UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ
UMR Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté
Pôle Interactions Plantes-Microorganismes, Groupe Résistance Induite

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Bourgogne Franche-Comté

Ecole doctorale n°554 Environnements – Santé

Sciences de la Vie, spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire

Justine CLAVERIE

Identification du xyloglucane comme nouvel éliciteur oligosaccharidique stimulant l'immunité de *Vitis vinifera* et d'*Arabidopsis thaliana* et caractérisation de deux récepteurs aux chito-oligosaccharides chez la vigne (VvLYK1-1 et VvLYK1-2).

Directeur de thèse : Benoît POINSSOT
Co-directeur de thèse : Xavier DAIRE

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 21 décembre 2018

Composition du Jury :

David WENDEHENNE	Professeur, Université de Bourgogne	Président du jury
Fabienne BAILLIEUL	Professeur, Université de Reims Champagne Ardennes	Rapporteur
Fatma LECOURIEUX	Chargée de Recherche, CNRS Bordeaux	Rapporteur
Marielle ADRIAN	Professeur, Université de Bourgogne	Examinateur
Benoît DARBLADE	Docteur, Responsable partenariats R&D Elicityl	Examinateur
Benoît POINSSOT	Maître de Conférences, Université de Bourgogne	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Mesdames Fabienne Baillieul et Fatma Lecourieux pour avoir accepté d'examiner mes travaux en tant que rapporteurs. J'adresse également mes sincères remerciements à Madame Marielle Adrian et Messieurs Benoît Darblade et David Wendehenne pour avoir participé à mon jury de thèse en tant qu'examinateurs. Merci d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Je remercie les co-financeurs de ma thèse : l'INRA et le Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté.

Je souhaite également remercier Messieurs Bernard Dumas et David Wendehenne pour avoir participé à mes comités de suivi de thèse, d'avoir suivi mon projet de recherche et de m'avoir orienté pour mes travaux.

Pour m'avoir accordée leur confiance et m'avoir soutenue pendant ces 3 ans, je tiens à remercier très sincèrement mes directeurs de thèse, Benoît Poinssot et Xavier Daire. Merci Benoît d'avoir été toujours présent, pour les manip et la rédaction, mais aussi en dehors de la thèse et pour avoir été compréhensif lorsque ma santé ne suivait pas le rythme. Xavier, merci d'avoir été aussi gentil, je te remercie pour ta disponibilité quand j'en avais besoin.

Merci Marielle pour ton accueil dans l'équipe et aux membres de l'équipe vigne. Marie-Claire, merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur. Merci Jonathan pour ton humour et tes bons conseils. Je remercie aussi ma copine Yuko pour les moments de galère partagés pendant la thèse et au fitness.

Je tiens à remercier très chaleureusement Victoria Pastor, pour sa collaboration sur le dosage des métabolites et son extrême gentillesse.

Je remercie les membres des autres équipes : Karim, un immense merci pour ton aide sur le CRISPR et pour avoir répondu patiemment à toutes mes questions. Hoai Nam, pour ta bonne humeur. Carine, pour nos moments potins entre filles. Steph, pour être un ours. Sylvain, pour ta gentillesse et ton humour. David Bru, mon sudiste préféré, pour les coups de mains en qPCR et les blagues à table.

Un grand merci à mes trois tontons du labo : Seb, tonton rêveur, toujours disponible pour aider et répondre à mes questions. Je te rends ton bureau maintenant ! Jérôme, tonton râleur ! Je ne pensais pas trouver quelqu'un qui râle plus que moi ! Je te remercie pour ton aide dans les manip de CRISPR et pour les rigolades dans les bons moments et ton écoute dans les plus mauvais. Olivette, tonton blagueur, je te remercie

pour toutes les blagues pourries, insultes, crasses, surnoms que tu as pu me faire ou me donner. Merci d'avoir été disponible pour les manips, pour répondre à mes milliards de questions bêtes mais également pour ton écoute dans les bons et mauvais moments. Vous allez me manquer !

Merci à mes « meufs » : Elise, merci pour les bons moments, tu m'auras manqué pendant cette dernière année de thèse ! Carole, pour les fous rires et les escapades shopping, j'ai beaucoup pensé à toi en cette fin de thèse ! Emma, la nouvelle arrivée qui parle plus fort que moi ! merci pour les rigolades et pour ta bonne humeur quoi qu'il arrive ! Alice, ma kanak préférée, merci pour tout ! Pour les soirées, les bouffes…Je sais qu'on se reverra mais je ne sais pas où! Cécile, ma mother fouine, un immense merci pour les coups de mains au labo mais surtout pour être la en dehors, toujours à l'écoute. Merci d'être aussi folle que moi.

Je tiens également à remercier ma famille et mes amis, plus particulièrement :
Romain Mary, pour les petites pauses bouffes, courage pour ta 4ème année tu vas gérer c'est sûr ! Momo, pour ta bonne humeur, nos fous rires et ton amitié qui me sont très chers. Prends soin ! Magali, ma poule, on se connaît depuis toujours, mille mercis pour ton soutien. On n'est pas connectée par le cerveau mais par le cœur !
Titou, merci pour tes bons conseils et ton soutien, et pour toutes tes attentions qui me touchent. Tata, je profite de ce moment pour te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi, si j'en suis là c'est en partie grâce à toi.
Ma sœur chérie, un immense merci d'être là quelque soient mes choix. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu fais pour moi ! Et merci à Tom et Lisa, mes neveux préférés, d'être mes rayons de soleil.
Mes plus grands remerciements vont à mes parents, merci pour votre soutien, même si vous ne comprenez pas grand chose à ce je fais, et pour me pousser à aller toujours plus loin. Ce moment est le vôtre aussi, j'espère que vous serez fiers !

Enfin, un immense merci à Romain, pour me supporter et me pousser à ne pas abandonner, et pour tout ce que tu fais pour moi tous les jours. Merci d'être entré dans ma vie.

Si tu souhaites gagner, choisis le silence : il dérange, il irrite, il agace.

A mon frère Kévin,
A ma grand-mère Roberte,
A mon grand-père de cœur Christian

-

RÉSUMÉ

Mots clés : Vigne (*Vitis vinifera*) ; *Arabidopsis thaliana* ; Immunité des plantes ; Récepteurs (PRR) ; Signalisation cellulaire et moléculaire ; Chitine, Chitosan, LysM-RLK, CERK1

L'activation des réponses immunitaires des plantes repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (aussi appelés PAMP) par des récepteurs de l'immunité, également nommés PRR (*pattern recognition receptors*). La chitine, principal composant de la paroi des champignons, est un PAMP bien caractérisé qui induit des réponses de défense aussi bien chez les mammifères que chez les plantes.

La première partie de cette étude met en évidence que deux chito-oligosaccharides, la chitine et le chitosan, agissent comme des PAMP chez la vigne (*Vitis vinifera*) puisqu'ils induisent des évènements précoces de signalisation, l'expression de gènes de défense et une résistance contre des agents pathogènes. Ces résultats suggèrent que des systèmes de perception existent chez la vigne. Une analyse phylogénétique a permis d'identifier trois récepteurs kinases à domaine LysM (LysM-RLK ou LYK) chez *V. vinifera* (VvLYK1-1, -2, -3) appartenant au même clade que le récepteur à la chitine chez Arabidopsis et nommé AtCERK1 (*Arabidopsis thaliana Chitin Elicitor Receptor Kinase 1*). Leur analyse fonctionnelle a été réalisée par complémentation du mutant d'Arabidopsis *Atcerk1*, affecté dans la perception de la chitine. Nos résultats montrent que VvLYK1-1 et VvLYK1-2, mais pas VvLYK1-3, complémentent fonctionnellement le mutant *Atcerk1* en restaurant l'activation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et l'expression de gènes de défense induits par les chito-oligosaccharides. De plus, l'expression de VvLYK1-1 chez *Atcerk1* restaure la résistance basale à l'agent de l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*).

La seconde partie du projet s'est focalisée sur les éliciteurs oligosaccharidiques de type « *damage-associated molecular patterns* (DAMP) ». Ces molécules endogènes peuvent provenir de la dégradation de la paroi lors d'une attaque et sont capables d'activer les réponses immunitaires de la plante. Les DAMP les mieux caractérisés actuellement sont les oligogalacturonates (OG), des fragments de pectine qui induisent des réponses immunitaires chez de nombreuses espèces végétales dont l'activation de MAPK, la production d'H_2O_2, l'expression de gènes de défense et le dépôt de callose. Nous avons montré dans cette étude que les xyloglucanes (Xh), des fragments d'hémicellulose pariétale purifiés, induisaient l'activation de MAPK et l'expression de gènes de défense chez la vigne et Arabidopsis, afin d'induire une résistance contre le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Les Xh induisent également la production de resvératrol, une phytoalexine majoritaire chez la vigne, et un dépôt de callose chez Arabidopsis. Par une approche génétique, nous avons identifié certains composants de la signalisation induite par les Xh chez Arabidopsis. L'utilisation de mutants suggère que la résistance induite par les Xh *contre B. cinerea* est dépendante des voies de la camalexine, de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène chez Arabidopsis. De manière globale, nos résultats mettent en lumière que les xyloglucanes peuvent être considérés comme de nouveaux éliciteurs de l'immunité chez la vigne et Arabidopsis.

ABSTRACT

Keywords : Grapevine (*Vitis vinifera*) ; *Arabidopsis thaliana* ; Plant immunity ; Pattern Recognition Receptors (PRR) ; Molecular cell signaling ; Chitine; Chitosan; LysM-RK; CERK1

Activation of the plant immune responses requires recognition of common pathogen-associated molecular pattern (PAMP) by their cognate pattern recognition receptors (PRR). Chitin, a major component of fungal cell walls, is a well-known PAMP that triggers defense responses in several mammal and plant species.

In the first part of this study, we show that two chitooligosaccharides, chitin and chitosan, act as PAMP in grapevine (*Vitis vinifera*) as they elicit immune signaling events, defense gene expression, and resistance against pathogens. These two PAMP are active in grapevine suggesting that at least one perception system exists. Phylogenetic analysis clearly distinguished three *V. vinifera* LysM Receptor-like Kinases (VvLYK1-1, -2, -3) located in the same clade as the Arabidopsis Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (AtCERK1), which mediates chitin-induced immune responses. Their functional characterization was achieved by complementation assays in the *Atcerk1* mutant, impaired in chitin perception. Our results provide evidence that VvLYK1-1 and VvLYK1-2, but not VvLYK1-3, functionally complement the loss of AtCERK1 function by restoring chitooligosaccharide-induced MAPK activation and immune gene expression. Moreover, expression of VvLYK1-1 in *Atcerk1* restored penetration resistance to the non-adapted grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*).

The second part of this study focused on damaged-associated molecular patterns (DAMP), endogenous molecules that can be released from the plant cell wall during an attack and activate the plant innate immunity. Until now, the best characterized DAMP are oligogalacturonides (OG) coming from pectin fragments that induce innate immune responses in various plant species, including MAPK activation, H_2O_2 production, defense gene expression and callose deposition. In this study, we showed that purified xyloglucans (Xh), derived from the plant cell wall hemicellulose, elicit MAPK activation and immune gene expression in grapevine (*V. vinifera*) and Arabidopsis to trigger induced resistance against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. Xh also elicit the production of resveratrol, the main grapevine phytoalexin, and callose deposition in Arabidopsis. Using a genetic approach, we identified some signaling components of Xh-induced immunity. The use of Arabidopsis mutants suggests that Xh-induced resistance against *B. cinerea* is dependent on the camalexin, salicylate, jasmonate and ethylene pathways. Taken together, our data highlight that Xh can be considered as new elicitors of grapevine and Arabidopsis immunity.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 2

RESUME 5

ABSTRACT 6

TABLE DES MATIERES 7

ABREVIATIONS 10

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE 12

1. CONTEXTE DE L'ETUDE 12
1.1. CONTEXTE SOCIO-ECONOMIQUE 12
1.2. LA VIGNE ET SES MALADIES 13
1.3. LES MOYENS DE LUTTE ALTERNATIFS 15

2. IMMUNITE DES PLANTES 16
2.1. PAMP-TRIGGERED IMMUNITY (PTI) 17
2.2. EFFECTOR-TRIGGERED IMMUNITY (ETI) 24
2.3. TRANSDUCTION DU SIGNAL 24
2.4. REPONSES DE DEFENSE DES PLANTES 33

3. PERCEPTION DE LA CHITINE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA* ET LE RIZ 39
3.1. LA CHITINE ET AUTRES CHITO-OLIGOSACCHARIDES 39
3.2. PERCEPTION DE LA CHITINE CHEZ LE RIZ ET ARABIDOPSIS 40
3.3. SIGNALISATION ET REPONSES IMMUNITAIRES INDUITES PAR LES CHITO-OLIGOSACCHARIDES 44

4. OBJECTIFS DES RECHERCHES 44
4.1. LE PROJET ANR « KBBE PATRIC » 44
4.2. OBJECTIF DE LA THESE 45

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 47

1. MATERIELS 47
1.1. MATERIELS RELATIFS A LA VIGNE 47
1.2. MATERIEL RELATIF A *ARABIDOPSIS THALIANA* 48
1.3. ELICITEURS 49

2. METHODES 50
2.1. TRAITEMENT DES CELLULES ET DES FEUILLES DE VIGNE ET D'ARABIDOPSIS 50
2.2. GENOTYPAGE DES PLANTES D'ARABIDOPSIS 51
2.3. VARIATIONS DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM LIBRE CYTOSOLIQUE 52
2.4. PRODUCTION D'H_2O_2 53
2.5. IMMUNODETECTION DES MAPK PHOSPHORYLEES 54
2.6. SYNTHESE D'ADNC ET PCR QUANTITATIVE (QPCR) 55
2.7. TESTS DE RESISTANCE INDUITE 55

2.8. DETECTION DES DIFFERENTS METABOLITES DE DEFENSE 57
2.9. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE 58
2.10. EFFET ANTI FONGIQUE SUR LA CROISSANCE *IN VITRO* DE *B. CINEREA* 59
2.11. STRATEGIE D'EDITION GENOMIQUE PAR CRISPR-CAS9 59

CHAPITRE III : PERCEPTION DES CHITO-OLIGOSACCHARIDES CHEZ LA VIGNE 62

1. RESUME DE LA PUBLICATION 62
1.1. RESULTATS PRINCIPAUX 62
1.2. MA CONTRIBUTION A L'ETUDE 63

2. PUBLICATION 1 64
THE GRAPEVINE (*VITIS VINIFERA*) LYSM RECEPTOR KINASES VVLYK1-1 AND VVLYK1-2 MEDIATE CHITOOLIGOSACCHARIDE-TRIGGERED IMMUNITY. 64

3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES 93
3.1. MESURE DE LA PRODUCTION D'H_2O_2 EN REPONSE A LA CHITINE SUR DISQUES FOLIAIRES DES LIGNEES *ATCERK1/VVLYK1* 93
3.2. BIOTESTS DE RESISTANCE A *BOTRYTIS CINEREA* D'*ATCERK1* ET DES LIGNEES SUREXPRIMANT *VVLYK1-1* ET *VVLYK1-3* 93
3.3. BIOTESTS DE RESISTANCE A *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TOMATO* DC3000 D'*ATCERK1* ET DES LIGNEES SUREXPRIMANT *VVLYK1-1* ET *VVLYK1-3* 94

4. DISCUSSION 94
4.1. LES LIGNEES *ATCERK1/VVLYK1* NE RESTAURENT PAS LA PRODUCTION DE FAO CHEZ LE MUTANT *ATCERK1*. 94
4.2. ATCERK1, VVLYK1-1 ET VVLYK1-3 NE PARTICIPENT PAS A LA RESISTANCE BASALE CONTRE *BOTRYTIS CINEREA* ET *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV.* TOMATO DC3000. 95

CHAPITRE IV : IDENTIFICATION D'UN NOUVEL ELICITEUR DE L'IMMUNITE DES PLANTES: LES XYLOGLUCANES 97

1. CONTEXTE ET RESULTATS PRINCIPAUX 97
1.1. PRESENTATION DES XYLOGLUCANES 97
1.2. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE 98
1.3. RESUME DE LA PUBLICATION 98

2. PUBLICATION 2 100
THE CELL WALL-DERIVED XYLOGLUCAN IS A NEW DAMP TRIGGERING PLANT IMMUNITY IN *VITIS VINIFERA* AND *ARABIDOPSIS THALIANA*. 100

3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES 123
3.1. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE 123
3.2. MESURE DE LA PRODUCTION D'H_2O_2 SUR DISQUES FOLIAIRES D'ARABIDOPSIS 123
3.3. DOSAGE DE METABOLITES CHEZ ARABIDOPSIS 123
3.4. IMMUNODETECTION DES MAPK PHOSPHORYLEES A DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT D'ARABIDOPSIS 124
3.5. COMPARAISON DE DIFFERENTS LOTS DE XYLOGLUCANES : EFFET DE L'ARABINOSE 124

4. DISCUSSION 125
4.1. LES XH N'INDUISENT PAS DE MORT CELLULAIRE NI DE FAO SUR DISQUES FOLIAIRES D'ARABIDOPSIS 125
4.2. UNE PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES EST OBSERVEE CHEZ ARABIDOPSIS EN REPONSE AUX XH ET LORS DE LA RESISTANCE INDUITE CONTRE *B. CINEREA* 126
4.3. EFFET DE L'AGE DES PLANTES ET DE LA COMPOSITION DES XH SUR LEUR ACTIVITE ELICITRICE 128

CHAPITRE V : RECHERCHE D'UN RECEPTEUR AUX XYLOGLUCANES 131

1. APPROCHE AVEC A PRIORI BASEE SUR LA LITTERATURE 131

2. APPROCHE SANS A PRIORI A PARTIR D'ANALYSE DE DONNEES MICROARRAYS 132
2.1. ANALYSE DU PHENOTYPE DE MUTANTS T-DNA DES GENES CANDIDATS SELECTIONNES 132
2.2 STRATEGIE D'EDITION GENOMIQUE PAR CRISPR-CAS9 DE *ARK1/ARK2* 133

3. DISCUSSION 136
3.1. IDENTIFICATION DU PROBLEME RENCONTRE LORS DE LA STRATEGIE D'EDITION GENOMIQUE 136
3.2. AUTRES PERSPECTIVES 138

CHAPITRE VI. DISCUSSION GENERALE 140

1. LES XH : DE NOUVEAUX PRODUITS STIMULATEURS DE DEFENSE DES PLANTES ? 140

2. LES PRR UTILISABLES EN AMELIORATION VARIETALE ? 141

CHAPITRE VII. CONCLUSION & PERSPECTIVES 144

AUTRES CONTRIBUTIONS 148

1. ARTICLE SCIENTIFIQUE 3 148
PERCEPTION OF PATHOGENIC OR BENEFICIAL BACTERIA AND THEIR EVASION OF HOST IMMUNITY : PATTERN RECOGNITION RECEPTORS IN THE FRONTLINE 148

2. ARTICLE SCIENTIFIQUE 4 149
LUTTER CONTRE LES INFECTIONS BACTERIENNES : LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES PLANTES EST AUSSI TRES EFFICACE ! 149

ACTIVITES SCIENTIFIQUES 150

ANNEXES 152

ANNEXE 1. NITSCH-NITSCH 152
ANNEXE 2. MURASHIGE AND SKOOG 152
ANNEXE 3. LURIA-BERTANI 153
ANNEXE 4. SUPER OPTIMAL BROTH WITH CATABOLITE REPRESSION 153
ANNEXE 5. YEAST EXTRACT YEP 153

