD, Touraine B. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant molecular biology*. 2003 Jun;52(3):689-703.
- Neergaard P. Economic significance of seed-borne diseases. In *Seed pathology*, Palgrave, London. 1977. p. 3-39.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K. CO₂ regulator *SLAC1* and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*. 2008 Mar;452(7186):483-6.
- Neumann S, Paveley ND, Beed FD, Sylvester-Bradley R. Nitrogen per unit leaf area affects the upper asymptote of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* epidemics in winter wheat. *Plant pathology*. 2004 Dec;53(6):725-32.
- N'guyen, G. Etudes des déterminants moléculaires impliqués dans la capacité de transmission d'*Alternaria brassicicola* aux semences d'*Arabidopsis thaliana*. Université d'Angers. 2015.
- N'guyen GQ, Raulo R, Marchi M, Agustí-Brisach C, Iacomi B, Pelletier S, Renou JP, Bataillé-Simoneau N, Champion C, Bastide F, Hamon B. Responses to hydric stress in the seed-borne necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Frontiers in microbiology*. 2019:1969.
- Nigro D, Blanco A, Anderson OD, Gadaleta A. Characterization of ferredoxin-dependent glutamine-oxoglutarate amidotransferase (Fd-GOGAT) genes and their relationship with grain protein content QTL in wheat. *PLoS One*. 2014 Aug 6;9(8):e103869.
- Noguero M, Lacombe B. Transporters involved in root nitrate uptake and sensing by *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 2016 Sep 21;7:1391.
- Noritake T, Kawakita K, Doke N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*. 1996 Jan 1;37(1):113-6.
- Normanly J. Auxin metabolism. *Physiologia Plantarum*. 1997 Jul;100(3):431-42.
- North KA, Ehrling B, Koprivova A, Rennenberg H, Kopriva S. Natural variation in *Arabidopsis* adaptation to growth at low nitrogen conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009 Oct 1;47(10):912-8.

O

- Oeser B, Heidrich PM, Müller U, Tudzynski P, Tenberge KB. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genetics and Biology*. 2002 Aug 1;36(3):176-86.
- Ohm RA, Feau N, Henrissat B, Schoch CL, Horwitz BA, Barry KW, Condon BJ, Copeland AC, Dhillon B, Glaser F, Hesse CN. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLoS pathogens*. 2012 Dec 6;8(12):e1003037.
- Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshihara T, Nambara E. CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 2006 May;141(1):97-107.
- Olea F, Pérez-García A, Cantón FR, Rivera ME, Cañas R, Ávila C, Cazorla FM, Cánovas FM, de Vicente A. Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant and cell physiology*. 2004 Jun 15;45(6):770-80.
- O'Neill CM, Gill S, Hobbs D, Morgan C, Bancroft I. Natural variation for seed oil composition in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 2003 Nov 1;64(6):1077-90.
- Orsel M, Filleur S, Fraiser V, Daniel-Vedele F. Nitrate transport in plants: which gene and which control?. *Journal of Experimental Botany*. 2002 Apr 15;53(370):825-33.
- Osborn AE. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The plant cell*. 1996 Oct;8(10):1821.
- Otani H, Kohnobe A, Kodama M, Kohmoto K. Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1998 May 1;52(5):285-95.
- Ouborg NJ, Biere A, Mudde CL. Inbreeding effects on resistance and transmission-related traits in the *Silene-Microbotryum* pathosystem. *Ecology*. 2000;81(2):520-31.

P

- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of experimental botany*. 2006 Feb 1;57(3):547-57.
- Pal M, Janda T. Role of polyamine metabolism in plant pathogen interactions. *Journal of Plant Science and Phytopathology*. 2017;1:95-100.
- Panter SN, Jones DA. Age-related resistance to plant pathogens.
- Pantin F, Simonneau T, Muller B. Coming of leaf age: control of growth by hydraulics and metabolics during leaf ontogeny. *New Phytologist*. 2012 Oct;196(2):349-66.
- Pantoja, O. (2012). High affinity ammonium transporters: molecular mechanism of action. *Front. Plant Sci.*, 3, 34.
- Paschalidis K, Tsaniklidis G, Wang BQ, Delis C, Trantas E, Loulakakis K, Makky M, Sarris PF, Ververidis F, Liu JH. The interplay among polyamines and nitrogen in plant stress responses. *Plants*. 2019 Sep;8(9):315.
- Pastor V, Gamir J, Camañes G, Cerezo M, Sánchez-Bel P, Flors V. Disruption of the ammonium transporter AMT1.1 alters basal defenses generating resistance against *Pseudomonas syringae* and *Plectosphaerella cucumerina*. *Frontiers in plant science*. 2014 May 30;5:231.

- Paul MJ, Stitt M. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant, Cell & Environment*. 1993 Dec;16(9):1047-57.
- Pedras MS, Chumala PB, Jin W, Islam MS, Hauck DW. The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: phytotoxin production and phytoalexin elicitation. *Phytochemistry*. 2009 Feb 1;70(3):394-402.
- Pellier AL, Laugé R, Veneault-Fourrey C, Langin T. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular microbiology*. 2003 May;48(3):639-55.
- Pellizzaro A, Clochard T, Cukier C, Bourdin C, Juchaux M, Montrichard F, Thany S, Raymond V, Planchet E, Limami AM, Morère-Le Paven MC. The nitrate transporter MtNPF6. 8 (MtNRT1. 3) transports abscisic acid and mediates nitrate regulation of primary root growth in *Medicago truncatula*. *Plant physiology*. 2014 Dec;166(4):2152-65.
- Pettipher GL, Latham MJ. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in batch and continuous culture. *Microbiology*. 1979 Jan 1;110(1):29-38.
- Pfalz M, Mikkelsen MD, Bednarek P, Olsen CE, Halkier BA, Kroymann J. Metabolic engineering in *Nicotiana benthamiana* reveals key enzyme functions in *Arabidopsis* indole glucosinolate modification. *The Plant Cell*. 2011 Feb;23(2):716-29.
- Pfalz M, Vogel H, Kroymann J. The gene controlling the indole glucosinolate modifier1 quantitative trait locus alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2009 Mar;21(3):985-99.
- Pfannmüller A, Boysen JM, Tudzynski B. Nitrate assimilation in *Fusarium fujikuroi* is controlled by multiple levels of regulation. *Frontiers in microbiology*. 2017 Mar 14;8:381.
- Planas-Portell J, Gallart M, Tiburcio AF, Altabella T. Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*. 2013 Dec;13(1):1-3.
- Planchet E, Jagadis Gupta K, Sonoda M, Kaiser WM. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal*. 2005 Mar;41(5):732-43.
- Planchet E, Sonoda M, Zeier J, Kaiser WM. Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein-induced hypersensitive response—a critical re-evaluation. *Plant, Cell & Environment*. 2006 Jan;29(1):59-69.
- Pochon S, Terrasson E, Guillemette T, Iacomi-Vasilescu B, Georgeault S, Juchaux M, Berruyer R, Debeaujon I, Simoneau P, Champion C. The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: a model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant methods*. 2012 Dec;8(1):1-3.
- Pommerrenig B, Müdsam C, Kischka D, Neuhaus HE. Treat and trick: common regulation and manipulation of sugar transporters during sink establishment by the plant and the pathogen. *Journal of Experimental Botany*. 2020 Jul 6;71(14):3930-40.
- Pozzebon A, Borgo M, Duso C. The effects of fungicides on non-target mites can be mediated by plant pathogens. *Chemosphere*. 2010 Mar 1;79(1):8-17.
- Prats E, Carver TL, Mur LA. Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Research in Microbiology*. 2008 Jul 1;159(6):476-80.
- Prats E, Mur LA, Sanderson R, Carver TL. Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant Pathology*. 2005 Jan;6(1):65-78.