REFERENCES 154

ABRÉVIATIONS

ABA : Acide abscissique
ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ACS : ACC synthase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AOC : Allène oxyde cyclase
AOS : Allène oxyde synthase
ARK : Arabidopsis receptor kinase
ARN : Acide ribonucléique
ARNg : ARN guide
ATP : Adénosine triphosphate
BAK1 : Brassinosteroid insensitive 1 (BIR1)-associated receptor kinase
BcPG1 : Endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea*
BIK1 : Botrytis-induced kinase 1
C4H : Cinnamate 4-hydroxylase
CDPK : Ca^{2+}-dependent protein kinases
CeBIP : Chitin elicitor-binding protein
CERK1 : Chitin elicitor receptor kinase 1
CHIB : Endochitinase B
COI1 : Coronatine insensitive 1
Col-0 : Columbia 0
COS : Chito-oligosaccharides
CP : Capside
CRISPR-Cas9 : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRK : Cysteine-rich receptor-like protein kinases
cv. : Cultivar
CWDE : Cell wall degrading enzymes
DA : Degré d'acétylation
DAF : Di-acétate de fluorescéine
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DP : Degré de polymérisation
DTT : Dithiothréitol
EDS1 : Enhanced disease susceptibility 1
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
EF-Tu : Facteur d'élongation EF-Tu
EFR : EF-Tu receptor
EGF : Epidermal growth factor
EGF_CA : Calcium-binding EGF-like domain
EGTA : Acide éthylène glycol tétra-acétique
EIN : Ethylene insensitive
ERF : Ethylene response factor
ET : Ethylène
ETI : Effector-triggered immunity
ETR1 : Ethylene response 1
ETS : Effector-triggered susceptibility
FAO : Formes actives de l'oxygène
FLS2 : Flagellin sensing 2
FRK1 : FLG22-induced receptor-like kinase 1
GCL : Glutamate-cysteine ligase
GlcNAc : N-acétylglucosamines
GLR : Glutamate receptor-like
GLS5 : Glucan synthase-like 5
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GSH : Glutathion
GSTF : Glutathion-S-transferase
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HDA : Histone désacétylase
HPAEC-PAD : Chromatographie ionique avec détecteur par ampérométrie pulsée
Hpi : Heures post-inoculation
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
Hpt : Heures post-traitement
HRP : Peroxydase de raifort
IAN : Indole 3 acétonitrile
IAOx : Indole-3-acétaldoxime
ICS : Isochorismate synthase
JA : Acide jasmonique
JAR1 : Jasmonate resistant 1
JAZ : Jasmonate zim-domain
Jpi : Jours post-inoculation
LB : Luria-Bertani
LCO : Lipochitooligosaccharides
LORE : Lipooligosaccharide-specific reduced elicitation
LOX : Lipoxygénase
LPS : Lipopolysaccharides
LRR : Répétitions riches en leucine
LYK : LysM-containing receptor-like kinase1
LysM : Motifs à lysine
MAMP : Microbe-associated molecular patterns
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MeSa : Salicylate de méthyle
MLA1 : Mildew resistance locus A

MS : Murashige and Skoog
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaF : Fluoride de sodium
NASC : Nottingham Arabidopsis Stock Center
NB : Nucleotide binding domain
NINJA : Novel interactor of jaz
NLR : Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat receptors
NO : Monoxyde d'azote
NPK : Azote, Phosphore, Potassium
NPR1 : Non-expressor of pathogenesis related genes 1
OG : Oligogalacturonates
OIV : Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
OPDA : Acide 12-oxophytodiénoïque
OPR3 : OPDA réductase 3
PAD : Phytoalexin deficient
PAL : Phénylalanine ammonium lyase
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAN : Plasminogene, apple, nematode
PATRIC : PAMP-triggered immunity in crops
PCR : Polymerase chain reaction
PDB : Potato Dextrose Broth
PDF1.2 : Plant defensin 1.2
PG : Polygalacturonases
PGN : Peptidoglycane
PGPR : Plant growth-promoting rhizobacteria
PMR4 : Powdery mildew resistant 4
PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PR : Pathogenesis-Related
PRR : Pattern Recognition Receptors
PS3 : Laminarine sulfatée
PTI : PAMP-triggered immunity
pv. : Pathovar
RacGEF1 : GDP/GTP exchange factor for Rac1
RBOH : Respiratory burst oxidase homolog
RE : Réticulum endoplasmique
RH : Réponse hypersensible
RLCK : Receptor-like cytoplasmic kinase
RLK : Receptor-Like Kinases
RLP : Receptor-Like Proteins
RLU : Unités relatives de luminescence
RMN : Résonnance magnétique nucléaire
ROS : Reactive oxygen species
rpm : Rotation per minute
RSA : Résistance systémique acquise
RSI : Résistance systémique induite
SA : Acide salicylique
SAB : Sérum-albumine bovine
SAG : SA glucosylé
SAM : S-adénosylméthionine
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SID2 : Salicylic acid induction-deficient 2
SLG : S locus glycoprotein
SOBIR1 : Suppressor of BIR1
SOC : Super optimal broth with catabolite repression
SOD : Superoxide dismutase
STS : Stilbène synthase
TGA : TGACG motif-binding proteins
TIR : Toll/interleukin-1 receptor
TLR : Toll-like receptors
TPL : Topless
UFC : Unité formant colonie
var. : Variété
VPE : Vacuolar processing enzymes
VSP2 : Vegetative storage protein 2
WAK : Wall-associated kinase
WAKL : WAK-like
Xh : Xyloglucanes
YEP : Yeast extract peptone

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Contexte de l'étude

1.1. Contexte socio-économique

Le climat tempéré, la variété des sols et la diversité des cépages français favorisent la culture de la vigne sur l'ensemble du territoire. Environ 780 000 hectares, soit 1,4% du territoire national, sont consacrés à la vigne (Agreste, FranceAgriMer, 2015). En 2017, la France confirme sa place de second producteur mondial (après l'Italie) avec 36,7 millions d'hectolitres produits d'après l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV, 2017). Cela représente environ 15% de la valeur nationale de la production agricole. Le vin produit est également destiné à l'exportation et a rapporté environ 9 milliards d'euros de chiffre d'affaires en 2017 (OIV). Malheureusement, la vigne est sensible à de nombreuses maladies qui menacent chaque année la quantité et la qualité des récoltes.

Encore aujourd'hui, les méthodes de lutte font principalement recours aux traitements phytosanitaires. L'emploi intensif de ces produits chimiques s'avère être polluant et dangereux pour l'environnement et la santé humaine (des viticulteurs et des consommateurs). De plus, ces traitements favorisent la sélection de souches de microorganismes pathogènes résistantes à certains pesticides. La filière viticole française reste la plus grosse consommatrice de pesticides alors que le vignoble ne représente que 3% de la surface agricole utile (Agreste, FranceAgriMer, 2015).

Une nouvelle initiative a été lancée à la suite du Grenelle de l'Environnement en 2008 avec la mise en place du plan Ecophyto 2018, qui visait à réduire progressivement l'usage des produits phytosanitaires en France tout en maintenant une agriculture économiquement performante. Deux aspects ont été pris en compte : d'une part, une interdiction d'une trentaine de substances actives les plus toxiques (dont 11 concernaient la vigne) ; d'autre part, les quantités d'intrants phytosanitaires devaient réduire de 50% d'ici 2018. Si la suppression des substances toxiques a été efficace, la réduction des quantités de pesticides utilisées a été un échec. Aujourd'hui, les objectifs

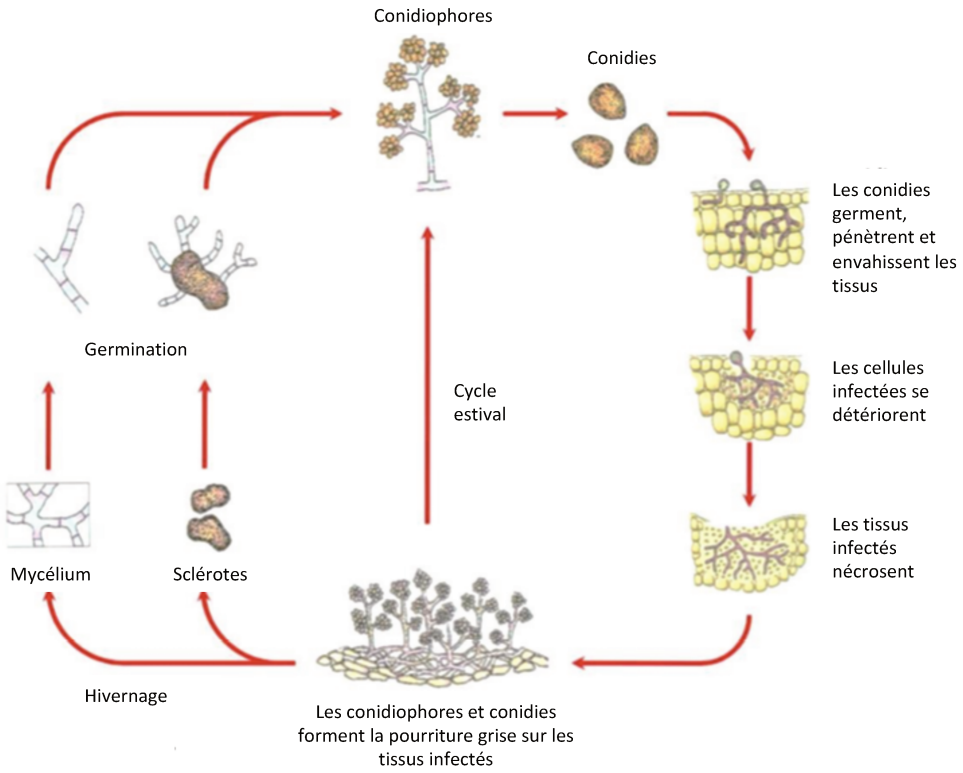


Figure 1: Cycle biologique de *Botrytis cinerea*, l'agent responsable de la pourriture grise de la vigne (Gauthier, 2009).

de ce plan ont été revus et constituent le plan Ecophyto 2 avec entre autres, le report des 50% de réduction des pesticides d'ici 2025.

1.2. La vigne et ses maladies

La vigne cultivée (*Vitis vinifera*) est une plante sensible à de nombreuses maladies. Parmi les différents agents pathogènes qui affectent la vigne, on trouve des bactéries, des virus ou encore des phytoplasmes. Néanmoins, la majorité des dégâts sont causés par des champignons pathogènes et des oomycètes touchant le bois, les feuilles ou les baies. Le mildiou (*Plasmopara viticola*), la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) et l'oïdium (*Erysiphe necator*) sont les trois maladies cryptogamiques principales qui touchent la vigne.

1.2.1. La pourriture grise – *Botrytis cinerea*

B. cinerea est un champignon nécrotrophe de la famille des *Sclerotiniaceae* responsable de la pourriture grise. Il infecte plus de 235 espèces végétales dont la plupart sont des plantes d'intérêt agronomique telles que la vigne ou la tomate (Staats, 2004). Le champignon hiverne principalement sous forme de sclérotes (masses compactes de mycélium) dans les baies ou les sarments de vigne (Figure 1). Au printemps, ces structures peuvent germer et produire des conidiophores portant les conidies, la source primaire d'infection. Dans des conditions adéquates, les conidies sont dispersées par la pluie ou le vent avant de trouver de nouvelles plantes hôtes. Dans la majorité des cas, les conidies entrent par le biais des tissus blessés ou contenant un taux de sucre élevé. Bien que les symptômes les plus marqués soient sur les baies, *B. cinerea* peut également infecter les jeunes feuilles ou les inflorescences. Les conidies vont produire de nouveaux mycéliums qui envahiront les tissus en induisant leurs nécroses. Ceux-ci généreront alors de nouveaux conidiophores nécessaire à de nouveaux cycles d'infections durant les saisons printemps/été, jusqu'à ce que les conditions automnales poussent le champignon à hiverner (Elmer and Michailides, 2007).

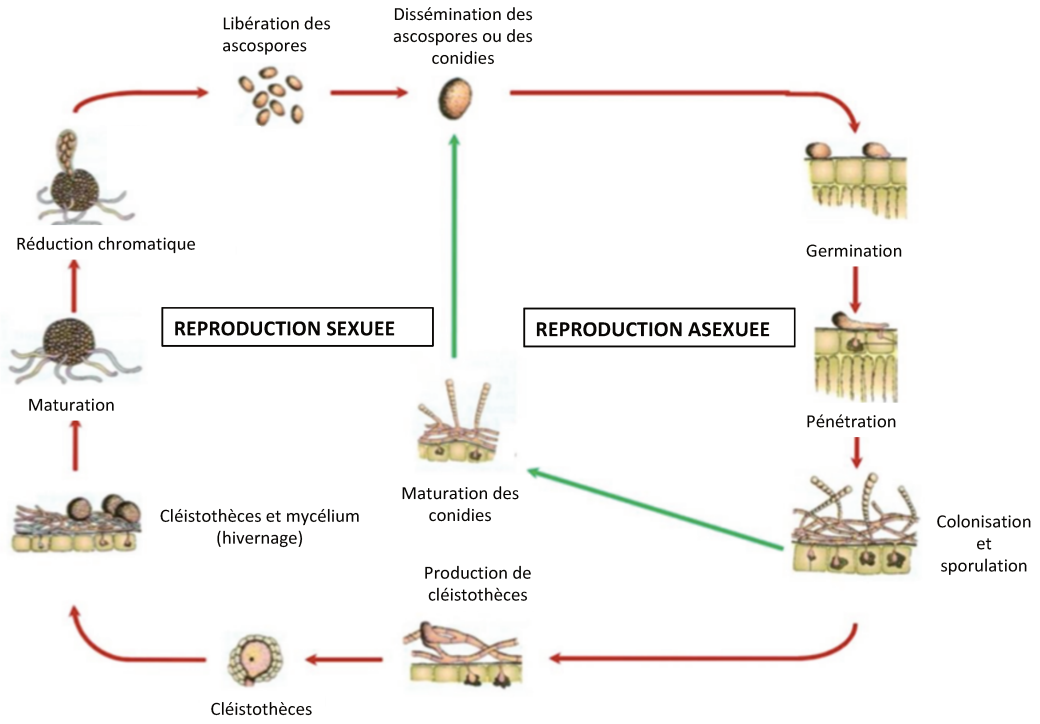


Figure 2: Cycle biologique d'*Erysiphe necator*, l'agent responsable de l'oïdium de la vigne (Gauthier, 2009).

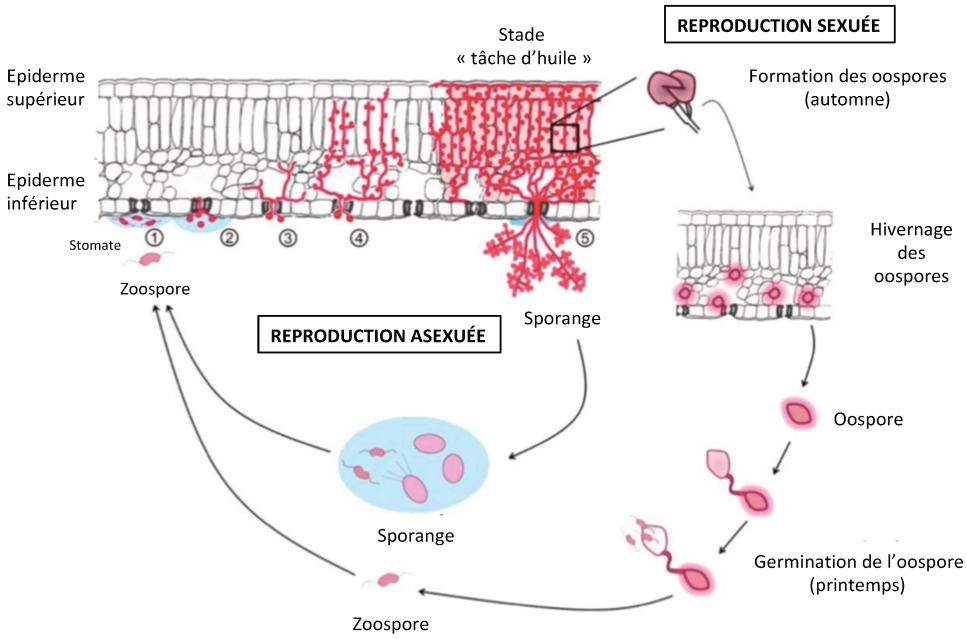


Figure 3: Cycle biologique de *Plasmopara viticola*, l'agent responsable du mildiou de la vigne (Gamm, 2011).

1.2.2. L'oïdium - *Erysiphe necator*

Erysiphe necator est un champignon biotrophe obligatoire de la famille des *Ascomycètes* qui se développe sur les organes herbacés, à savoir les feuilles, les inflorescences et les jeunes baies. Il colonise les cellules épidermiques des tissus photosynthétiques en formant un mycélium dense. Lors de la germination des conidies, un tube germinatif émerge et se différencie afin de former un appressorium qui perfore la cuticule puis un haustorium qui assure la nutrition du champignon au détriment de l'hôte (Figure 2). Les conidiophores, visibles sous forme de taches blanches, apparaissent sur la surface supérieure des feuilles dans des conditions humides et sont une source d'infections secondaires. En conditions climatiques défavorables, le champignon hiverne sous la forme de cléistothèces, les organes contenant les spores sexuées : les ascospores. Au printemps, les ascospores matures se propagent, disséminés par le vent, et germent à la surface des feuilles formant l'inoculum primaire (Agrios, 2005).

1.2.3. Le mildiou – *Plasmopara viticola*

P. viticola est un oomycète biotrophe obligatoire de la famille des *Peronosporaceae* inféodé à la vigne et touchant les organes herbacés. Cette maladie a été introduite en Europe en 1878 lors de l'importation de porte-greffes américains résistants au phylloxera (Gessler et al., 2011). Toutes les variétés de *V. vinifera* sont sensibles à *P. viticola*, contrairement aux espèces américaines *V. riparia*, *V. rupestris* et *V. labrusca* qui sont généralement résistantes (Bellin et al., 2009). Les oospores issues de la reproduction sexuée ont hiverné dans les débris de feuilles ou dans le sol. Au printemps, elles germent pour induire la production de macrosporanges qui libèrent des zoospores, responsables des inoculations primaires sur feuilles et inflorescences (Figure 3). Leur dispersion est principalement assurée par les éclaboussures de gouttes de pluie. Les zoospores biflagellées peuvent ainsi infecter les feuilles *via* les stomates. Après un temps d'incubation de 7 à 10 jours, la maladie se caractérise par des symptômes caractéristiques « taches d'huile » présents sur la face supérieure des feuilles. Une forte humidité relative et des températures douces favorisent la sporulation qui peut être observée sur la face inférieure des feuilles sous la forme d'un duvet blanc. Les tissus altérés finissent par se dessécher entraînant la chute des feuilles. Après un temps

d'incubation variable, en général compris entre 5 et 10 jours, *P. viticola* peut produire des sporanges contenant les zoospores produites par reproduction asexuée, occasionnant ainsi des contaminations secondaires. Plusieurs cycles d'infection sexués et asexués peuvent ainsi se suivre durant le printemps et l'été (Agrios, 2005; Gessler et al., 2011).

1.3. Les moyens de lutte alternatifs

Afin de réduire l'usage des intrants phytosanitaires, plusieurs alternatives sont possibles. La création d'hybrides et de plants génétiquement modifiés peut être envisagée pour lutter contre les maladies de la vigne. L'amélioration génétique permet d'introduire des gènes de résistance par hybridation ou transgénèse dans le génome de vignes sensibles. En 2018, l'INRA a d'ailleurs obtenu l'inscription au catalogue officiel de quatre variétés (Artaban, Floreal, Vidoc et Voltis) sélectionnées pour une viticulture durable. Ces variétés sont le fruit de croisements d'une part des géniteurs INRA sélectionnés par Alain Bouquet et d'autre part, de deux obtentions du Julius Kuhn Institut (Allemagne). Cette stratégie de croisement a permis d'associer deux gènes de résistance au mildiou et deux gènes de résistance à l'oïdium, provenant de *Vitis rotundifolia* et d'un groupe d'espèces où domine *Vitis rupestris*. Selon la pression de maladie, un nombre réduit de traitements fongicides complémentaires est préconisé, conduisant à une économie se situant entre 80% et 90%. La qualité des vins est jugée comparable à celle des cépages traditionnels (www.inra.fr). Dans le cadre de la lutte raisonnée, les traitements phytosanitaires sont effectués en fonction du risque de développement de la maladie. Le niveau de risque dépend notamment de la sensibilité du cépage, des conditions météorologiques, de la parcelle ou encore des derniers traitements effectués.

La lutte biologique fait partie des alternatives possibles au vignoble. Par exemple, des suspensions de spores de *Fusarium proliferatum* sont capables de réduire l'infection par *P. viticola* sur disques foliaires et au vignoble (Falk et al., 1996). Plus récemment, deux souches de *Bacillus* ont également permis de réduire l'infection par l'agent du mildiou au laboratoire et au vignoble (Zhang et al., 2017). Des produits de biocontrôle sont d'ailleurs homologués en viticulture tels que Botector (*Aureobasidium pullulans* ; De Sangosse) et Serenade Max (*Bacillus subtilis* souche QST 713 ; Bayer) contre la

pourriture grise, Esquive WP (*Trichoderma atroviride* l-1237 ; Bayer) contre les maladies du bois ou encore Xentari (*Bacillus thuringiensis var*. aizawai ; Valent Biosciences) contre les chenilles tordeuses de la vigne.