R

- Ramakrishna S, Adiga PR. Decarboxylation of homoarginine and lysine by an enzyme from *Lathyrus sativus* seedlings. *Phytochemistry*. 1976 Jan 1;15(1):83-6.
- Rauhut T, Luberacki B, Seitz HU, Glawischnig E. Inducible expression of a Nep1-like protein serves as a model trigger system of camalexin biosynthesis. *Phytochemistry*. 2009 Jan 1;70(2):185-9.
- Rea G, de Pinto MC, Tavazza R, Biondi S, Gobbi V, Ferrante P, De Gara L, Federico R, Angelini R, Tavladoraki P. Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiology*. 2004 Apr;134(4):1414-26.
- Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology*. 2002 Mar 1;128(3):865-75.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Dec 12;103(50):19206-11.
- Richard-Molard C, Wuilleme S, Scheel C, Gresshoff PM, Morot-Gaudry JF, Limami AM. Nitrogen-induced changes in morphological development and bacterial susceptibility of belgian endive (*Cichorium intybus* L.) are genotype-dependent. *Planta*. 1999;209:389-98.
- Rimmer SR, Buchwaldt H. Diseases. In *Brassica oil seeds-production and utilization*, CAB International, Wallingford, UK. 1995. p.111-40.
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of experimental botany*. 2002 Jan 1;53(366):103-10.
- Rodríguez-Kessler M, Ruiz OA, Maiale S, Ruiz-Herrera J, Jiménez-Bremont JF. Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2008 Aug 1;46(8-9):805-14.
- Rogers EE, Glazebrook J, Ausubel FM. Mode of action of the Arabidopsis thaliana phytoalexin camalexin and its role in Arabidopsis-pathogen interactions. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 1996 Nov 1;9:748-57.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore K. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in plant science*. 2014 Feb 10;5:17.
- Ross JJ, Murfet IC, Reid JB. Gibberellin mutants. *Physiologia Plantarum*. 1997 Jul;100(3):550-60.
- Rotem J. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. APS, St Paul, USA. 1994. p.1-326.
- Ru L, Osorio S, Wang L, Fernie AR, Patrick JW, Ruan YL. Transcriptomic and metabolomics responses to elevated cell wall invertase activity during tomato fruit set. *Journal of experimental botany*. 2017 Jul 10;68(15):4263-79.
- Russell PE. A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*. 2005 Feb;143(1):11-25.
- Rusterucci C, Zhao Z, Haines K, Mellersh D, Neumann M, Cameron RK. Age-related resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato is associated with the transition to flowering in Arabidopsis and is effective against *Peronospora parasitica*. *Physiological and molecular plant pathology*. 2005 Jun 1;66(6):222-31.

S

- Sagor GH, Takahashi H, Niitsu M, Takahashi Y, Berberich T, Kusano T. Exogenous thermospermine has an activity to induce a subset of the defense genes and restrict cucumber mosaic virus multiplication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*. 2012 Jul;31(7):1227-32.
- Samalova M, Johnson J, Illes M, Kelly S, Fricker M, Gurr S. Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection. *New Phytologist*. 2013 Jan;197(1):207-22.
- Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Lechón T, Fernández-Marcos M, Lorenzo O. Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of experimental botany*. 2015 May 1;66(10):2857-68.
- Sarasketa A, González-Moro MB, González-Murua C, Marino D. Exploring ammonium tolerance in a large panel of *Arabidopsis thaliana* natural accessions. *Journal of experimental botany*. 2014 Nov 1;65(20):6023-33.
- Sarowar S, Kim YJ, Kim EN, Kim KD, Hwang BK, Islam R, Shin JS. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant cell reports*. 2005 Jun;24(4):216-24.
- Scheideler M, Schlaich NL, Fellenberg K, Beissbarth T, Hauser NC, Vingron M, Slusarenko AJ, Hoheisel JD. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Mar 22;277(12):10555-61.
- Schenck CA, Maeda HA. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry*. 2018 May 1;149:82-102.
- Schinko T, Berger H, Lee W, Gallmetzer A, Pirker K, Pachlinger R, Buchner I, Reichenauer T, Güldener U, Strauss J. Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism. *Molecular microbiology*. 2010 Nov;78(3):720-38.
- Schlaeppli K, Abou-Mansour E, Buchala A, Mauch F. Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *The Plant Journal*. 2010 Jun;62(5):840-51.
- L Schlaich N. *Arabidopsis thaliana*-the model plant to study host-pathogen interactions. *Current Drug Targets*. 2011 Jun 1;12(7):955-66.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9:671-5.
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatos A, Halkier BA, Glawischnig E. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant physiology*. 2006 Aug;141(4):1248-54.
- Seifi HS, Van Bockhaven J, Angenon G, Höfte M. Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2013 May;26(5):475-85.
- Sellam A, Dongo A, Guillemette T, Hudhomme P, Simoneau P. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant Pathology*. 2007 Mar;8(2):195-208.
- Serapiglia MJ, Minocha R, Minocha SC. Changes in polyamines, inorganic ions and glutamine synthetase activity in response to nitrogen availability and form in red spruce (*Picea rubens*). *Tree Physiology*. 2008 Oct 1;28(12):1793-803.
- Shaffer PM, Arst HN, Estberg L, Fernando L, Ly T, Sitter M. An asparaginase of *Aspergillus nidulans* is subject to oxygen repression in addition to nitrogen metabolite repression. *Molecular and General Genetics MGG*. 1988 May;212(2):337-41.
- Shah J, Kachroo P, Nandi A, Klessig DF. A recessive mutation in the *Arabidopsis* SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *The Plant Journal*. 2001 Mar;25(5):563-74.