Enfin, une autre méthode de lutte alternative consiste à stimuler les défenses des plantes par des éliciteurs. Certains d'entre eux sont efficaces pour induire une résistance aux maladies. Depuis quelques années, il a été montré que la vigne perçoit une large gamme d'éliciteurs. Parmi elle, on peut citer la laminarine (Aziz et al., 2003), un ß-glucane linéaire et PS3, une laminarine sulfatée (Trouvelot et al., 2008), les rhamnolipides (Varnier et al., 2009), le chitosan, un dérivé désacétylé de chitine (Aziz et al., 2006), les oligogalacturonates (OG), des fragments pariétaux (Aziz et al., 2004) ou encore les ulvanes, des polysaccharides sulfatés provenant d'algues vertes (Jaulneau et al., 2010, 2011). Ces stimulateurs de défense des plantes (SDP) induisent chez la vigne une signalisation et des réponses immunitaires généralement similaires à celles observées chez d'autres espèces végétales (Boller and Felix, 2009). Par exemple, les rhamnolipides élicitent des influx de Ca^{2+}, une production d'H_2O_2, la phosphorylation de *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) menant à l'expression de gènes de défense et à une réponse hypersensible (RH ; § 2.4.4. ; Varnier et al., 2009). La production de chitinases et glucanases, des enzymes possédant une activité antimicrobienne, est également observée suite à un traitement à la laminarine ou aux OG (Aziz et al., 2003, 2004).

2. Immunité des plantes

Les plantes sont constamment exposées à différents stress biotiques et abiotiques provenant de leur environnement. Par conséquent, elles sont capables d'induire des réponses biologiques adaptatives face à ces stress. Les plantes développent ainsi des stratégies efficaces de résistance aux microorganismes potentiellement pathogènes grâce à la combinaison de réponses immunitaires constitutives et induites. Face aux agents pathogènes, la première ligne de défense des plantes repose sur la présence de barrières physiques et chimiques, composées de la cuticule, la paroi cellulaire et la production permanente de métabolites secondaires à activité antimicrobienne (Yu et al., 2017). Si, dans la plupart des cas, ces défenses

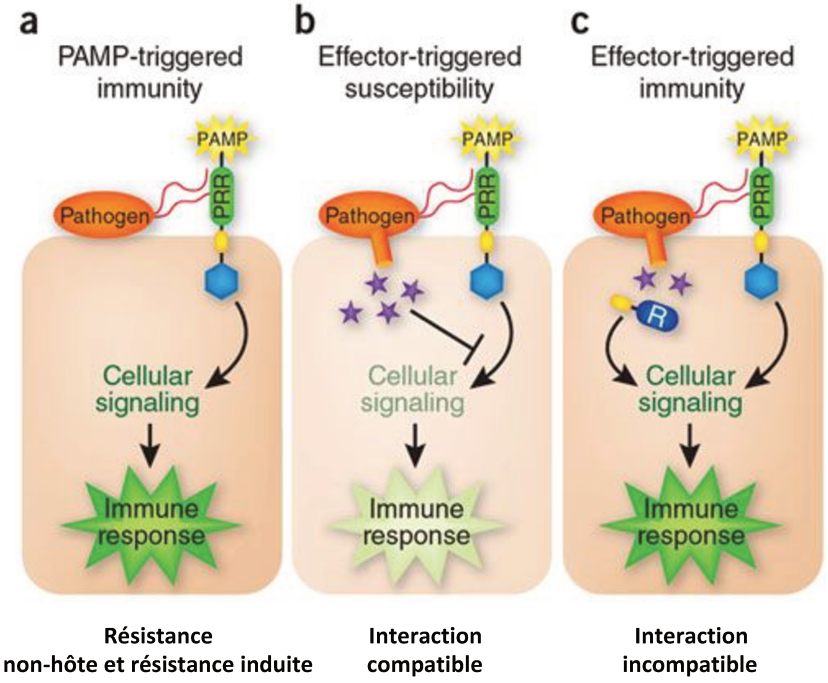


Figure 4: Représentation schématique simplifiée du système immunitaire des plantes (adapté de Pieterse et al. 2009).

a. Lors de l'attaque par un agent pathogène, la reconnaissance d'un motif moléculaire appelé *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (PAMP) par un récepteur de l'immunité nommé *Pattern Recognition Receptor* (PRR) provoque l'activation d'une cascade de signalisation conduisant à la *PAMP-Triggered Immunity* (PTI). On parle alors de résistance non-hôte et de résistance induite.

b. Les agents pathogènes virulents produisent des effecteurs qui bloquent la PTI, conduisant à l'*effector-triggered susceptibility* (ETS). C'est l'interaction compatible entre la plante et l'agent pathogène.

c. En réponse à l'ETS, certaines espèces végétales produisent des protéines de résistance (R) capables de reconnaître les effecteurs microbiens et activent une seconde réponse immunitaire appelée *effector-triggered immunity* (ETI), menant à une interaction incompatible.

constitutives sont suffisantes pour la protéger, il arrive que l'agent pathogène parvienne à infecter la plante en pénétrant par les stomates, par une blessure ou en synthétisant des enzymes hydrolytiques qui vont dégrader la cuticule et/ou la paroi. Comme les animaux, les plantes possèdent une immunité innée leur permettant de percevoir les microorganismes potentiellement pathogènes grâce à la reconnaissance de motifs moléculaires conservés, aussi appelés PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* ; Claverie et al., 2016; Jones and Takemoto, 2004). Deux formes d'immunité innée ont été décrites chez les plantes et représentées par le modèle en « zig-zag » : la *PAMP-triggered immunity* (PTI ; Figure 4A; §2.1) et l'*effector-triggered immunity* (ETI ; Figure 4C; Jones and Dangl, 2006). La PTI constitue le premier niveau de défense inductible. Elle repose sur la reconnaissance des PAMP par des récepteurs de l'immunité appelés *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Les plantes peuvent également percevoir des molécules endogènes appelées DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*), libérées lors de l'interaction avec le microorganisme. Certains microorganismes sont capables de désactiver la PTI grâce à la production d'effecteurs contribuant à la virulence de l'agent pathogène, on parle alors d'*effector-triggered susceptibility* (ETS ; Figure 4B). La seconde forme d'immunité, nommée ETI (§2.2), implique la reconnaissance de ces effecteurs microbiens par des protéines codées par des gènes de résistance (*R*) de la plante (Figure 4C). Lorsque l'interaction entre la plante et l'agent pathogène conduit au développement de la maladie, la plante est sensible et l'interaction est dite compatible (Figure 4B). Si les systèmes de défense mis en place par la plante sont efficaces et parviennent à empêcher la croissance du microbe, la plante est résistante et l'interaction est dite incompatible (Figure 4C).

2.1. PAMP-triggered immunity (PTI)

2.1.1. Les PAMP et les DAMP

Durant l'interaction plante-microorganisme, les PAMP (également appelés *microbe-associated molecular patterns ;* MAMP) sont considérés comme les premières molécules détectées par la plante. Les PAMP sont des motifs moléculaires conservés qui occupent des fonctions essentielles dans la survie et la valeur sélective des microorganismes. De ce fait, malgré une très forte pression de sélection exercée sur ces

PAMP	Source	Références
Alginate	Algue brune	Potin et al., 1999; Akimoto et al., 2000; Chandía et al., 2004; An et al., 2009; Zhang et al., 2015
ß-1,3-glucane linéaire	Champignon	Mélida et al., 2018
ß-galactofuranose polysaccharide	Insecte	Bricchi et al., 2013
ß-glucane (laminarine)	Algue brune	Kobayashi et al., 1993; Inui et al., 1997; Cardinale et al., 2000; Klarzynski et al., 2000; Aziz et al., 2003; Renard-Merlier et al., 2007; Fu et al., 2011; Gauthier et al., 2014
ß-glucane sulfaté (laminarine sulfatée, PS3)		Ménard et al., 2004; Ghannam et al., 2005; Ménard et al., 2005; Trouvelot et al., 2008; Steimetz et al., 2012; Gauthier et al., 2014
Fructooligosaccharide	Bardane	Wang et al., 2009; Guo et al., 2012
Carraghénane	Algue rouge	Patier et al., 1995; Bouarab et al., 1999; Mercier et al., 2001; Sangha et al., 2010; Vera et al., 2012 Shukla et al., 2016
Chitine	Champignon	Pearce and Ride, 1982; Kuchitsu et al., 1993; Kaku et al., 2006; Eckardt, 2008; Hamel and Beaudoin, 2010; Sharp, 2013
Chitosan	Champignon	Köhle et al., 1985; Doares et al., 1995; Lafontaine and Benhamou, 1996; Vasyukova et al., 2001; Cabrera et al., 2006; Amborabe et al., 2008; Iriti and Faoro, 2009; Vasil'ev et al., 2009; Cabrera et al., 2010; El Hadrami et al., 2010; Hamel and Beaudoin, 2010; Li et al., 2014
Extracellular polysaccharides (EPS)	Bactérie	Romeiro and Kimura, 1997
Fucane	Algue brune	Lizzi et al., 1998; Klarzynski et al., 2003; Vera et al., 2011
Glucan-chitosaccharides	Oomycète	Nars et al., 2013
Glucuronane	Algue verte	Caillot et al. 2012; El Modafar et al. 2012; Abouraïcha et al., 2017
Heptaglucoside	Oomycète	Sharp et al., 1984
Ulvane	Algue verte	Cluzet et al., 2004; Abreu et al., 2008; Araújo et al., 2008; Borsato et al., 2010; Jaulneau et al., 2010, 2011; Freitas and Stadnik, 2012; Araújo and Stadnik, 2013; Delgado et al., 2013; Stadnik and De Freitas, 2014

Tableau 1: Synthèse des principaux PAMP de nature oligosaccharidique connus (issue des revues Boutrot and Zipfel, 2017; Trouvelot et al., 2014; Wiesel et al., 2014).

molécules, il est très difficile pour les microorganismes de les modifier ou de les perdre, que le microbe soit pathogène ou non (Jones and Dangl, 2006). De nombreux PAMP et DAMP ont été décrits dans la littérature (Wiesel et al., 2014) et peuvent être de natures diverses : (glyco-)protéiques, saccharidiques ou (glyco-)lipidiques, dont certains seront cités à titre d'exemple.

Parmi les éliciteurs protéiques, les élicitines forment une famille de protéines sécrétées par la plupart des espèces de *Phytophthora* et certaines espèces de *Pythium* (Panabières et al., 1997). Chez le tabac, ces protéines peuvent induire des nécroses de type réponse hypersensible (RH ; §2.4.4), une résistance à *Phytophthora parasitica,* aux virus (Cordelier et al., 2003), aux phytoplasmes (Lherminier et al., 2003) ainsi qu'une résistance systémique acquise (RSA ; §2.4.5) contre des bactéries et des champignons (Kamoun et al., 1993; Ricci et al., 1989). La cryptogéine, sécrétée par l'oomycète *P. cryptogea,* est l'une des élicitines les mieux caractérisées. Elle élicite notamment chez le tabac une RH, l'accumulation de transcrits de gènes de défense et induit une résistance systémique acquise contre *P. parasitica* (Keller et al., 1996).

Des épitopes peptidiques ont également des propriétés élicitrices. Flg22, un peptide de 22 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de la flagelline bactérienne, induit des réponses de défense dans de nombreuses espèces végétales. Chez Arabidopsis, flg22 induit l'accumulation de la protéine *Pathogenesis-Related 1* (PR1), un dépôt de callose, l'expression de gènes de défense tel que *FRK1* (*FLG22-induced receptor-like kinase 1*), la production d'éthylène ainsi qu'une inhibition de croissance des plantules (Gómez-Gómez et al., 1999). De la même manière, la partie N-terminale du facteur d'élongation Tu (EF-Tu) d'*Escherichia coli* est capable d'induire des réponses de défense chez *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) et d'autres *Brassicaceae* (Kunze et al., 2004). Le peptide elf18, composé de 18 acides aminés *N*-acétylés, peut ainsi mimer les réponses induites par la protéine EF-Tu complète. En revanche, un peptide plus court contenant les 12 premiers acides aminés nommé elf12 est inactif en tant qu'éliciteur. De récents travaux ont montré que les motifs conservés des PAMP évoluaient en fonction de la pression de sélection. En effet, même si les PAMP subissent une pression de sélection négative afin de préserver leur fonction, ils sont également soumis à une sélection positive exercée par les PRR. Ainsi, les épitopes flg22 et elf18 varient entre les différentes espèces et souches bactériennes (Cai et al., 2011; Sun et al., 2006).

DAMP	Source	Références
Cellobiose	Cellulose	Souza et al., 2017
D-allose	Monosaccharide	Kano et al., 2010
D-psicose	Monosaccharide	Kano et al., 2011
Cellodextrine	Cellulose	Aziz et al., 2007
Galactinol	Diholoside	Kim et al., 2008
Galactoglucomannane	Paroi primaire et secondaire	Slováková et al., 2000
Glucose	Monosaccharide	Johnson and Ryan, 1990
Lichénine	Paroi cellulaire (Lichen)	Stüobler and Buchenauer, 1996
Oligoagar (DP>4, β-1,4;α-1,3 glucans)	Paroi cellulaire (algue)	Weinberger et al., 1999
Oligogalacturonate	Pectine	Aziz et al., 2007; Davidsson et al., 2017; Ferrari, 2013; Galletti et al., 2008; Hahn et al., 1981; Rasul et al., 2012
Saccharose	Diholoside	Johnson and Ryan, 1990
Trehalose	Diholoside	Reignault et al., 2002; Schluepmann, 2004
Xyloglucane	Hémicellulose	Pavlova et al., 1996

Tableau 2: Principaux DAMP de nature oligosaccharidique connus (adapté de Boutrot and Zipfel, 2017; Trouvelot et al., 2014; Wiesel et al., 2014).

Parmi les éliciteurs glycolipidiques, on retrouve les principaux composants de la membrane externe des bactéries Gram négatives, à savoir les lipopolysaccharides (LPS) et les lipo-oligosaccharides (Newman et al., 2007). Les LPS sont composés d'une longue chaîne polysaccharidique de composition variable (l'antigène-O) et d'une partie conservée constituée d'un coeur oligosaccharidique et du lipide A. Les LPS sont perçus par un grand nombre d'espèces végétales par l'intermédiaire du lipide A ; il a cependant été montré que les plantes sont capables de percevoir le cœur oligosaccharidique et la structure de l'antigène-O (Newman et al., 2007). Suivant la source bactérienne, les LPS peuvent induire différentes réponses de défense telles qu'une production de monoxyde d'azote (NO) ou la transcription de gènes de défense chez Arabidopsis (Zeidler et al., 2004).

Enfin, un certain nombre d'éliciteurs de nature saccharidique ont été identifiés (Tableaux 1 et 2). Les ß-glucanes sont principalement présents dans la paroi des champignons et des plantes. C'est à partir de filtrats de culture de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* que fut démontrée pour la première fois la capacité des ß-glucanes à induire une accumulation de phytoalexines chez le soja (Ayers et al., 1976). Parmi les plus étudiés, la laminarine, extraite de l'algue brune *Laminaria digitata,* possède un squelette linéaire de ß-1,3-glucanes avec un degré de polymérisation (DP) moyen de 25 unités de glucose et quelques ramifications en position 6. La laminarine est un éliciteur des réactions de défense chez le riz (Inui et al., 1997), la luzerne (Cardinale et al., 2000), le tabac (Klarzynski et al., 2000) ou encore la vigne (Aziz et al., 2003). Il a également été montré que la laminarine induit une protection de la vigne contre *P. viticola* et *B. cinerea* ainsi qu'une résistance du tabac au virus de la mosaïque du tabac (Aziz et al., 2003; Klarzynski et al., 2000). La laminarine sulfatée (PS3) induit également une résistance de la vigne contre *P. viticola* (Gauthier et al., 2014; Trouvelot et al., 2008). Une récente étude a identifié les ß-1,3-glucanes linéaires provenant du champignon *Plectosphaerella cucumerina* comme de nouveaux stimulateurs de l'immunité d'Arabidopsis. Ils peuvent en effet induire la phosphorylation de MAPK, des variations de la concentration en calcium cytosolique ainsi que l'expression de gènes de défense (Mélida et al., 2018).

Parmi les autres éliciteurs saccharidiques, les oligogalacturonates (OG) sont certainement les DAMP les mieux caractérisés. Ces oligomères d'acides galacturoniques

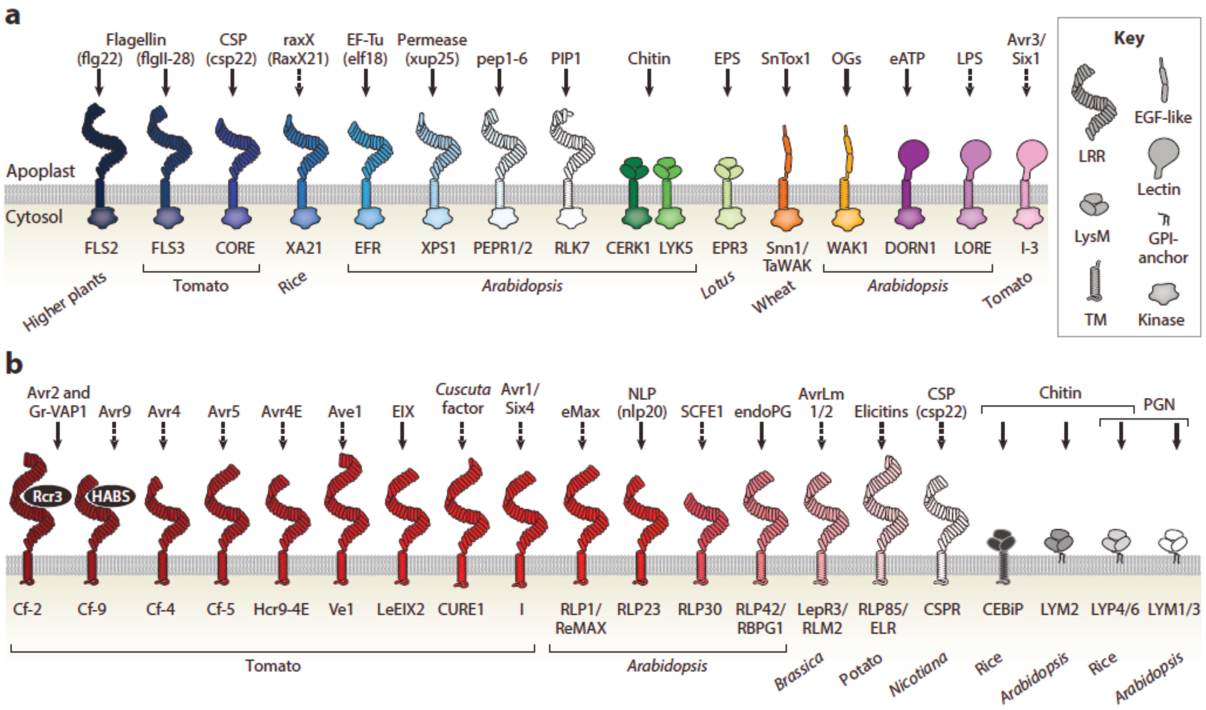


Figure 5: Représentation schématique de PRR et leurs ligands connus (Boutrot and Zipfel, 2017).

a) *Receptor-like kinases* (RLK) **b)** *Receptor-like proteins* (RLP). Les flèches en trait plein indiquent que la liaison du ligand a été démontrée tandis que les flèches en pointillés indiquent un manque de preuves sur la liaison directe du ligand au récepteur.

CEBiP : *chitin elicitor binding protein;* CORE : *cold shock protein receptor;* CSP : *cold-shock proteins;* CURE : *cuscuta receptor;* DORN : *doesn't respond to nucleotides;* EGF : *epidermal growth factor;* EF-Tu : *elongation factor Tu;* EndoPG : *endopolygacturonases*; EIX : *ethylene-inducing xylanase;* ELR *: elicitin response;* EFR : *EF-Tu receptor*; EPS : *extracellular polysaccharides*; FLS : flagellin sensing; GPI : glycophosphatidylinositol; LPS : lipopolysaccharide; LRR : *leucine-rich repeat*; LORE : *lipooligosaccharide-specific reduced elicitation;* LYM *: LysM domain-containing GPI-anchored protein;* LYP *: LysM-containing receptor proteins;* NLP : *Necrosis and ethylene-inducing peptide 1-like proteins;* OGs : oligogalacturonates; LYK : *lysin motif receptor kinase;* PEPR : Pep *receptor;* PGN, peptidoglycane; PIP : *PAMP-induced secreted peptides;* RBPG : *Receptor for B. cinerea polygalacturonases;* RLK : receptor-like kinase; RLP : *receptor-like protein;* SCEF : *Sclerotinia culture filtrate elicitor*; TM : transmembranaire; WAK : *wall-associated kinase.*

reliés entre eux par des liaisons α-1,4 sont libérés suite à la dégradation partielle de la pectine pariétale sous l'action des polygalacturonases (PG) sécrétées par les microorganismes au site d'infection (Ferrari, 2013). Les OG activent, chez différentes espèces végétales, des réponses de défense telles que la production de phytoalexines, l'expression de glucanases et chitinases, un dépôt de callose, la production de formes actives de l'oxygène (FAO) et de NO (Ferrari, 2013) qui conduisent à une protection contre *B. cinerea* et *Blumeria graminis* chez la vigne et le blé, respectivement (Aziz et al., 2004; Randoux et al., 2009).

2.1.2. Les *Pattern Recognition Receptors* (PRR)

De récentes avancées scientifiques ont abouti à l'identification d'un certain nombre de PRR chez les plantes. Ces récepteurs sont généralement localisés dans la membrane plasmique et possèdent divers domaines extracellulaires permettant la reconnaissance des ligands. Les PRR connus appartiennent à la famille des *Receptor-Like Kinases* (RLK) ou aux *Receptor-Like Proteins* (RLP). Les RLK sont des protéines transmembranaires possédant un domaine sérine/thréonine kinase (Macho and Zipfel, 2014). Les RLP présentent la même organisation structurale que les RLK sauf qu'elles ne disposent pas de domaine protéine kinase intracellulaire. Le génome d'Arabidopsis coderait plus de 600 RLK et environ 170 RLP potentielles, et les RLK représenteraient ainsi 60% des protéines kinases (Shiu et al., 2004). Cependant, la majorité des RLK et RLP n'a pas de fonction encore bien définie (Lehti-Shiu et al., 2009).

Jusqu'à présent, quelques couples PAMP/PRR ont été identifiés chez les plantes (Wu and Zhou, 2013). La majorité des PRR comporte des domaines conservés tels que des répétitions riches en leucine (LRR) ou des motifs à lysine (LysM), tandis que d'autres possèdent des motifs de type lectine ou des domaines EGF (*epidermal growth factor*) – like (Figure 5).

2.1.2.1. Récepteurs à répétitions riches en leucine (LRR)

Les PRR contenant des motifs LRR représentent environ la moitié des récepteurs RLK chez Arabidopsis. Chez les plantes, ce domaine extracellulaire est composé d'une répétition de résidus d'acides aminés contenant une séquence consensus IPxxLxxLxxLxxLxLxxNxL(T/S)Gx (x désigne n'importe quel acide aminé et L peut être substitué par un autre résidu hydrophobe) et permettant la reconnaissance des ligands

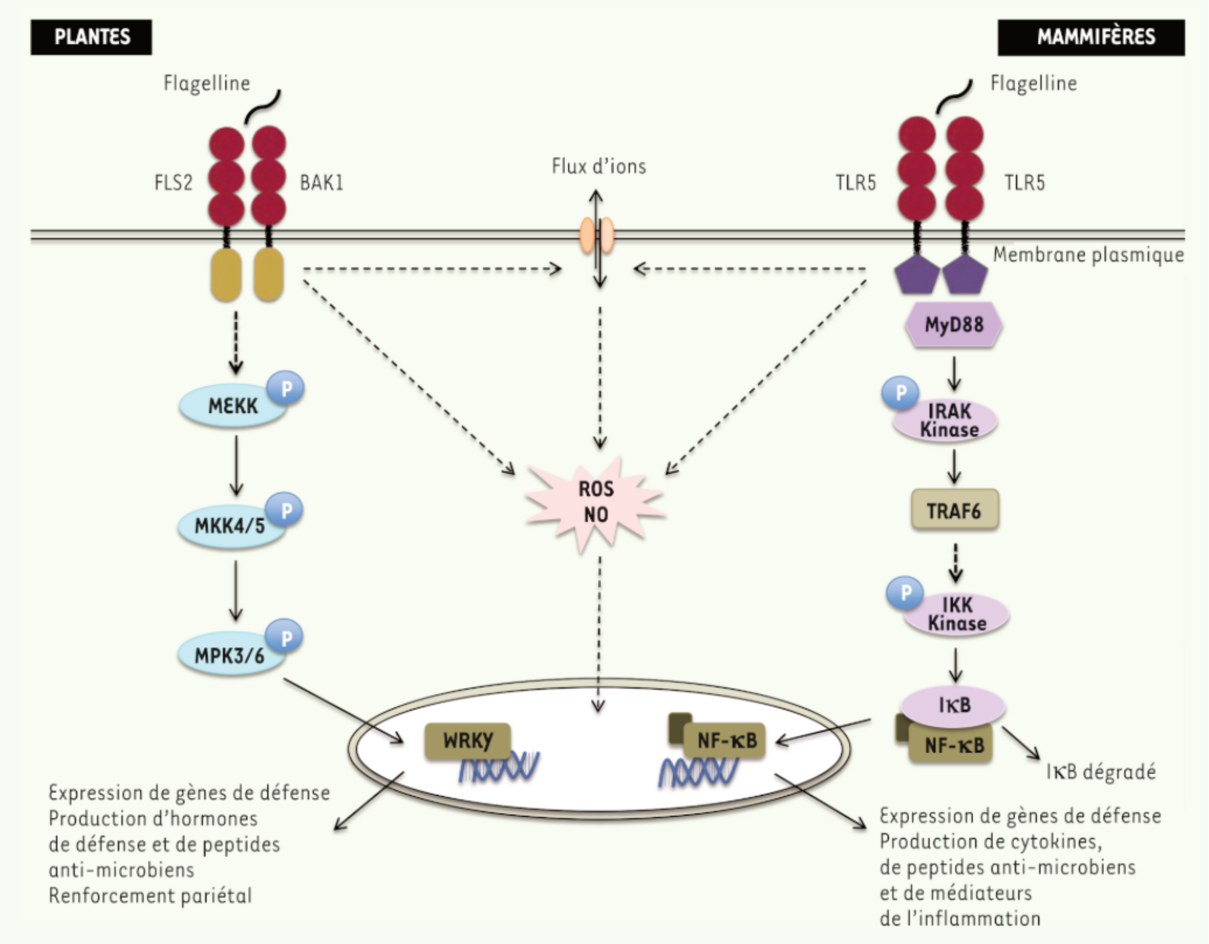


Figure 6: Principaux composants de la signalisation induite par la flagelline chez les plantes et les mammifères (Claverie et al., 2016).

La perception du PAMP par son PRR induit une cascade de signalisation conservée menant à l'activation de l'immunité innée chez les végétaux et les animaux. FLS2 : *flagellin sensitive 2*; BAK1 : *BRI1 (brassinosteroid insensitive 1)-associated kinase 1*; MEKK : MAP kinase kinase kinase ou MPK kinase kinase ou MAP3K; MKK : MAP kinase kinase ou MPK kinase ou MAP2K; MPK : *mitogen-activated protein kinase* ou MAPK; WRKY : facteurs de transcription WRKY; ROS : *reactive oxygen species*; NO : *nitric oxide*; TLR5 : *Toll-like receptor 5*; MyD88 : *myeloid differentiation primary response gene 88*; IRAK : *interleukin-1 receptor-associated kinase*; TRAF6 : *TNF (tumor necrosis factor) receptor associated factor 6*; IKK : *IκB kinase*; IκB : *inhibitor of nuclear factor kappa-B*; NF-κB : *nuclear factor-kappa B*.

de nature protéique (Kobe and Kajava, 2001). L'un des LRR-RLK les plus étudiés est le récepteur de la flagelline/flg22 dénommé FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2). FLS2 est un PRR conservé chez de nombreuses espèces végétales. Initialement identifié chez Arabidopsis (Gómez-Gómez and Boller, 2000), les orthologues d'AtFLS2 ont également été identifiés chez la tomate (Robatzek et al., 2007), *N. benthamiana* (Hann and Rathjen, 2007), le riz (Takai et al., 2008) et plus récemment chez la vigne (Trdá et al., 2014). Chez Arabidopsis, l'ectodomaine de FLS2 est composé de 28 LRR permettant de lier flg22 (Chinchilla et al., 2006). Suite à la reconnaissance de flg22, FLS2 forme un hétérodimère avec un autre LRR-RLK nommé BAK1 (*brassinosteroid insensitive 1 (BIR1)-associated receptor kinase*). Des expériences de cristallographie portant sur les ectodomaines de FLS2 et BAK1 ont permis de révéler le mécanisme de perception de flg22. Une fois lié à flg22, le domaine extracellulaire de FLS2 interagit directement avec celui de BAK1. L'extrémité C-terminale de flg22 se lie également à BAK1, permettant la stabilisation du complexe (Sun et al., 2013). BAK1 est nécessaire à l'activation de la voie de signalisation induite par la reconnaissance de flg22, bien qu'il ne soit pas nécessaire à la fixation de flg22 par FLS2 (Chinchilla et al., 2007).

Les LRR-RLK possèdent une architecture similaire aux *Toll-like receptors* (TLR). Les TLR jouent un rôle crucial dans l'immunité des mammifères et contiennent un domaine cytoplasmique tyrosine kinase de type *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR). Lors de la perception de la flagelline, la dimérisation du récepteur (FLS2/BAK1 ou TLR5/TLR5) entraîne des étapes de signalisation similaires chez les plantes et les animaux incluant des flux d'ions, une production de FAO (ou ROS pour *reactive oxygen species*) et de NO, une cascade de phosphorylation de protéines kinases ainsi que l'expression de gènes de défense (Figure 6).

2.1.2.2. Récepteurs comportant des motifs à lysine (LysM)

Les PRR de type LysM contiennent des ectodomaines composés de un à trois motifs à lysine, eux-mêmes composés d'une quarantaine d'acides aminés. Les motifs LysM sont retrouvés dans de nombreuses protéines de la plupart des organismes vivants. Les protéines à domaines LysM ont été initialement décrites chez les bactéries comme des hydrolases impliquées dans la modification de la paroi. Chez les plantes, les LysM-RLK et -RLP perçoivent les oligosaccharides contenant des N-acétylglucosamines (GlcNAc) tels que la chitine fongique, le peptidoglycane (PGN) bactérien ou encore les

lipochitooligosaccharides sécrétés par des microorganismes bénéfiques (Gust et al., 2012). La chitine est reconnue par le LysM-RLP *Chitin elicitor-binding protein* (CeBIP) chez le riz (Kaku et al., 2006) et par le LysM-RLK *Chitin elicitor receptor kinase 1* (CERK1) chez Arabidopsis (Miya et al., 2007). CERK1 perçoit également le PGN en association avec les LysM-RLP LYM1 et LYM3 chez Arabidopsis (Willmann et al., 2011). Plus récemment, il a été montré qu'AtLYK5 (*LYSM-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE 5*) participe également à la perception de la chitine chez Arabidopsis en formant un hétérodimère avec AtCERK1. AtLYK5 fixe l'oligomère de chitine mais ne possède pas de domaine kinase actif. Il s'associe donc avec AtCERK1 pour permettre la transduction de signal chez Arabidopsis (Cao et al., 2014). Une autre étude a montré qu'il existe chez les légumineuses des récepteurs capables de différencier la perception de la chitine, qui induisent des réactions immunitaires, de la perception des facteurs Nod, des lipochitooligosaccharides (LCO), qui déclenchent une endosymbiose avec une rhizobactérie (Bozsoki et al., 2017). Ainsi, *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula* possèdent des récepteurs de type LysM leur permettant de séparer la perception des PAMP de chitine *via* LjLYS6/MtLYK9 et MtLYR4 de la perception des LCO par les récepteurs LjNFR1/MtLYK3 et LjNFR5/MtNFP et qui déclenchent la symbiose (Bozsoki et al., 2017).

2.1.2.3. Récepteurs à domaines EGF-like

Chez Arabidopsis, WAK1 (*wall-associated kinase 1*) est un RLK qui possède deux domaines EGF-like dans son ectodomaine et appartient à la famille des WAK, composée de 5 membres (WAK1-5). WAK1 est impliqué dans la reconnaissance des OG, puisque son ectodomaine peut lier les OG ou la pectine *in vitro*. La localisation contigüe des gènes *WAK* sur le génome d'Arabidopsis laisse penser que les membres de cette famille sont redondants fonctionnellement (He et al., 1999). L'invalidation constitutive des deux gènes *WAK1* et *WAK2* par interférence à ARN est létale. En revanche, l'invalidation de *WAK1* ou *WAK2* ne provoque aucun changement phénotypique particulier (Wagner and Kohorn, 2001). Pour démontrer que WAK1 peut lier les OG, des récepteurs chimériques ont été créés en fusionnant l'ectodomaine de WAK1 avec le domaine cytoplasmique d'EFR (EF-Tu receptor), le récepteur percevant le peptide elf18, et inversement (Brutus et al., 2010). Les deux protéines chimériques ont été nommées WEG et EWAK, respectivement. Sachant que la perception des OG induit une production de FAO et pas

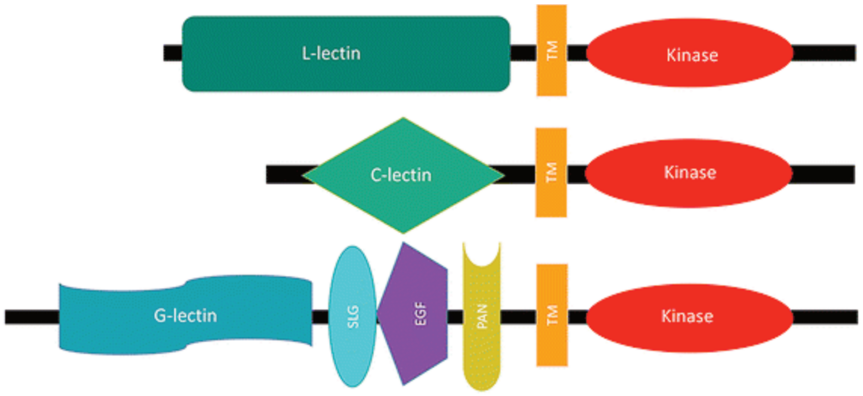


Figure 7: Représentation schématique des RLK à domaines lectines (Teixeira et al., 2018). Les lectines L, C et G sont les domaines présents dans les Lec-RLK de type L, C et G. TM : domaine transmembranaire. SLG : *S locus glycoprotein*. EGF : *epidermal growth factor*. PAN : *plasminogene, apple, nematode*.

d'éthylène (ET), mais que la perception d'elf18 induit ces deux évènements de signalisation, des plantes de tabac ont été transformées avec ces protéines chimériques. En réponse aux OG, WEG est capable d'induire une production d'ET, indiquant que l'ectodomaine de WAK1 reconnaît les OG et active le domaine kinase d'EFR. A l'inverse, en réponse à elf18, EWAK induit uniquement une production de FAO et donc une activation du domaine kinase de WAK1.

2.1.2.4. Récepteurs comportant des motifs à lectine

Les RLK à domaine lectine (Lec-RLK) interviennent dans la reconnaissance des glucides (Singh and Zimmerli, 2013). En fonction de leur(s) ectodomaine(s), les Lec-RLK sont classés en type L, C ou G (Figure 7). Les Lec-RLK de type C sont retrouvés chez un grand nombre de protéines de mammifères et interviennent dans la réponse immunitaire et dans la reconnaissance des agents pathogènes (Vaid et al., 2013). Ils sont en revanche rares chez les plantes, puisque ce groupe n'est représenté que par un seul gène chez Arabidopsis, le riz, la tomate et deux gènes chez le blé (Shumayla et al., 2016; Vaid et al., 2012; Wang et al., 2015). Le groupe des Lec-RLK de type L (*legume-like*) a des rôles bien définis dans la défense des plantes. Des recherches sur Arabidopsis, le riz, la tomate, *Nicotiana benthamiana* et le blé ont révélé 45, 72, 22, 37 et 84 membres de cette famille, respectivement (Shumayla et al., 2016; Vaid et al., 2012; Wang et al., 2015). Plusieurs Lec-RLK de type L ont été identifiés pour jouer un rôle dans la résistance des plantes aux agents pathogènes, notamment AtLecRK-I.9 contre *Pseudomonas syringae pv. tomato* et *Phytophthora infestans* (Balagué et al., 2017; Bouwmeester and Govers, 2009) ou encore AtLecRK-IX.1 et AtLecRK-IX.2 contre les oomycètes *Phytophthora brassicae*, *P. capsici et P. syringae pv. tomato* DC3000 (*Pst* ; Luo et al., 2017; Wang et al., 2015). AtLecRK-I.9 est également impliqué dans la perception de DAMP, notamment l'ATP extracellulaire (Choi et al., 2014). Enfin, 32 membres du groupe Lec-RLK de type G ont été identifiés chez Arabidopsis, 100 chez le riz et 177 chez le blé (Shumayla et al., 2016; Vaid et al., 2012). Les membres les plus connus sont les RLK à locus S (S locus glycoprotein ou SLG), qui peuvent également contenir des domaines EGF et/ou des domaines PAN (*plasminogene, apple, nematode*), jouant un rôle dans les interactions protéines-protéines et protéines-glucides (Tordai et al., 1999). Chez les *Brassicaceae*, les récepteurs à locus S interviennent dans la reconnaissance du grain de pollen dans le processus d'auto-incompatibilité afin de maintenir la variabilité génétique et la survie de

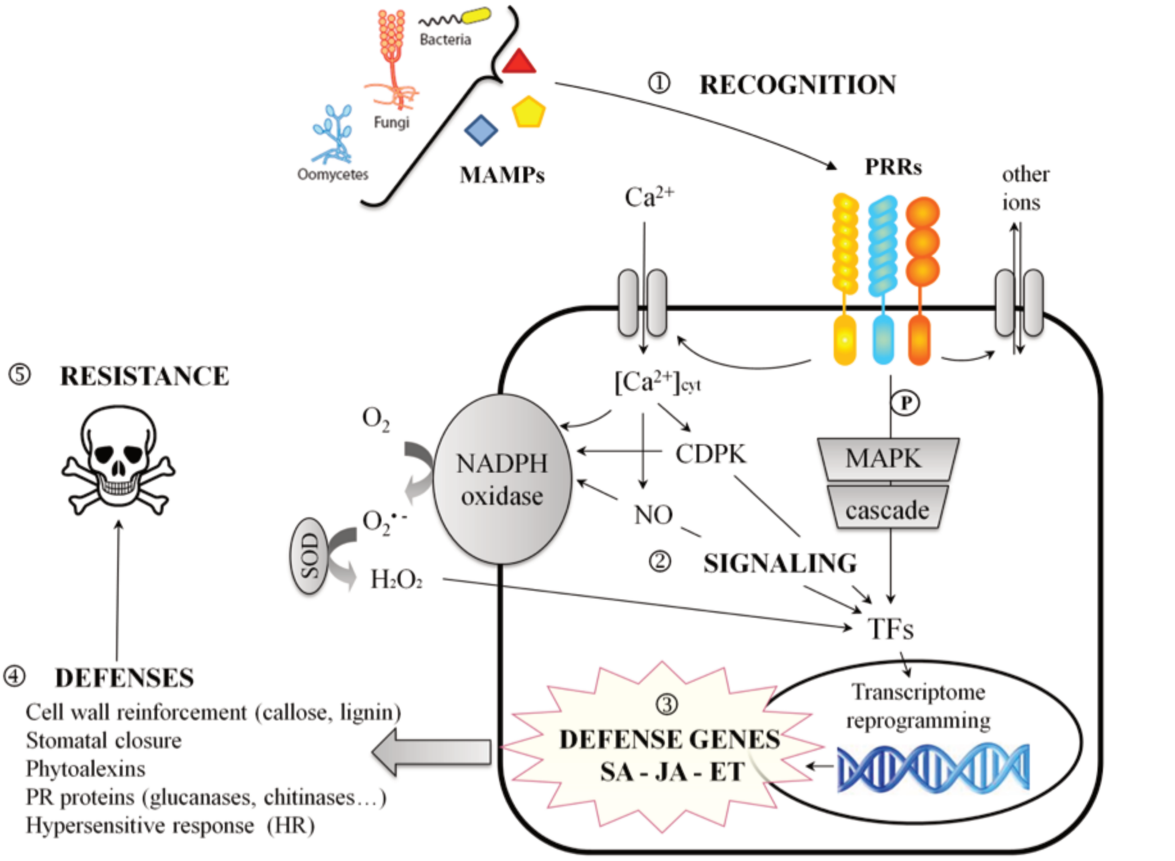


Figure 8: Représentation schématique de la cascade de signalisation induite par un PAMP (Trdà et al., 2015).