- Shumborski SJ, Samuels AL, Bird DA. Fine structure of the Arabidopsis stem cuticle: effects of fixation and changes over development. *Planta*. 2016;244(4):843-51.
- Siemens DH, Mitchell-Olds T. Evolution of pest-induced defenses in Brassica plants: Tests of theory. *Ecology*. 1998 Mar;79(2):632-46.
- Sierotzki H, Wullschleger J, Gisi U. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2000 Oct 1;68(2):107-12.
- Smith TA, Wilshire G. Distribution of cadaverine and other amines in higher plants. *Phytochemistry*. 1975 Nov 1;14(11):2341-6.
- Snoeiijers SS, Pérez-García A, Joosten MH, De Wit PJ. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European journal of plant pathology*. 2000 Jul;106(6):493-506.
- Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S, Udvardi M. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS letters*. 2000 Feb 11;467(2-3):273-8.
- Solel Z, Bruck RI. Effect of nitrogen fertilization and growth suppression on pitch canker development on loblolly pine seedlings. *Journal of Phytopathology*. 1989 Apr;125(4):327-35.
- Soliday CL, Flurkey WH, Okita TW, Kolattukudy PE. Cloning and structure determination of cDNA for cutinase, an enzyme involved in fungal penetration of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984 Jul 1;81(13):3939-43.
- Solomon PS, Tan KC, Oliver RP. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology*. 2003 May;4(3):203-10.
- Solomon PS, Oliver RP. The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta*. 2001 Jun;213(2):241-9.
- Solomon PS, Oliver RP. Evidence that γ -aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta*. 2002 Jan;214(3):414-20.
- Sønderby IE, Hansen BG, Bjarnholt N, Ticconi C, Halkier BA, Kliebenstein DJ. A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS One*. 2007 Dec 19;2(12):e1322.
- Sonnwald S, Priller JP, Schuster J, Glickmann E, Hajirezaei MR, Siebig S, Mudgett MB, Sonnwald U. Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type three effectors. *PLoS One*. 2012 Dec 14;7(12):e51763.
- Soulie MC, Koka SM, Floch K, Vancostenoble B, Barbe D, Daviere A, Soubigou-Taconnat L, Brunaud V, Poussereau N, Loisel E, Devallee A. Plant nitrogen supply affects the *Botrytis cinerea* infection process and modulates known and novel virulence factors. *Molecular plant pathology*. 2020 Nov;21(11):1436-50.
- Srivastava A, Ohm RA, Oxiles L, Brooks F, Lawrence CB, Grigoriev IV, Cho Y. A zinc-finger-family transcription factor, AbVf19, is required for the induction of a gene subset important for virulence in *Alternaria brassicicola*. *Molecular plant-microbe interactions*. 2012 Apr;25(4):443-52.
- Stes E, Biondi S, Holsters M, Vereecke D. Bacterial and plant signal integration via D3-type cyclins enhances symptom development in the Arabidopsis-Rhodococcus fascians interaction. *Plant physiology*. 2011 Jun;156(2):712-25.
- Stitt M. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current opinion in plant biology*. 1999 Jun 1;2(3):178-86.
- Stout MJ, Brovont RA, Duffey SS. Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology*. 1998 Jun;24(6):945-63.