La perception du MAMP ou PAMP par son PRR (1) induit une cascade de signalisation (2) incluant des flux d'ions à travers la membrane plasmique, conduisant généralement à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} cytosolique, l'activation de protéine kinase dépendante du Ca^{2+} (CDPK) et de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) ainsi que la production de NO et d'H_2O_2. L'intégration de ces seconds messagers active des facteurs de transcription (TF) qui induisent une reprogrammation du transcriptome, conduisant à la production de phytohormones telles que l'acide salicylique (SA), le jasmonate (JA) ou l'éthylène (ET) ainsi que l'expression de gènes de défense (3) impliqués dans le renforcement pariétal, la fermeture stomatique, la production de phytoalexines et de protéines PR et parfois une réponse hypersensible (HR) au site d'infection (4). Toutes ces réponses de défense contribuent à l'induction de résistance (5).

l'espèce (Murase et al., 2004). De récents travaux ont démontré chez Arabidopsis que le LPS de différentes espèces de *Pseudomonas* et *Xanthomonas campestris* était détecté *via* le domaine lectine de type G du RLK LORE (*lipooligosaccharide-specific reduced elicitation*). De plus, les mutants *lore* sont hypersensibles à l'infection par *P. syringae* (Ranf et al., 2015).

2.2. Effector-triggered immunity (ETI)

Les effecteurs peuvent être sécrétés par les bactéries, les champignons et les oomycètes afin de perturber ou bloquer la signalisation induite par la PTI. Les effecteurs bactériens sécrétés par le système de sécrétion de type III sont les plus étudiés. Ils sont capables de cibler des PRR, des co-récepteurs ou des composants de la signalisation *via* leur activité protéase, phosphatase, E3 ubiquitine ligase ou encore kinase (Asai and Shirasu, 2015). Ces effecteurs sont des protéines codées par des gènes d'avirulence et sont reconnus par des protéines végétales codées par des gènes *R* appelées NLR puisqu'elles contiennent un domaine NB (*nucleotide binding domain*) et un domaine LRR. L'ETI rétablit et amplifie la signalisation et les réponses de défense normalement induite par la PTI. L'ETI est néanmoins plus rapide et d'une intensité plus forte, et est souvent associée à la RH permettant ainsi de limiter l'expansion de l'agent pathogène (Cui et al., 2015).

2.3. Transduction du signal

La perception de l'agent pathogène par l'intermédiaire d'éliciteurs conduit à l'activation d'une cascade de signalisation qui débute par des évènements précoces. Parmi eux, on peut citer la modification de la perméabilité de la membrane plasmique associée à des flux d'ions, une production de NO et de FAO telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi qu'une cascade de phosphorylation de protéines kinases dont les MAPK et les CDPK (*Ca^{2+}-dependent protein kinases*). L'ensemble de ces évènements conduit à l'activation de facteurs de transcription responsables d'une reprogrammation du génome permettant la mise en place de réponses de défense (Figure 8, Trdá et al., 2015). Ces mécanismes ont été décrits dans différents modèles éliciteurs/plantes tels que la flagelline et Arabidopsis (Gómez-Gómez

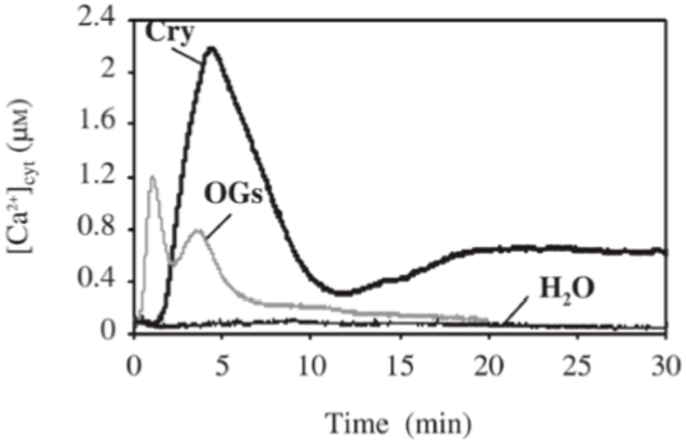


Figure 9: Exemples de signatures calciques en réponse à la cryptogéine et aux OG (Lecourieux et al., 2002).

Dans des cellules de *Nicotiana plumbaginifolia* transgéniques exprimant l'aequorine, la cryptogéine induit un grand pic calcique suivi d'un plateau tandis que les OG induisent une réponse transitoire et biphasique.

et al., 1999), la cryptogéine et le tabac (Garcia-Brugger et al., 2006), les OG, l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea* (BcPG1) ou la laminarine et la vigne (Aziz et al., 2003, 2004; Poinssot et al., 2003).

2.3.1. Flux d'ions

En réponse aux PAMP/DAMP, les flux d'ions au travers de la membrane plasmique sont les premiers évènements de signalisation observables. Les flux d'ions détectés incluent des influx de Ca^{2+} et H^+, et des efflux de K^+ et d'anions (notamment Cl^- et NO_3^-). Le Ca^{2+} est considéré comme l'un des seconds messagers majeurs des plantes puisqu'il peut activer de nombreux évènements dans la cellule en réponse à un agent pathogène (Dodd et al., 2010; Lecourieux et al., 2006). En effet, l'utilisation de La^{3+}, un ion bloquant les canaux perméables au Ca^{2+}, ou d'EGTA (acide éthylène glycol tétra-acétique), un agent chélateur du Ca^{2+}, empêche l'activation de la voie de signalisation et la mort cellulaire induite par la cryptogéine chez le tabac (Lecourieux et al., 2002). Des mesures de l'incorporation de $^{45}Ca^{2+}$ dans les cellules ont permis de montrer un influx de Ca^{2+} suite à différents éliciteurs comme BcPG1 chez la vigne (Poinssot et al., 2003; Vandelle et al., 2006) ou les OG et la cryptogéine chez le tabac (Bourque et al., 1998; Mathieu et al., 1991). De nos jours, la plupart des études sur la signalisation du Ca^{2+} sont réalisées sur suspensions cellulaires ou plantes transgéniques exprimant l'aequorine, une protéine de méduse émettant une luminescence proportionnelle à la concentration en calcium libre ($[Ca^{2+}]$), dans différents compartiments. Cette méthode a mis en évidence le concept de signature calcique, c'est à dire des variations de la $[Ca^{2+}]$ propres à chaque éliciteur, définies par des caractéristiques telles que l'amplitude, la durée, la fréquence ou la localisation subcellulaire (Figure 9; Lecourieux et al., 2002). En réponse aux OG, la variation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est modulée par les *Glutamate receptor-like* (GLR). En effet, en présence d'inhibiteurs des GLR, la variation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est réduite de 60 % après un traitement par les OG (Manzoor et al., 2013).

L'implication des flux d'anions en réponse aux éliciteurs a été démontrée essentiellement par l'utilisation d'approches pharmacologiques et biochimiques. Les efflux d'anions Cl^- et NO_3^- sont également des évènements précoces de signalisation puisqu'ils sont détectables dès les cinq premières minutes de traitement par la cryptogéine (Pugin et al., 1997; Wendehenne et al., 2002). Dans le modèle tabac-cryptogéine, les efflux de NO_3^- sont impliqués dans la dépolarisation de la membrane qui

entraîne l'activation de canaux perméables au Ca^{2+} voltage dépendants (Lamotte et al., 2004). Un lien entre la dépolarisation de la membrane et le glutathion a été démontré chez Arabidopsis (Dubreuil-Maurizi et al., 2011). Le mutant *pad2-1* est déficient en GLUTAMATE-CYSTEINE LIGASE (GCL), la première enzyme de biosynthèse du glutathion. En réponse aux OG, le mutant *pad2-1* présente une dépolarisation de la membrane plasmique plus faible que le sauvage (Dubreuil-Maurizi et al., 2011). Chez Arabidopsis, les canaux chlorure AtCLCd régule négativement la PTI (Guo et al., 2014). Les canaux anioniques de type R (rapides) et S (lents) jouent des rôles antagonistes dans l'immunité d'Arabidopsis. En effet, l'inhibition des canaux de type R induit la PTI et l'ETI, tandis que l'inhibition des canaux de type S réprime celles-ci (Guo et al., 2014).

2.3.2. Production de formes actives de l'oxygène et de monoxyde d'azote

Les formes actives de l'oxygène jouent un rôle important, notamment dans la résistance des plantes aux stress biotiques. Elles contribuent à limiter directement le développement des agents pathogènes, à renforcer la paroi et participent à la cascade de signalisation conduisant à la résistance (Lamb and Dixon, 1997). Sur suspensions cellulaires, la production d'H_2O_2 atteint généralement son maximum entre 10 et 30 min après la perception de l'éliciteur, suivant sa nature (Aziz et al., 2003; Poinssot et al., 2003; Simon-Plas et al., 1997). La production rapide et transitoire de FAO est également appelée « burst oxydatif ». Plusieurs études ont identifié les NADPH oxydases comme étant les principales enzymes impliquées dans la production des FAO détectées lors de la mise en place des réactions de défense des plantes (Torres and Dangl, 2005). Les NADPH oxydases des plantes sont composées de six domaines transmembranaires conservés, de deux motifs EF-hands coté N-terminal et de deux sites de fixation respectifs au NADPH et FAD (Sagi & Fluhr, 2006). Les NADPH oxydases catalysent la réduction de l'O_2 en $O_2^{\bullet-}$ en utilisant comme donneur d'électron le NADPH. $O_2^{\bullet-}$ est ensuite dismuté en H_2O_2 par une activité superoxyde dismutase (SOD). Chez Arabidopsis, les NADPH oxydases *respiratory burst oxidase homolog D* et *F* (RBOHD et RBOHF) sont essentielles pour la production de FAO en réponses à divers éliciteurs (flg22, elf18, chitine) et pour la résistance lors d'interactions incompatibles avec *Hyaloperonospora arabidopsidis*, la souche avirulente de *P. syringae pv*. tomato (*AvrRpm1*) ou encore le champignon nécrotrophe *P. cucumerina* (Morales et al., 2016; Torres et al., 2002). Le burst oxydatif est étroitement lié aux autres évènements de

signalisation. Des approches pharmacologiques complémentaires ont permis de montrer que la production de FAO était dépendante du Ca^{2+}, du NO et de la phosphorylation de protéines chez la vigne en réponse à BcPG1 et qu'elle modulait la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ chez le tabac en réponse à la cryptogéine (Lecourieux et al., 2002; Vandelle et al., 2006).

Le NO est un gaz et un radical libre impliqué dans divers processus cellulaires chez les animaux comme la vasodilation, la neurotransmission et la réponse immunitaire. Chez les plantes, le NO intervient également dans de nombreux processus physiologiques dont la germination, la floraison, la croissance racinaire ou la fermeture des stomates (Besson-Bard et al., 2008). Le NO agit comme un régulateur des fonctions cellulaires de diverses protéines via trois types de modifications post-traductionnelles : la S-nitrosylation, qui correspond à la liaison covalente réversible d'une molécule de NO à un résidu cystéine ; la métal nitrosylation, correspondant à une liaison d'une molécule de NO à un métal de transition présent dans une métalloprotéine et la tyrosine-nitration qui correspond à l'ajout d'un groupement NO_2 à un résidu tyrosine. Plusieurs études rapportent une production de NO en réponse à divers éliciteurs dont la cryptogéine et les OG chez le tabac (Lamotte et al., 2004; Rasul et al., 2012) ou BcPG1 chez la vigne (Vandelle et al., 2006). Il participe également à un dialogue moléculaire avec le Ca^{2+} et les FAO (Jeandroz et al., 2013; Trapet et al., 2015; Vandelle et al., 2006). Une fois produit, le NO contribue à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en mobilisant le Ca^{2+} provenant des pools internes chez le tabac, probablement *via* des évènements de signalisation (Lamotte et al., 2006). De plus, en réponse à la cryptogéine, la production de NO dans des cellules de tabac est dépendante en partie de la production d'H_2O_2 par RBOHD (Kulik et al., 2015). En réponse aux OG, une approche pharmacologique a montré que la production de FAO *via* RBOHD dépendait du NO chez Arabidopsis (Rasul et al., 2012).

2.3.3. Activation de protéines kinases

En réponse aux éliciteurs, la phosphorylation des protéines est impliquée dans la cascade de signalisation menant aux réponses de défense de la plante. Parmi les protéines kinases impliquées, les trois types de *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) jouent un rôle essentiel : les MAPK kinase kinases (MAPKKK ou MAP3K), les MAPK kinases (MAPKK ou MAP2K) et les MAPK (Meng and Zhang, 2013). En réponse à un stress biotique, les MAPKKK activent les MAPKK par phosphorylation, qui vont elles-

mêmes phosphoryler les MAPK qui, une fois actives, permettent la transduction du signal. Cette cascade de phosphorylation aboutit à l'activation de facteurs de transcription permettant l'expression de gènes codant des protéines de défense comme les protéines PR ou des enzymes impliquées dans la production de métabolites secondaires (Meng and Zhang, 2013). Chez Arabidopsis, il existe 60 MAPKKK, 10 MAPKK et 20 MAPK (MPK) et un répertoire similaire de gènes codant des composants de la cascade des MAPK a également été identifié chez le riz et chez le peuplier. Deux cascades de signalisation ont été décrites chez Arabidopsis en réponse à flg22. En aval de FLS2, la première cascade serait composée de MEKK1 (une MAPKKK), MKK4/MKK5 (deux MAPKK redondantes) et MPK3/MPK6 (deux MAPK partiellement redondantes; Asai et al., 2002). Des travaux indépendants ont confirmé que MKK4/MKK5 était bien en amont de MPK3/MPK6 (Ren et al., 2002). Cependant, par une approche de génétique fonctionnelle, une étude a révélé que l'activation de MPK3 et MPK6 était normale chez le mutant *mekk1*, suggérant que MEKK1 n'est pas situé en amont de MKK4/MKK5 ou qu'il existe un ou des orthologues redondants de MEKK1 (Ichimura et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). L'activation des MAPK est détectée dès les premières minutes après la perception de flg22, atteignant une phosphorylation maximale à 10-15 min avant un retour rapide au niveau basal (Droillard et al., 2004). MPK3 et MPK6 sont également impliquées dans la régulation de la synthèse des phytoalexines en réponse à *B. cinerea* (Asai et al., 2002; Ren et al., 2008). Suite à la perception de flg22 et des OG, les réponses immunitaires induites contre *B. cinerea* sont dépendantes des MAPK, plus particulièrement de MPK6 (Galletti et al., 2011). La phosphorylation des orthologues des deux MAPK a également été observée chez la vigne en réponse aux OG, à BcPG1, à la laminarine et à flg22 (Aziz et al., 2003; Poinssot et al., 2003; Trdá et al., 2014; Vandelle et al., 2006).

Les *calcium-dependent protein kinase* (CDPK) sont des protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} qui jouent également un rôle dans la signalisation associée à la PTI et à l'ETI. Le génome d'Arabidopsis code 34 CDPK (CPK) et ces familles ont aussi été identifiées chez d'autres espèces végétales, notamment le riz (31 membres) le maïs (35 membres) ou encore le peuplier (20 membres ; Asano et al., 2005; Harmon et al., 2000; Ma et al., 2013; Zuo et al., 2013). Certaines CDPK sont activées de manière transitoire suite à la perception de flg22, telles que CDPK4, CDPK5, CDPK6 et CDPK11. Les CDPK sont un point de convergence de la signalisation induite par les PAMP chez Arabidopsis.

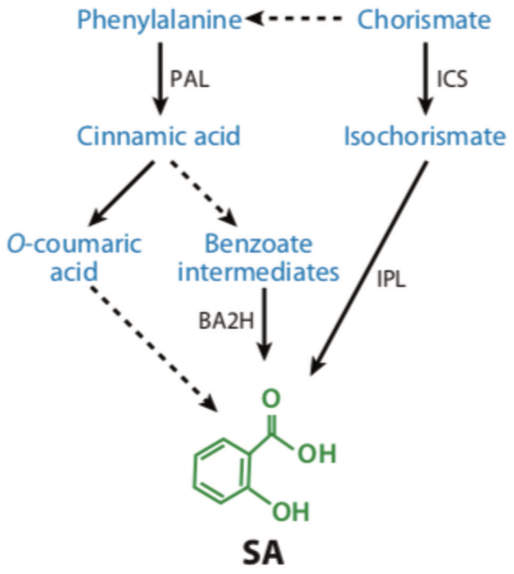


Figure 10: Voie de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) chez les plantes (Adapté de Vlot et al., 2009).
Voie de gauche : Synthèse du SA à partir de la phénylalanine, impliquant la phénylalanine ammonium lyase (PAL) et l'acide benzoïque-2-hydroxylase (BA2H).
Voie de droite : Synthèse du SA à partir du chorismate, impliquant une isochorismate synthase (ICS) et l'isochorismate pyruvate lyase (IPL).

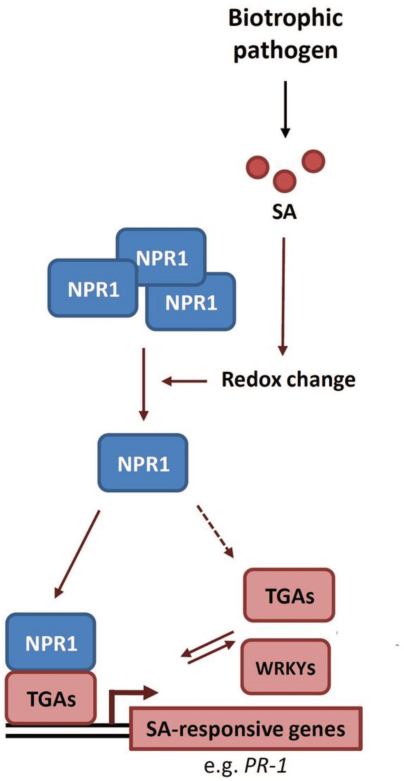


Figure 11: Modèle de la signalisation induite par l'acide salicylique (SA; adapté de Van der Does et al., 2013).
L'infection par un agent pathogène biotrophe entraîne l'accumulation de SA et la monomérisation de NPR1 par le biais de modifications redox médiées par le SA dans la cellule. Le monomère NPR1 est ensuite transféré dans le noyau où il interagit avec les facteurs de transcription TGA, conduisant finalement à l'activation de gènes dépendants du SA. L'expression d'un grand nombre de gènes WRKY est induite par le SA, dont certains peuvent réguler l'expression des gènes dépendants du SA.

En réponse à flg22, les mutants *cpk4, -5, -6 et -11* (dont l'activité des CDPK est altérée) présentent un burst oxydatif affaibli et une plus grande sensibilité aux agents pathogènes (Boudsocq et al., 2010). Plus récemment, la CDPK28 a été identifiée comme un régulateur négatif de BIK1 (BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1), un récepteur kinase cytoplasmique impliqué dans la transduction du signal médiée par FLS2, EF-Tu et CERK1 (Monaghan et al., 2014, 2015). La CDPK28 participe également à l'induction de l'influx calcique en réponse aux PAMP dont flg22, elf18 et la chitine (Monaghan et al., 2014, 2015).

2.3.4. Production de phytohormones de défense

Les phytohormones sont des molécules essentielles à la régulation des processus biologiques tels que la croissance, la reproduction, le développement, la survie mais aussi les mécanismes de défense des plantes. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle indispensable de l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) dans les réponses de défense aux stress biotiques (Bari and Jones, 2009; Pieterse et al., 2012). D'autres hormones telles que l'acide abscissique (ABA), l'auxine, les gibbérellines et les cytokinines contribuent elles aussi à la régulation des voies de défenses, bien que leurs rôles soient moins décrits dans la littérature.