Sun Y, Wang M, Mur LA, Shen Q, Guo S. Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jan;21(2):572.

Sun J, Bankston JR, Payandeh J, Hinds TR, Zagotta WN, Zheng N. Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1. 1. *Nature*. 2014 Mar;507(7490):73-7.

Sun Y, Li Y, Li Y, Wang M, Mur LA, Shen Q, Guo S. Nitrate mediated resistance against *Fusarium* infection in cucumber plants acts via photorespiration. *Plant, Cell & Environment*. 2021 Oct;44(10):3412-31.

Swarbrick PJ, SCHULZE-LEFERT PA, Scholes JD. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell & Environment*. 2006 Jun;29(6):1061-76.

Szabados L, Savaouré A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*. 2010 Feb 1;15(2):89-97.

T

Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Seo S, Ohashi Y, Kusano T. Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *The Plant Journal*. 2003 Dec;36(6):820-9.

Takahashi Y, Cong R, Sagor GH, Niitsu M, Berberich T, Kusano T. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports*. 2010 Sep;29(9):955-65.

Takahashi Y, Uehara Y, Berberich T, Ito A, Saitoh H, Miyazaki A, Terauchi R, Kusano T. A subset of hypersensitive response marker genes, including HSR203J, is the downstream target of a spermine signal transduction pathway in tobacco. *The Plant Journal*. 2004 Nov;40(4):586-95.

Talbot NJ. Living the sweet life: how does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants?. *PLoS Biology*. 2010 Feb 9;8(2):e1000308.

Tao H, Miao H, Chen L, Wang M, Xia C, Zeng W, Sun B, Zhang F, Zhang S, Li C, Wang Q. WRKY33-mediated indolic glucosinolate metabolic pathway confers resistance against *Alternaria brassicicola* in *Arabidopsis* and Brassica crops. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2022 Mar 8.

Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Laugé R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of experimental botany*. 2007 Sep 1;58(12):3351-60.

Tenuta M, Lazarovits G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. 2002 Mar;92(3):255-64.

Tetteroo FA, Bomal C, Hoekstra FA, Karssen CM. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (*Daucus carota* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Seed Science Research*. 1994 Jun;4(2):203-10.

Thalineau E, Fournier C, Gravot A, Wendehenne D, Jeandroz S, Truong HN. Nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches* depends on plant genotype. *Molecular Plant Pathology*. 2018 Mar;19(3):664-76.

Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Dec 8;95(25):15107-11.

Thomma BP, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal*. 1999 Jul;19(2):163-71.

- Thomma BP. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular plant pathology*. 2003 Jul;4(4):225-36.
- Thomma BP, Bolton MD, CLERGEOT PH, De Wit PJ. Nitrogen controls in planta expression of *Cladosporium fulvum* Avr9 but no other effector genes. *Molecular Plant Pathology*. 2006 Mar;7(2):125-30.
- Thomsen HC, Eriksson D, Møller IS, Schjoerring JK. Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency?. *Trends in Plant Science*. 2014 Oct 1;19(10):656-63.
- Tierens KF, Thomma BP, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue BP, Broekaert WF. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant physiology*. 2001 Apr;125(4):1688-99.
- Torres MA. ROS in biotic interactions. *Physiologia plantarum*. 2010 Apr;138(4):414-29.
- Torrigiani P, Altamura MM, Pasqua G, Monacelli B, Serafini-Fracassini D, Bagni N. Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco. *Physiologia plantarum*. 1987 Jul;70(3):453-60.
- Tronchet M, Balague C, Kroj T, Jouanin L, Roby D. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular plant pathology*. 2010 Jan;11(1):83-92.
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS letters*. 2007 May 25;581(12):2290-300.
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*. 1993 Mar 12;72(5):705-13.
- Tsuge T, Harimoto Y, Akimitsu K, Ohtani K, Kodama M, Akagi Y, Egusa M, Yamamoto M, Otani H. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS microbiology reviews*. 2013 Jan 1;37(1):44-66.
- Turrion-Gomez JL, Benito EP. Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Molecular Plant Pathology*. 2011 Aug;12(6):606-16.