Le SA est généralement décrit pour être impliqué dans les réponses de défense contre les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes ainsi que dans l'induction de la résistance systémique acquise (RSA ; Glazebrook, 2005). Le SA est synthétisé à partir du chorismate *via* deux voies enzymatiques distinctes (Figure 10). La première, qui a lieu dans le cytoplasme, est la voie des phénylpropanoïdes et fait intervenir la phénylalanine ammonium lyase (PAL). La seconde, la voie de l'isochorismate, a lieu dans les chloroplastes et implique l'isochorismate synthase (ICS1/SID2 ; Garcion and Métraux, 2007). Le rôle du SA dans les défenses des plantes a notamment été mis en évidence grâce à l'utilisation de plantes transformées exprimant constitutivement le gène bactérien *NahG*, codant une salicylate hydroxylase qui convertit le SA en catéchol inactif. Les plantes d'Arabidopsis et de tabac transformées sont incapables d'accumuler le SA et sont plus sensibles à de nombreux agents pathogènes, dont les champignons, les bactéries et les virus (Delaney et al., 1994). La caractérisation de mutants affectés dans la biosynthèse du SA a permis d'identifier différentes protéines impliquées dans sa

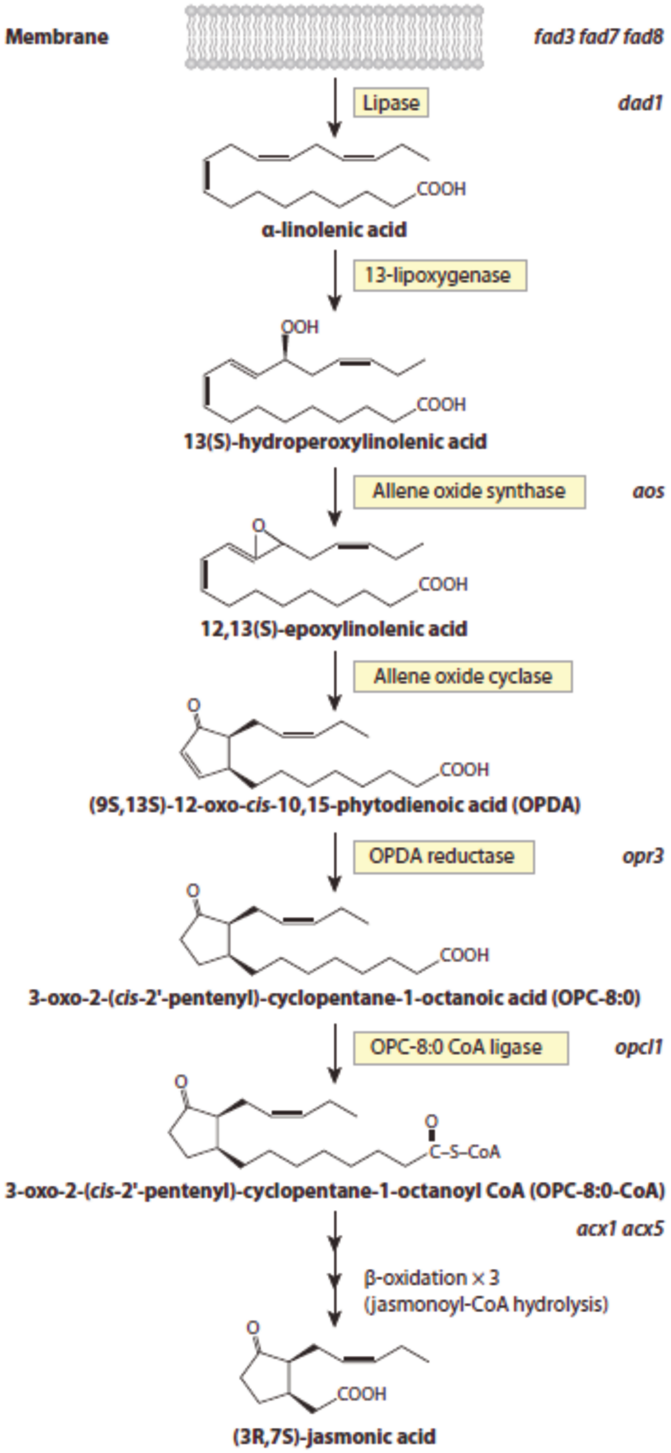


Figure 12: Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (JA) à partir de l'acide α- linolénique (d'après Browse, 2009).

Le nom des enzymes catalysant les différentes modifications chimiques est indiqué dans les rectangles jaunes.

régulation. Ainsi, les mutants d'Arabidopsis ne pouvant pas accumuler le SA tels que *eds1* (*enhanced disease susceptibility 1*), *sid2* (*salicylic acid induction-deficient 2 ; eds16*) et *pad4* (*phytoalexin deficient 4*) présentent une plus grande sensibilité à différents agents pathogènes dont *Pseudomonas syringae* (Rogers and Ausubel, 1997) et l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Zhou et al., 1998). Les protéines EDS1 et PAD4, qui possèdent des similitudes de séquences avec des lipases, sont impliquées dans l'activation de la biosynthèse du SA lors de la PTI. La voie de signalisation en aval du SA est contrôlée principalement par la protéine NPR1 (*non-expressor of pathogenesis related genes 1*), qui après activation par le SA, agit comme un coactivateur transcriptionnel (Figure 11 ; Dong, 2004; Moore et al., 2011). A l'état basal, les protéines NPR1 sont séquestrées dans le cytoplasme sous forme d'oligomères, reliées entre elles par des ponts disulfures. L'infection va modifier l'état redox de la cellule (accumulation du SA, production de FAO) conduisant à la réduction des ponts disulfures par des thioredoxines, libérant des monomères actifs de NPR1 qui sont ensuite déplacés dans le noyau (Després et al., 2003). NPR1 interagit avec des facteurs de transcription de la famille des TGA (*TGACG motif-binding proteins*) qui, en association avec des facteurs de transcription WRKY, activent les gènes de défense répondant au SA, comme certains gènes *PR* qui codent généralement des protéines à activité antimicrobienne (van Loon et al., 2006). Une fois la voie SA activée au site d'infection, une réponse similaire est souvent induite dans les parties distales de la plante pour protéger les tissus sains d'une attaque ultérieure : c'est la RSA (§2.4.5).

La biosynthèse du JA (Figure 12) a lieu dans deux compartiments cellulaires différents. Dans le chloroplaste, l'acide α-linolénique est libéré des membranes et oxydé par des 13-lipoxygénases (13-LOX), puis par l'action séquentielle de l'allène oxyde synthase (AOS) et de l'allène oxyde cyclase (AOC), permettant la synthèse de l'acide 12-oxophytodiénoïque (OPDA). L'OPDA est ensuite transporté vers le peroxysome où son cycle penténone est réduit par une cis-OPDA réductase 3 (OPR3). La chaîne latérale est ensuite raccourcie lors de la ß-oxydation pour générer l'acide-(+)-7-iso-jasmonique (Dave and Graham, 2012). Une thioestérase catalyse la dernière étape de la formation du JA (Li et al., 2005). La phytohormone active n'est pas le JA lui-même mais son conjugué isoleucine (JA-Ile; Staswick and Tiryaki, 2004). Cette conjugaison est catalysée par JAR1 (JASMONATE RESISTANT 1) en utilisant l'acide-(+)-7-iso-jasmonique comme substrat pour former le JA-Ile (Figure 13). La protéine F-box COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1)

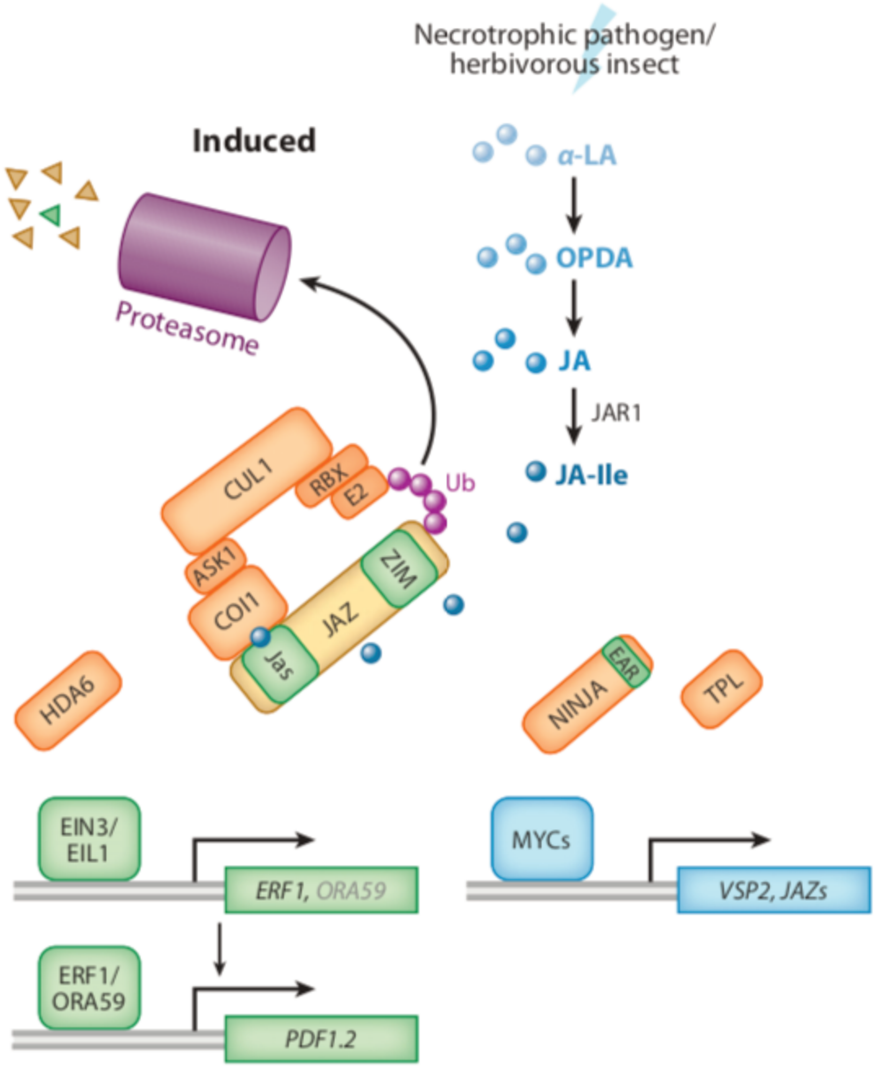


Figure 13: Modèle de la signalisation induite par l'acide jasmonique (JA; Pieterse et al., 2012).

L'attaque par un agent pathogène ou un insecte, induit une biosynthèse rapide de JA converti en JA-Ile actif par JAR1 (JASMONATE RESISTANT 1). COI1 est un récepteur au JA-Ile qui est présent dans le complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{COI1} (SKP1-Cullin-F-box). En réponse au JA-Ile, les protéines JAZ (JASMONATE ZIM-DOMAIN) vont être ciblées par SCF^{COI1} pour être dégradées, le facteur de transcription MYC2 est libéré, activant l'expression des gènes dépendants du JA (dont *VSP2* et *JAZ*) conduisant à la régulation de divers processus physiologiques. Dans la branche ERF, les protéines JAZ interagissent avec des facteurs de transcription dont EIN3 (*ethylene insensitive 3*) pour recruter l'histone désacétylase HDA6, ce qui a pour effet d'activer la transcription du gène *ERF1* (*ethylene response factor 1*). ERF1 va pouvoir induire à son tour la transcription de gènes tels que PDF1.2 (*PLANT DEFENSIN 1.2)*.

.

est un régulateur essentiel de la voie de signalisation du JA. Les protéines F-box sont des composants de certains complexes E3 ubiquitine ligases au sein desquels elles sont responsables de la reconnaissance des substrats à ubiquitinyler. COI1 est un récepteur au JA-Ile qui est présent dans le complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{COI1} (SKP1-Cullin-F-box). La découverte des protéines JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) en tant que régulateurs négatifs de l'expression génique induite par le JA et en tant que véritables cibles du complexe SCF^{COI1} a constitué une avancée majeure dans l'analyse de la signalisation du JA (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). En l'absence de JA-Ile, les protéines JAZ bloquent l'activité du facteur de transcription MYC2 *via* la protéine adaptatrice NINJA (NOVEL INTERACTOR OF JAZ) et recrutent un corépresseur transcriptionnel de la famille TOPLESS (TPL) pour empêcher l'activation des gènes de réponse au JA par les protéines MYC (Pauwels et al., 2010). En réponse au JA-Ile, les protéines JAZ vont être ciblées par SCF^{COI1} pour être dégradées, MYC2 est libéré, activant l'expression des gènes dépendants du JA (dont *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2* (*VSP2)* et *JAZ*) et conduisant à la régulation de divers processus physiologiques (Wasternack and Hause, 2013). Dans une seconde voie, la branche ERF (Ethylene Response Factor), les protéines JAZ interagissent avec des facteurs de transcription dont EIN3 (*ethylene insensitive 3*) pour recruter l'histone désacétylase HDA6, ce qui a pour effet d'activer la transcription du gène *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1* ; Zhu et al., 2011). ERF1 va à son tour induire la transcription du gène PDF1.2 (*PLANT DEFENSIN 1.2* ; Figure 13 ; Pieterse et al., 2012). Les branches MYC et ERF sont antagonistes, la branche MYC est généralement associée à la défense contre les insectes herbivores alors que la branche ERF est associée à la défense contre les agents pathogènes nécrotrophes (Lorenzo et al., 2003, 2004).

L'utilisation de mutants affectés dans la voie de biosynthèse et la perception du JA a permis de confirmer le rôle de cette hormone dans les mécanismes de défense des plantes. Ces mutants de la voie du JA présentent une plus grande sensibilité à différents agents pathogènes et insectes. En effet, le mutant d'Arabidopsis *jar1* est plus sensible à *P. syringae* pv. *tomato* et *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo and Molina, 2004; Pieterse et al., 1998). De la même manière, le mutant *coi1* est plus sensible aux champignons nécrotrophes *Alternaria brassicicola* et *B. cinerea* (Thomma et al., 1998) et à la bactérie *Erwinia carotovora* (Norman-Setterblad et al., 2000).

L'éthylène (ET) est un gaz jouant le rôle d'hormone impliqué dans de nombreux processus physiologiques liés à la croissance et au développement tels que la maturation des fruits, la germination des graines, la sénescence ou l'initiation des poils absorbants (Bleecker and Kende, 2000). Il est synthétisé à partir de la méthionine, transformée en S-adénosylméthionine (SAM) par une SAM synthase, puis en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) par une ACC synthase (ACS), et enfin en éthylène par une ACC oxydase (Wang et al., 2002). L'ET est perçu par des récepteurs membranaires, comme ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1) chez Arabidopsis, qui ont été caractérisés génétiquement comme des régulateurs négatifs de la signalisation de l'ET (Qu et al., 2007). En absence d'ET, les récepteurs activent de manière constitutive CTR1, une Raf-like sérine/thréonine (Ser/Thr) kinase, qui réprime l'activation des réponses à l'ET *via* la phosphorylation de la protéine membranaire EIN2 dans le réticulum endoplasmique (RE). La liaison de l'ET à ETR1 inactive ce récepteur et par conséquent la protéine kinase CTR1. L'inhibition de la phosphorylation d'EIN2 par CTR1 entraîne le clivage de l'extrémité C-terminale d'EIN2, permettant sa translocation au noyau. EIN2 jouerait un rôle de stabilisateur du facteur de transcription EIN3 en empêchant sa dégradation (Merchante et al., 2013).

En se basant sur la littérature essentiellement connue chez Arabidopsis, il semblerait que chacune des voies de signalisation associées à chaque phytohormone puisse contrôler les défenses contre un type d'agresseurs. Ainsi, la voie du SA serait impliquée contre les agents pathogènes biotrophes, les voies du JA (branche ERF) et de l'ET contre les agents pathogènes nécrotrophes et la branche MYC du JA contre les insectes herbivores (Pieterse et al., 2012). Cependant, il existe un dialogue moléculaire entre ces trois voies qui ne sont donc pas si indépendantes les unes des autres. EIN3 constitue un point de liaison entre les voies de signalisation du JA et de l'ET. En l'absence de JAZ, EIN3 active l'expression du gène codant le facteur de transcription ERF1 qui va induire l'expression de gènes de réponse au JA/ET et ainsi réprimer la branche MYC (Lorenzo et al., 2003, 2004). L'ET agit de façon synergique avec la voie ERF mais de manière antagoniste à la voie MYC. La modulation de la voie du JA par l'ET favorise donc la réponse aux agents pathogènes nécrotrophes (Lorenzo et al., 2004). Le gène *PDF1.2* est d'ailleurs un gène marqueur de la branche ERF de la voie du JA et de la voie de l'ET.

L'ABA est une hormone impliquée dans la tolérance aux stress hydriques et salins mais également dans les processus de développement comme la maturation des graines,

la dormance et le retard de germination (Rai et al., 2011). L'ABA joue également un rôle dans la synthèse de protéines de stockage nécessaires à la germination des graines et dans la fermeture des stomates en réponse à un stress biotique ou hydrique (Lim et al., 2015). L'ABA est capable de réprimer la voie du SA et de l'ET, et de favoriser la branche MYC de la voie du JA (Pieterse et al., 2012). Inversement, WRKY70 régule positivement les défenses induites par le SA tout en réprimant les réponses de la voie du JA (Li et al., 2004). Cependant, il a été montré récemment chez la vigne qu'après les premières heures d'infection par *P. viticola*, un agent pathogène biotrophe, les voies du JA et du SA semblent être activées en même temps (Guerreiro et al., 2016). Un résultat similaire a été observé chez la pomme de terre en réponse à la pourriture molle causée par les bactéries *Dickeya solani* (Burra et al., 2015). En réalité, les plantes sont très souvent attaquées par une combinaison ou une série de différents agents pathogènes. La complexité du dialogue moléculaire entre les différentes phytohormones permettrait d'optimiser les réponses en fonction du type de microorganismes ou de l'ordre des attaques (Pieterse et al., 2012). Par ailleurs, beaucoup d'informations ont été obtenues grâce à l'utilisation de mutants d'Arabidopsis dans le fond génétique Col-0 mais il existe des variations de signalisation dans d'autres écotypes ou d'autres espèces végétales comme c'est le cas entre le riz et Arabidopsis (De Vleesschauwer et al., 2014).

2.4. Réponses de défense des plantes

Les voies de signalisation induites par les plantes suite à la perception d'agents pathogènes ou d'éliciteurs conduisent à l'activation de réponses de défense (Figure 8). Celles-ci sont induites suite à une reprogrammation du génome et aboutissent généralement à l'accumulation de protéines de défense (dont les protéines PR et les protéines de renforcement pariétal), à la biosynthèse de composés antimicrobiens (phytoalexines notamment) et au développement d'une résistance locale qui peut dans certains cas devenir systémique (Choudhary et al., 2007; Yu et al., 2017).

2.4.1. Protéines PR

Les protéines PR ont été découvertes pour la première fois lors de l'infection du tabac par le virus de la mosaïque du tabac (van Loon and van Kammen, 1970). Les

Famille	Membre type	Poids moléculaire (kDa)	Fonctions	Symbole du gène	Références
PR-1	PR-1a de tabac	15	*Sterol-binding*	*Ypr1*	Antoniw et al., 1980; Breen et al., 2017; Gamir et al., 2017
PR-2	PR-2 de tabac	30	ß-1,3-glucanase	*Ypr2, [Gns2('Glb')]*	Antoniw et al., 1980
PR-3	P, Q de tabac	25-30	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	*Ypr3, Chia*	Van Loon, 1982
PR-4	R' de tabac	15-20	Chitinase type I, II	*Ypr4, Chid*	Van Loon, 1982
PR-5	S de tabac	25	*Thaumatin-like*	*Ypr5*	Van Loon, 1982
PR-6	Inhibiteur I de tomate	8	Inhibiteur de protéases	*Ypr6, Pis ('Pin')*	Green and Ryan, 1972
PR-7	P_{69} de tomate	75	Endoprotéase	*Ypr7*	Vera and Conejero, 1988
PR-8	Chitinase de concombre	28	Chitinase type III	*Ypr8, Chib*	Métraux et al., 1988
PR-9	Peroxydase de tabac « formant la lignine »	35	Peroxydase	*Ypr9, Prx*	Lagrimini et al., 1987
PR-10	PR1' de persil	17	*Ribonuclease-like'*	*Ypr10*	Somssich et al., 1986
PR-11	Chitinase de 'class V' de tabac	40	Chitinase type I	*Ypr11, Chic*	Melchers et al., 1994
PR-12	Rs-AFP3 de radis	5	Défensine	*Ypr12*	Terras et al., 1992
PR-13	THI2.1 d'Arabidopsis	5	Thionine	*Ypr13, Thi*	Epple et al., 1995
PR-14	LTP4 d'orge	9	Protéine de transfert de lipides	*Ypr14, Ltp*	García-Olmedo et al., 1995
PR-15	OxOa (germine) d'orge	20	Oxalate oxydase	*Ypr15*	Zhang et al., 1995
PR-16	OxOLP d'orge	20	*Oxalate oxydase-like'*	*Ypr16*	Wei et al., 1998
PR-17	PRp27 de tabac	27	Inconnue	*Ypr17*	Okushima et al., 2000

Tableau 3: Famille de protéines PR (adapté de van Loon et al., 2006).

protéines PR sont produites en réponse à l'infection par des microorganismes et impliquées dans les défenses actives chez de nombreuses espèces végétales (van Loon et al., 2006). Les protéines PR sont réparties en 17 familles et classées selon leurs activité biochimiques, biologiques et/ou leurs similarités de séquences (Tableau 3 ; van Loon et al., 2006). Bien que certaines PR n'aient pas de fonctions encore bien définies, un grand nombre de ces protéines possèdent une activité antifongique ou antimicrobienne. On retrouve les ß-1,3-glucanases (PR2) et les chitinases (PR3, PR4, PR8 et PR11) qui vont avoir une action directe sur la paroi du microorganisme en dégradant ses composants majeurs. Les protéines PR6 sont des inhibiteurs de protéases qui agissent sur les nématodes et les insectes herbivores. PR7, de par son activité endoprotéase, contribue à la dégradation de différentes enzymes sécrétées par les agents pathogènes. Les protéines PR9 participent au renforcement pariétal en catalysant la lignification *via* leur activité peroxydase. Les protéines PR10 sont des homologues de ribonucléases qui sont impliquées dans la lutte contre les virus. Les protéines PR12 et PR13 sont respectivement des défensines et des thionines, possédant des activités antibactériennes et antifongiques, tout comme les protéines PR14 impliquées dans le transfert de lipides. Enfin, les protéines PR15 et PR16 (présentes uniquement chez les monocotylédones) possèdent une activité SOD leur permettant de produire de l'H_2O_2 afin de participer directement ou indirectement aux réponses de défense. L'expression de plusieurs gènes codant des protéines PR est régulée par le JA, le SA et/ou l'ET et certains de ces gènes sont d'ailleurs utilisés comme des marqueurs de l'activation des voies de signalisation correspondantes. Les gènes *PR1*, *PR2* et *PR5* sont induits par le SA et le gène *PR1* est utilisé comme un marqueur de la RSA (van Loon et al., 2006; Van Loon and Van Strien, 1999). Les gènes *CHIB* et *PDF1.2*, codant respectivement pour une endochitinase B et une défensine appartenant aux familles des PR3 et PR12, sont induits par le JA et l'ET et sont donc utilisés comme marqueurs de ces voies.