U

- Urano K, Hobo T, Shinozaki K. *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS letters*. 2005 Feb 28;579(6):1557-64.

V

- Vahabi K, Reichelt M, Scholz SS, Furch AC, Matsuo M, Johnson JM, Sherameti I, Gershenzon J, Oelmüller R. *Alternaria brassicae* induces systemic jasmonate responses in *Arabidopsis* which travel to neighboring plants via a *Piriformospora indica* hyphal network and activate abscisic acid responses. *Frontiers in plant science*. 2018 May 8;9:626.
- Valluru R, Van den Ende W. Myo-inositol and beyond—emerging networks under stress. *Plant science*. 2011 Oct 1;181(4):387-400.
- Van Bueren EL, Jones SS, Tamm L, Murphy KM, Myers JR, Leifert C, Messmer MM. The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: a review. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*. 2011 Dec 1;58(3-4):193-205.
- van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yager N, Guillard E, Yu T. Scikit-image: image processing in Python. *Peer J*. 2014;2:e453.
- Vega-Mas I, Sarasketa A, Marino D. High-throughput quantification of ammonium content in *Arabidopsis*. *Bio-protocol*. 2015 Aug 20;5(16):e1559-.

Vidal EA, Moyano TC, Canales J, Gutiérrez RA. Nitrogen control of developmental phase transitions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*. 2014 Oct 1;65(19):5611-8.

Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman DG. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*. 1997 Aug;7(3):737-50.

Voigt CA, Schäfer W, Salomon S. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal*. 2005 May;42(3):364-75.

von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current opinion in plant biology*. 2000 Jan 1;3(3):254-61.

W

Walch-Liu P, Forde BG. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant Journal*. 2008;54(5):820-8.

Wallsgrave RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC, Bright SW. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase—biochemical and genetic analysis. *Plant Physiology*. 1987 Jan;83(1):155-8.

Walters D, Meurer-Grimes B, Rovira I. Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiology Letters*. 2001 Jul 1;201(2):255-8.

Walters DR. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*. 2003 Sep 1;64(1):97-107.

Wang J, Higgins VJ. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology*. 2005 Apr 1;42(4):284-92.

Wang LY, Bau HJ, Liao HL, Chung KR. Factors affecting the production of elsinochrome phytotoxin by the citrus scab pathogen, *Elsinoë fawcettii*. *The Open Mycology Journal*. 2009 Apr 2;3(1).

Wang M, Sun Y, Gu Z, Wang R, Sun G, Zhu C, Guo S, Shen Q. Nitrate protects cucumber plants against *Fusarium oxysporum* by regulating citrate exudation. *Plant and Cell Physiology*. 2016 Sep 1;57(9):2001-12.

Wang R, Liu D, Crawford NM. The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1998 Dec 8;95(25):15134-9.

Wang YY, Hsu PK, Tsay YF. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in plant science*. 2012 Aug 1;17(8):458-67.

Ward JL, Forcat S, Beckmann M, Bennett M, Miller SJ, Baker JM, Hawkins ND, Vermeer CP, Lu C, Lin W, Truman WM. The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant Journal*. 2010 Aug;63(3):443-57.

Welti R, Shah J, Li WQ, Li MY, Chen JP, Burke JJ, Fauconnier ML, Chapman K, Chye ML, Wang XM. Plant lipidomics: discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2007;12:2494-506.

Western TL, Skinner DJ, Haughn GW. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant physiology*. 2000 Feb;122(2):345-56.

Wiame JM, Grenson M, Ars Jr HN. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Advances in microbial physiology*. 1985 Jan 1;26:1-88.

Wight WD, Kim KH, Lawrence CB, Walton JD. Biosynthesis and role in virulence of the histone deacetylase inhibitor depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Molecular plant-microbe interactions*. 2009 Oct;22(10):1258-67.

Wilkinson JQ, Crawford NM. Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Molecular and General Genetics MGG*. 1993 May;239(1):289-97.

Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GF. COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid-and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Molecular Plant*. 2011 Jul 1;4(4):663-78.

Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends in biochemical sciences*. 2002 Mar 1;27(3):139-47.

Wittstock U, Halkier BA. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in plant science*. 2002 Jun 1;7(6):263-70.

Wittstock U, Halkier BA. Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 May 12;275(19):14659-66.

X

Xiao W, Sheen J, Jang JC. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant molecular biology*. 2000 Nov;44(4):451-61.

Xu J, Meng J, Meng X, Zhao Y, Liu J, Sun T, Liu Y, Wang Q, Zhang S. Pathogen-responsive MPK3 and MPK6 reprogram the biosynthesis of indole glucosinolates and their derivatives in *Arabidopsis* immunity. *The Plant Cell*. 2016 May;28(5):1144-62.

Xu Z, Escamilla-Treviño L, Zeng L, Lalgondar M, Bevan D, Winkel B, Mohamed A, Cheng CL, Shih MC, Poulton J, Esen A. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant molecular biology*. 2004 May;55(3):343-67.

Xue J, Jørgensen M, Pihlgren U, Rask L. The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organization, expression and evolution. *Plant molecular biology*. 1995 Mar;27(5):911-22.

Y

Yaeno T, Matsuda O, Iba K. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *The Plant Journal*. 2004 Dec;40(6):931-41.

Yamaguchi S, Kamiya Y. Gibberellins and light-stimulated seed germination. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2001 Dec 1;20(4):369-76.

Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*. 1998 Dec 1;118(4):1213-22.

Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *The Plant Cell*. 2004 Feb;16(2):367-78.

Yan X, Chen S. Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta*. 2007 Nov;226(6):1343-52.

Yao C, Koller W. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicicola*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*. 1995 Jan 1;8(1):122-30.

Yazdanbakhsh N, Sulpice R, Graf A, Stitt M, Fisahn J. Circadian control of root elongation and C partitioning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. 2011;34(6):877-94.

Yoda H, Fujimura K, Takahashi H, Munemura I, Uchimiya H, Sano H. Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host-and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant molecular biology*. 2009 May;70(1):103-12.

Yuan L, Graff L, Loqué D, Kojima S, Tsuchiya YN, Takahashi H, Von Wirén N. AtAMT1; 4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*. 2009 Jan 1;50(1):13-25.

Yuan L, Loque D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wirén N. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell*. 2007 Aug;19(8):2636-52.

Z

Zang L, Morère-Le Paven MC, Clochard T, Porcher A, Satour P, Mojović M, Vidović M, Limami AM, Montrichard F. Nitrate inhibits primary root growth by reducing accumulation of reactive oxygen species in the root tip in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020 Jan 1;146:363-73.

Zeier J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell & Environment*. 2013 Dec;36(12):2085-103.

Zhang J, Pontoppidan B, Xue J, Rask L, Meijer J. The third myrosinase gene TGG3 in *Arabidopsis thaliana* is a pseudogene specifically expressed in stamen and petal. *Physiologia Plantarum*. 2002 May;115(1):25-34.

Zhao Y, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & development*. 2002 Dec 1;16(23):3100-12.

Zhao Y, Lim J, Xu J, Yu JH, Zheng W. Nitric oxide as a developmental and metabolic signal in filamentous fungi. *Molecular Microbiology*. 2020 May;113(5):872-82.