2.4.2. Synthèse de composés antimicrobiens

Les phytoalexines sont des composés de faible poids moléculaire à activité antimicrobienne synthétisés et accumulés par les plantes en réponse à des stress biotiques et abiotiques.

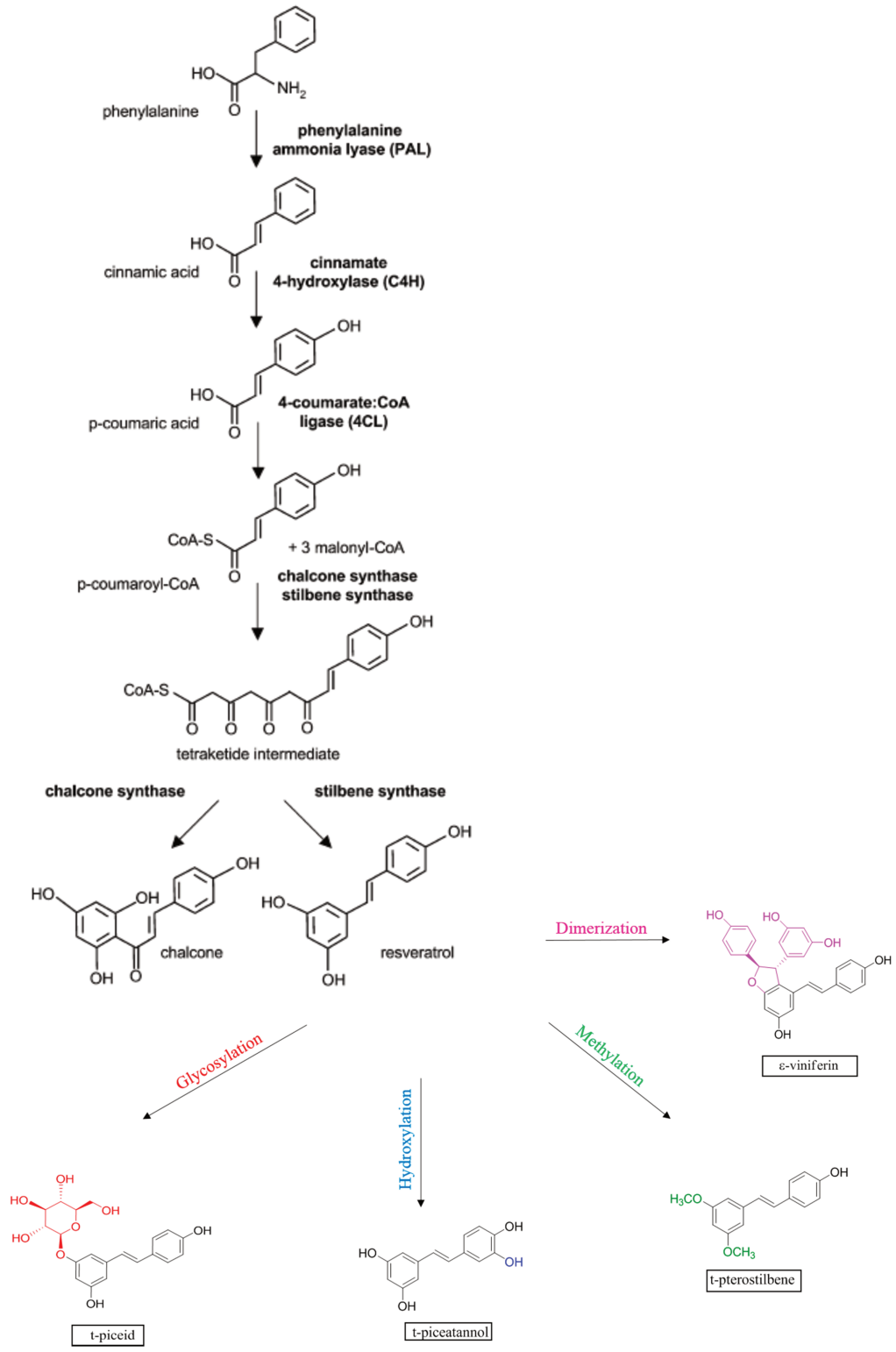


Figure 14: Voie de biosynthèse du resvératrol et de ses dérivés stilbéniques par la voie des phénylpropanoïdes (adapté de Chong et al., 2009 et Hurtado-Gaitán et al., 2017).

Chez la vigne, les phytoalexines appartiennent principalement à la famille des stilbènes, dont le squelette de base est le trans-resvératrol. Les phytoalexines stilbéniques sont synthétisées par la voie phénylalanine/polymalonate (Figure 14). La phénylalanine est transformée en acide cinnamique par la phénylalanine ammonia lyase (PAL ; Coutos-Thévenot et al., 2001), lui-même modifié en acide p-coumarique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H). En présence de coenzyme A, la 4-coumarate-CoA ligase va former le p-coumaroyl-CoA qui servira de substrat à la stilbène synthase (STS) pour la voie de biosynthèse des stilbènes et à la chalcone synthase pour la voie de biosynthèse des flavonoïdes et isoflavonoïdes. Les dérivés du resvératrol sont formés suite à différentes réactions : le picéide par glycosylation, le picéatannol par hydroxylation, le ptérostilbène par méthylation et les viniférines par di- ou polymérisation (Hurtado-Gaitán et al., 2017). Ces derniers composés ont d'ailleurs une activité antifongique supérieure à celle du resvératrol (Jeandet et al., 2002; Zhang et al., 2005).

Il a été démontré que les cultivars de vigne résistants réagissaient rapidement aux infections à *P. viticola* en produisant de fortes concentrations de stilbènes au site de l'infection (Alonso-Villaverde et al., 2011). Une analyse sur disques foliaires de vigne infectés par *E. necator* a révélé que la synthèse de stilbènes se limitait aux cellules infectées (Schnee et al., 2008). La production rapide de resvératrol, ainsi que sa transformation en viniférines, semble améliorer la résistance à l'agent de l'oïdium chez les cultivars de vigne les plus tolérants (Schnee et al., 2008). Les concentrations les plus élevées de viniférines dans des cultivars résistants coïncident avec une plus forte inhibition de croissance du mildiou (Pezet et al., 2004).

La principale phytoalexine d'Arabidopsis est la camalexine. La camalexine appartient à la classe des composés riches en soufre (Rauhut et Glawischnig, 2009). La voie de sa biosynthèse implique tout d'abord la conversion du tryptophane en indole-3-acétaldoxime (IAOx), par l'action de deux cytochromes P450 à redondance fonctionnelle, CYP79B2 et CYP79B3 (Figure 15). Cette étape est suivie par la déshydratation de l'IAOx en indole 3 acétonitrile (IAN), catalysée par CYP71A13 (Nafisi et al., 2007) et CYP71A12 (Millet et al., 2010; Saga et al., 2012). L'IAN est ensuite conjugué au glutathion par la glutathion-S-transférase GSTF6 pour synthétiser le GSH-IAN (Su et al., 2011) puis métabolisé en Cys-IAN par les glutamyl peptidases GGP1 et GGP3 (Geu-Flores et al., 2011). Enfin, l'enzyme PAD3/CYP71B15 catalyse les deux dernières réactions de la voie

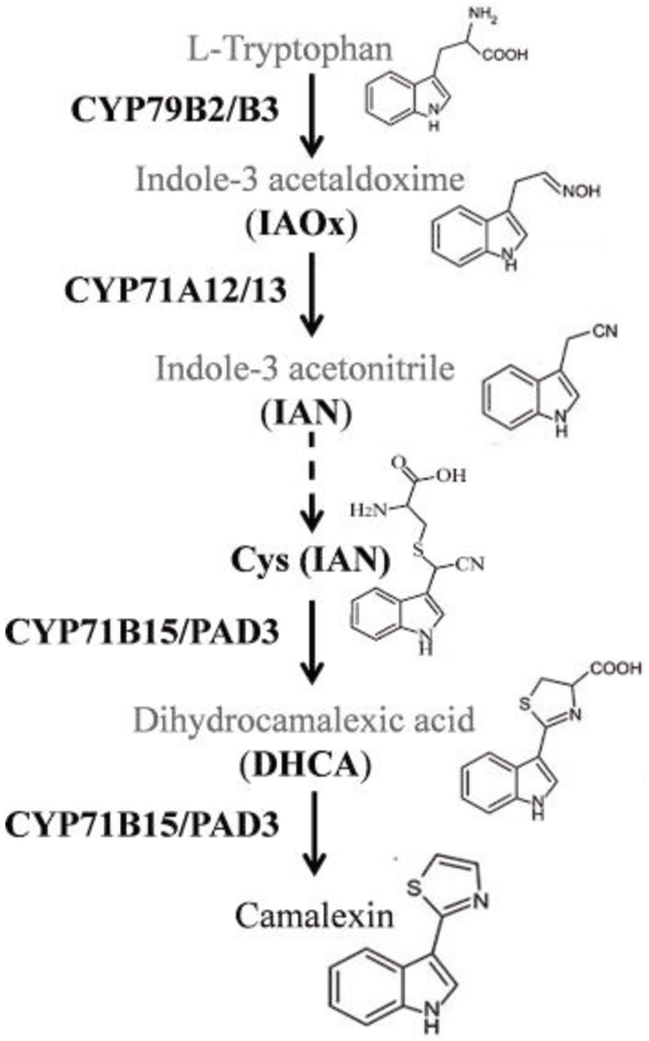


Figure 15: Voie de biosynthèse de la camalexine chez Arabidopsis (Lemarié et al., 2015).

de biosynthèse conduisant à la camalexine (Figure 15 ; Böttcher et al., 2009; Zhou et al., 1999).

De nombreuses approches génétiques ont confirmé le rôle de la camalexine dans la résistance à différents pathogènes. L'utilisation du mutant *pad3* a permis de mettre en évidence que l'accumulation de camalexine était à l'origine de la résistance contre des champignons nécrotrophes tels qu'*Alternaria brassicicola* (Nafisi et al., 2007; Thomma et al., 1999) et *B. cinerea* (Ferrari et al., 2003, 2007). De plus, la résistance induite par les OG contre *B. cinerea* requiert PAD3 chez Arabidopsis (Ferrari et al., 2007). La camalexine joue également un rôle dans la résistance contre l'oomycète *Phytophthora brassicae* (Schlaeppi et al., 2010) et contre le champignon hémibiotrophe *Leptosphaeria maculans* (Bohman et al., 2004). En revanche, aucune différence de sensibilité à différentes souches de *P. syringae* n'a été observée chez le mutant *pad3* (Glazebrook et al., 1997; Zhou et al., 1999). Plusieurs études ont montré que le mutant *pad2* d'Arabidopsis, produisant une faible quantité de camalexine, présentait également une sensibilité accrue à différents types de pathogènes (bactéries également) tels que *B. cinerea, A. brassicicola* ou *H. arabidopsidis*, ainsi qu'à certains insectes tels que *Spodoptera littoralis* (Parisy et al., 2007; Schlaeppi et al., 2008).

2.4.3. Renforcement pariétal

La paroi végétale, composée principalement de cellulose et de pectine, est la première barrière de défense contre les agresseurs. Cependant, la plupart des agents pathogènes possèdent un ensemble d'enzymes capables de dégrader la paroi, telles que les pectinases, les cellulases et les polygalacturonases, afin d'accéder aux nutriments de la plante. Le renforcement pariétal résulte d'une réorganisation structurale et chimique impliquant différents composants dont la callose, des composés phénoliques (y compris la lignine), des conjugués phénoliques tels que des polyamines phénoliques, des FAO, des peroxydases, des protéines structurelles de paroi cellulaire telles que des glycoprotéines riches en hydroxyproline (Underwood, 2012). Ce renforcement pariétal se traduit le plus souvent par la formation de papilles d'occlusion qui contribuent à retarder la progression de l'agent pathogène et empêcher la diffusion d'enzymes de dégradation de la paroi (*Cell Wall Degrading Enzymes* ou CWDE) et des toxines. La callose, un polymère de ß-1,3-glucanes, est un composant abondant des appositions

pariétales. Chez Arabidopsis, la callose synthase responsable du dépôt de callose en réponse à une blessure ou à un agent pathogène est codée par *PMR4/GLS5* (POWDERY MILDEW RESISTANT 4/ GLUCAN SYNTHASE–LIKE 5). Les mutants *pmr4*, qui ne déposent pas de callose aux sites d'infections, ont une résistance accrue aux souches virulentes de l'oïdium *Golovinomyces cichoracearum* et *Golovinomyces orontii* ainsi qu'à l'oomycète *H. arabidopsidis* (Jacobs, 2003; Nishimura, 2003; Vogel and Somerville, 2000). Des analyses complémentaires ont révélé que la surexpression de la voie du SA était à l'origine de cette résistance chez les mutants *pmr4*. Dans une récente étude, la surexpression de PMR4 a provoqué un dépôt précoce et élevé de callose aux sites de pénétration fongique, ce qui a conféré une résistance totale à la pénétration des oïdiums *G. cichoracearum* et *Blumeria graminis* (Ellinger et al., 2013). Cet exemple révèle que la synchronisation et le transport rapide de callose lors de la formation des papilles sont importants pour ralentir, voire arrêter l'invasion de certains pathogènes.

Chez Arabidopsis, de nombreux PAMP induisent une production de callose : flg22, les OG, la chitine, le chitosan, elf18 ou encore le PGN (Luna et al., 2011). La lignification est également induite par les OG chez le concombre (Robertsen, 1986) et par les chito-oligosaccharides chez le blé (Barber et al., 1989) et le riz (Kawano and Shimamoto, 2013). Chez la vigne, des dépôts de callose et de composés phénoliques ont été observés en réponse à la laminarine sulfatée, également appelé PS3 (Trouvelot et al., 2008).

2.4.4. Réponse hypersensible (RH)

Les réponses de défense conduisent parfois à la mort rapide des cellules végétales autour du site d'infection de l'agent pathogène (Mur et al., 2008). Cette réaction est appelée réponse hypersensible (RH) et se traduit par l'apparition de lésions nécrotiques qui confinent le microorganisme à son site de pénétration. Cette résistance locale limite le développement de l'agent pathogène en réduisant l'accès aux nutriments disponibles (Glazebrook, 2005). Certains PAMP peuvent également induire une RH, c'est le cas de la cryptogéine et de l'harpine sur tabac (Ricci et al., 1989; Wei et al., 1992). A l'inverse, les polysaccharides n'induisent généralement pas de RH.

De nombreux travaux tendent à présenter la RH comme une forme de mort cellulaire programmée. Parmi leurs points communs, on peut citer la nécessité de

synthétiser activement des protéines (Keen et al., 1981; Nozue et al., 1977), des caractéristiques de l'apoptose telles que la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN ou encore l'intervention de protéases (Greenberg and Yao, 2004). En effet, un traitement à la cryptogéine de cellules de tabac entraîne une diminution de l'activité mitochondriale (Bourque et al., 2002), la réorganisation du cytosquelette (Binet et al., 2001; Higaki et al., 2007), une plasmolyse des cellules (Lamotte et al., 2004) et l'activation des gènes *VPE* (*vacuolar processing enzymes*) codant des protéases à activité caspase-like (Gauthier et al., 2007).

2.4.5. Résistances systémiques (RSA et RSI)

Les résistances systémiques se décomposent en deux catégories : la résistance systémique acquise (RSA) et la résistance systémique induite (RSI).

La RSA est une forme de résistance mise en place après l'attaque par des agents pathogènes et qui se propage dans la plante par le système vasculaire (Sticher et al., 1997). La RSA permet de protéger la plante d'une attaque ultérieure contre un large spectre de microorganismes tels que les champignons, les virus, les bactéries ou les oomycètes. Elle est efficace durant plusieurs semaines. De nombreux travaux ont montré que la RSA est dépendante de la voie du SA. En effet, les mutants *sid1*, *sid2* et *pad4*, altérés dans l'accumulation du SA, sont incapables d'induire une RSA et d'induire l'expression de gènes *PR* suite à une infection (Nawrath and Métraux, 1999). Les messagers mobiles responsables de la propagation de cet état de résistance systémique n'ont pas encore été formellement identifiés. Néanmoins, des études suggèrent un rôle du salicylate de méthyle (MeSA), du glycérol-3-phosphate, de la protéine de transfert des lipides DIR1, de l'acide azélaïque, du diterpène déhydroabiétinal et de l'acide pipécolique (Ádám et al., 2018).

Parmi les bactéries présentes dans la rhizosphère, certaines rhizobactéries, appelées PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*), sont capables de stimuler la croissance des plantes et d'améliorer leur résistance face à de nombreuses stress (van Loon et al., 1998). La RSI est également observée dans le cas de plantes colonisées par les mycorhizes (Pozo and Azcón-Aguilar, 2007). Contrairement à la RSA, l'induction de la RSI est indépendante de la voie du SA mais nécessite les voies dépendantes du JA et/ou de l'ET. En effet, les mutants *jar1* et *etr1* ne sont plus capables de développer une RSI

chez Arabidopsis (Pieterse and van Loon LC, 1999; Pieterse et al., 1998; Ton et al., 2001). La RSI déclenchée par des microorganismes bénéfiques est associée à la potentialisation des défenses : chez Arabidopsis, elle potentialise l'expression de gènes induits par le JA et/ou l'ET et augmente les dépôts de callose au site d'infection. Chez des mutants de la RSI comme *myb72*, ces deux réponses sont abolies soulignant le rôle du priming lors de la RSI (Ahn et al., 2007; Van der Ent et al., 2008; Van Oosten et al., 2008; Verhagen et al., 2004; van Wees et al., 1999).

2.4.6. Exemples de protection de la vigne par l'application de PAMP

L'ensemble des réponses de défense activées par les éliciteurs permet dans certains cas d'induire une résistance aux agents pathogènes chez la vigne (Delaunois et al., 2014). La laminarine réduit l'infection par *P. viticola* et *B. cinerea* d'environ 55 et 75% respectivement (Aziz et al., 2003). L'infection par la pourriture grise est également diminuée lors de l'application de rhamnolipides ou d'OG (Aziz et al., 2004; Varnier et al., 2009). L'infection par *E. necator*, l'agent de l'oïdium, est réduite après un traitement aux ulvanes en conditions contrôlées (Jaulneau et al., 2011), ainsi qu'avec le COS-OGA, un complexe d'oligochitosans et d'oligogalacturonates, au vignoble (van Aubel et al., 2014). Certains PAMP ont d'ailleurs été homologués et commercialisés en France en tant que SDP sur vigne tels que la laminarine contre l'oïdium (Vacciplant, Goëmar), les COS-OGA (Bastid, Syngenta) ou des extraits de levures (Romeo, BASF) contre l'oïdium et le mildiou. Cependant, de nombreux essais avec des éliciteurs ont été réalisés au vignoble, mais peu d'entre eux conduisent à des résultats positifs et reproductibles.