Zhou Q, Xu J, Kou Y, Lv X, Zhang X, Zhao G, Zhang W, Chen G, Liu W. Differential involvement of β -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. *Eukaryotic cell*. 2012 Nov;11(11):1371-81.

Zhou Y, Zhang C, Lin J, Yang Y, Peng Y, Tang D, Zhao X, Zhu Y, Liu X. Over-expression of a glutamate dehydrogenase gene, MgGDH, from *Magnaporthe grisea* confers tolerance to dehydration stress in transgenic rice. *Planta*. 2015 Mar;241(3):727-40.

Zhuo D, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2; 1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 1999 Mar;17(5):563-8.

Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Le Corre D, Silue D. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis)–downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology*. 2001 Oct;50(5):579-86.

Titre : Influence de la nutrition azotée sur la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à *Alternaria brassicicola* aux stades plantule et rosette

Mots clés : ammonium, nitrate, champignon nécrotrophe, métabolisme

Résumé : Le rôle de la nutrition azotée a été étudié sur le pathosystème *A. thaliana* / *A. brassicicola*. *A. brassicicola* est un champignon nécrotrophe transmis à et par la semence, provoquant des fontes de semis mais aussi des nécroses sur feuilles. Dans ce but, l'influence de l'apport de différentes formes d'azote dans le milieu nutritif de la plante, nitrate vs ammonium, sur leur sensibilité au pathogène a été étudiée, à deux stades de développement : rosette (plante adulte) et plantule (précoce). Au stade rosette, les plantes cultivées en condition ammonium sont moins sensibles au champignon qu'en condition nitrate. Des analyses métaboliques et d'expression d'une sélection de gènes ont révélé que la nutrition azotée semblait contrôler l'infection fongique *via* un ensemble complexe d'événements de signalisation et nutritionnels.

Un nouveau dispositif expérimental a été développé pour l'étude au stade plantule permettant d'évaluer l'impact du champignon sur le développement des plantules par analyse d'images. L'étude de l'effet de la nutrition azotée, menée sur trois génotypes, a révélé que les plantules sont plus sensibles au champignon en condition ammonium qu'en condition nitrate. Cette étude a donc mis en évidence pour la première fois que la nutrition azotée influence différemment la sensibilité d'*A. thaliana* à *A. brassicicola* en fonction du stade de développement de la plante. L'étude, dans les graines et les plantules, des abondances métaboliques et de l'expression d'une sélection de gènes a permis de relier notamment une sensibilité réduite au champignon à la voie des glucosinolates indoliques et à des teneurs plus faibles en polyamines.

Title : Influence of nitrogen nutrition on the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria brassicicola* at seedling and rosette stages

Keywords : ammonium, nitrate, necrotrophic fungus, metabolism

Abstract : The role of nitrogen nutrition was studied on the *A. thaliana* / *A. brassicicola* pathosystem. *A. brassicicola* is a necrotrophic fungus transmitted to and by the seed, causing damping-off but also leaf necrosis. To this end, the influence of different forms of nitrogen supply, nitrate vs ammonium, on plant susceptibility to the pathogen was studied, at two stages of development: rosette (adult plant) and seedling (early stage). At the rosette stage, plants grown under ammonium conditions are less susceptible to the fungus than under nitrate conditions. Metabolite analyzes and selected gene expression revealed that nitrogen nutrition appeared to control fungal infection *via* a complex set of signaling and nutritional events.

A new experimental device has been developed for the study at the seedling stage to assess the fungus impact on the development of seedlings, by image analysis. The study of the effect of nitrogen nutrition, carried out on three genotypes, revealed that the seedlings are more susceptible to the fungus under ammonium conditions than under nitrate conditions. This study has therefore demonstrated for the first time that nitrogen nutrition has a different influence on *A. thaliana* susceptibility to *A. brassicicola* depending on the plant stage of development. The study, in seeds and seedlings, of metabolite abundances and expression of a selection of genes made it possible to link a reduced susceptibility to the fungus, notably to the indole glucosinolate pathway and to lower levels of polyamines.