3. Perception de la chitine chez *Arabidopsis thaliana* et le riz

3.1. La chitine et autres chito-oligosaccharides

La chitine, un polymère linéaire de ß-1,4-N-acétylglucosamines (GlcNAc), est le deuxième polysaccharide naturel le plus abondant après la cellulose. La chitine est le composant majeur de la paroi des champignons, mais elle est également présente chez les invertébrés dans la carapace de crustacés, les exosquelettes d'insectes, les œufs de nématodes parasites ou encore chez les protistes et les algues (Bueter et al., 2013). Le chitosan, un dérivé désacétylé de chitine (GlcN), ne se trouve que rarement dans la

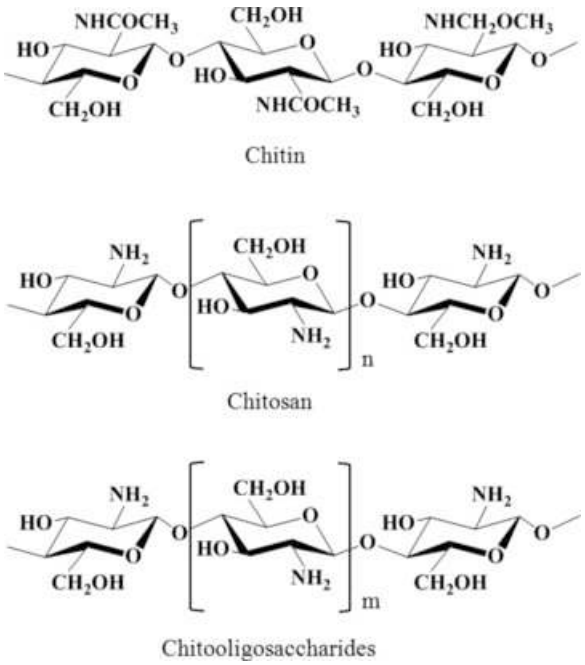


Figure 16: Structure chimique de la chitine, du chitosan et des chito-oligosaccharides (n>>m; Vo et al., 2015).

nature. On retrouve le chitosan chez certains champignons, notamment les *Zygomycètes* (Chatterjee et al., 2005). La chitine et le chitosan se distinguent par leur degré d'acétylation (DA ; Figure 16). Ainsi, la chitine contient plus de 70% d'unités D-glucosamines acétylées, tandis que le chitosan en possède moins de 30% (Liaqat and Eltem, 2018). Alors que la chitine est neutre, le chitosan est chargé positivement (Merzendorfer, 2011). Les produits d'hydrolyses de la chitine et du chitosan dont le degré de polymérisation (DP) est inférieur à 20 et dont le poids moléculaire est inférieur à 3900 Da forment des oligomères appelés chito-oligosaccharides (COS ; Figure 16 ; Liaqat and Eltem, 2018).

3.2. Perception de la chitine chez le riz et Arabidopsis

Le système de perception de la chitine diffère entre le riz et Arabidopsis. Chez le riz (*Oryza sativa*), la protéine CHITIN ELICITOR-BINDING PROTEIN (OsCEBiP ; Kaku et al., 2006) joue un rôle clé dans la reconnaissance de la chitine tandis que chez Arabidopsis, c'est le PRR CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (CERK1 ; Miya et al., 2007) qui joue un rôle déterminant.

3.2.1. Le système de perception OSCEBIP/OsCERK1 chez le riz

Les mécanismes de signalisation et de perception de la chitine ont été d'abord étudiés chez le riz. La protéine OsCEBiP a été identifiée comme le principal récepteur de la chitine chez les cellules de riz (Kaku et al., 2006). L'inactivation d'OsCEBiP altère considérablement les réactions de défense du riz en réponse à la chitine ainsi que sa résistance au champignon *Magnaporthe oryzae* (Kaku et al., 2006; Kouzai et al., 2014). OsCEBiP est un RLP composé de trois domaines LysM extracellulaires (Hayafune et al., 2014). D'après une récente étude, OsCEBiP ne serait pas une protéine transmembranaire mais liée à la membrane par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol ; Gong et al., 2017). En l'absence de chitine, OsCEBiP a tendance à former un homodimère (Shimizu et al., 2010) ou un hétérodimère avec OsLYP4 (Ao et al., 2014). La perception de la chitine stimule la dissociation d'OsCEBiP et OsLYP4 pour favoriser la formation d'homodimères d'OsCEBiP (Ao et al., 2014; Shimizu et al., 2010). Lors de la liaison de la chitine, les deux monomères OsCEBiP piègent la

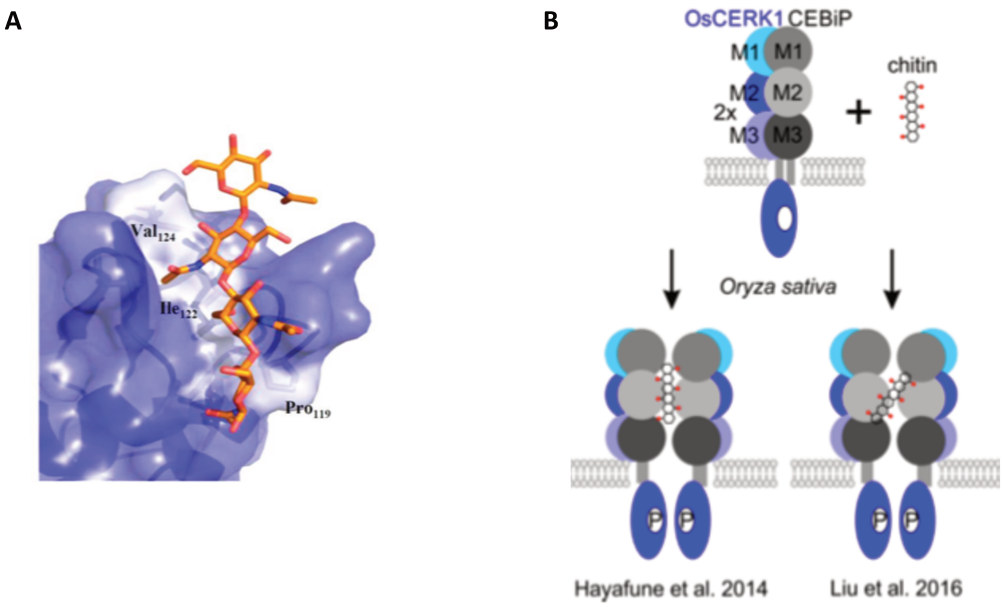


Figure 17: Modèles de perception de la chitine chez le riz constitués de CEBiP et OsCERK1 (d'après Gubaeva et al., 2018; Hayafune et al., 2014; Liu et al., 2016).

A. Modélisation de la liaison des oligomères de chitine au domaine central LysM2 de CEBiP contenant le résidu clé Ile122.

B. Le complexe CEBiP-OsCERK1 est activé lors de la liaison de son ligand $(GlcNAc)_6$ selon le modèle « sandwich » : CEBiP et OsCERK1 forment un hétérodimère composé de deux récepteurs CEBiP qui lient simultanément une chaîne de $(GlcNAc)_6$ *via* leur domaine LysM2 et de deux récepteurs OsCERK1 (Hayafune et al., 2014). Récemment un deuxième modèle de liaison a été proposé : le « sliding mode » qui recrute le même complexe moléculaire mais avec une liaison en diagonale du ligand (Liu et al., 2016).

chaîne de chitine en « sandwich » (Figure 17 ; Hayafune et al., 2014) ou en diagonale (« slide model » ; Figure 17 ; Liu et al., 2016). Des études biochimiques et des analyses bio-informatiques ont montré que le domaine central LysM2 d'OsCEBiP et plus précisément le résidu I122 permet la liaison de la chitine *via* les groupements N-acétyl, avec une haute affinité pour les oligomères contenant au moins 7 GlcNAc (Figure 17 ; Hayafune et al., 2014).

OsCEBiP ne possède pas de domaine intracellulaire, ce qui indique la présence d'un autre composant nécessaire à la transduction du signal. OsCERK1, le plus proche homologue d'AtCERK1, est un LysM-RLK dont le domaine kinase est capable de transduire le signal (Shimizu et al., 2010). OsCERK1 possède des domaines LysM mais ne peut pas lier directement la chitine (Shimizu et al., 2010). Des études ont montré que des lignées dont l'expression d'OsCERK1 est réprimée possèdent une signalisation altérée en réponse à la chitine, avec une réduction de 90% du transcriptome normalement induit par la chitine (Shimizu et al., 2010). OsCEBiP va ainsi permettre la fixation de la chitine et OsCERK1 la transduction du signal.

En réponse à la chitine chez le blé, deux homologues de CEBiP et CERK1 sont requis pour l'induction de la signalisation, suggérant un système de perception conservé chez les monocotylédones (Lee et al., 2014).

La signalisation induite par la chitine chez le riz nécessite la présence d' OsRLCK185 (*receptor-like cytoplasmic kinase 185*), un récepteur cytoplasmique recruté à la membrane plasmique et phosphorylé par OsCERK1 (Figure 18 ; Yamaguchi et al., 2013). OsRLCK185 induit la phosphorylation de la MAPK kinase kinase OsMAPKKKε, qui est le premier composant de la cascade de MAPK (Wang et al., 2017). De plus, OsMAPKKKε phosphoryle OsMKK4, une MAPKK clé dans la transduction du signal en réponse à la chitine (Kishi-Kaboshi et al., 2010). Tandis que la surexpression d'*OsMAPKKKε* induit une augmentation de l'activation d'OsMPK3/6 en réponse à la chitine, l'inactivation d'*OsMAPKKKε* compromet l'activation d'OsMPK3/6 et la résistance au champignon *Magnaporthe oryzae* (Wang et al., 2017). Par ailleurs, OsRLCK185 est une cible de l'effecteur Xoo1488 de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* qui conduit à la suppression des réponses induites par la chitine pouvant ainsi augmenter la sensibilité aux agents pathogènes (Yamaguchi et al., 2013). L'expression de *Xoo1488* chez le riz abolit également les réponses induites par le PGN, suggérant que la signalisation induite

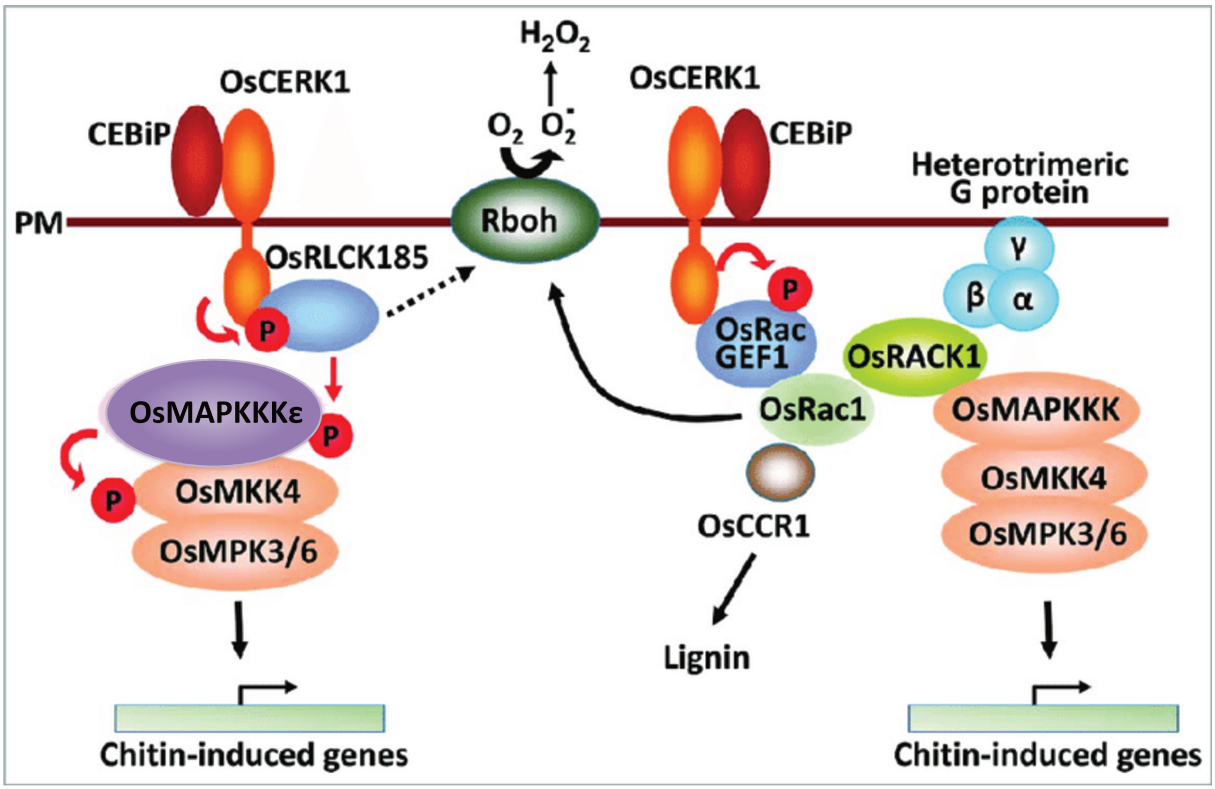


Figure 18: Modèle de signalisation induite par la chitine chez le riz (adapté de Kawasaki et al., 2017).

En réponse à la chitine, OsCERK1 phosphoryle OsRLCK185 et OsRacGEF1. OsRLCK185 phosphoryle OsMAPKKKε, entraînant l'activation d'OsMPK3 et OsMPK6 par l'intermédiaire d'OsMKK4. OsRacGEF1 active OsRac1, entraînant l'activation de OsCCR1 et OsRboh. OsRac1 interagit également avec OsRACK1, ce qui pourrait relier la protéine G hétérotrimérique à la cascade MAPK.

par OsRLCK185 en réponse à la chitine ou au PGN est commune (Yamaguchi et al., 2013).

Lors la formation du complexe OsCEBiP/OsCERK1, le domaine kinase d'OsCERK1 phosphoryle également OsRacGEF1 (GDP/GTP Exchange Factor for OsRac1) qui active une GTPase OsRac1 (Figure 18 ; Akamatsu et al., 2013). OsRac1 initie la signalisation dont l'activation d'OsRboh et la cascade de MAPK (OsMKK4, OsMPK3/6) menant à la biosynthèse de lignine par l'intermédiaire d'OsCCR1 et de phytoalexines (Figure; Kawano and Shimamoto, 2013; Kawasaki et al., 2017). La phosphorylation des MAPK est essentielle à l'induction de la biosynthèse des phytoalexines qui jouent un rôle important dans la résistance contre *M. oryzae* (Kishi-Kaboshi et al., 2010). Les gènes codant OsRacGEF1 et OsRac1 sont impliqués dans la résistance du riz contre *M. oryzae* (Ono et al., 2001; Suharsono et al., 2002).

3.2.2. Le système de perception utilisant AtCERK1 chez Arabidopsis

Chez Arabidopsis, CERK1 est nécessaire pour la signalisation de la chitine. En effet, des mutants invalidés pour le gène *CERK1* perdent leur capacité à répondre à la chitine (Miya et al., 2007; Wan et al., 2008). Contrairement à OsCERK1, AtCERK1 lie directement la chitine et peut assurer la transduction du signal par son domaine Ser/Thr kinase cytoplasmique (Iizasa et al., 2010; Miya et al., 2007; Petutschnig et al., 2010; Wan et al., 2008). De plus, la reconnaissance de la chitine est indépendante de BAK1 (Gimenez-Ibanez et al., 2009).

Le motif minimum $(GlcNAc)_5$ est requis pour induire la phosphorylation d'AtCERK1 *in vitro* (Petutschnig et al., 2010). L'ectodomaine d'AtCERK1 est composé de trois domaines LysM empaquetés dans une structure globulaire formant un sillon dans lequel vient s'ancrer la chitine, les acides aminés du domaine central LysM2 interagissant avec trois résidus GlcNAc (Liu et al., 2012). Lors de cette interaction, les résidus d'acide glutamique E110 et E114 d'AtCERK1 engagent des liaisons hydrogènes avec les oxygènes de la fonction carbonyle des GlcNAc et I141 se lie à l'azote de leur fonction amide (Liu et al., 2012). Il a été montré que $(GlcNAc)_8$ induisait la dimérisation de l'ectodomaine d'AtCERK1. En revanche, les COS plus courts tels que $(GlcNAc)_5$ sont incapables d'induire cette dimérisation *in vitro* (Liu et al., 2012). Différents modèles de perception de la chitine ont été proposés. La liaison de la chitine induirait la formation

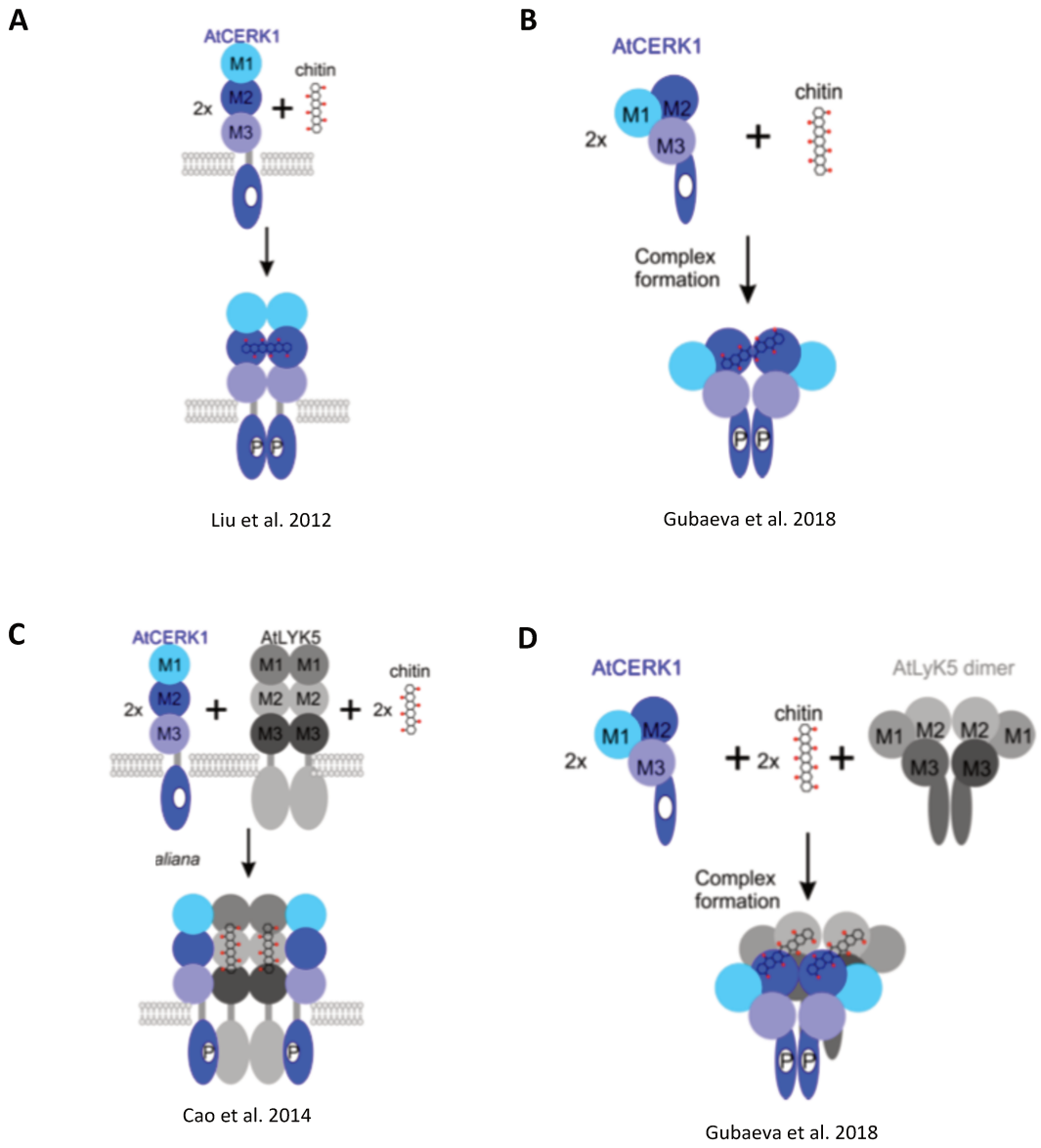


Figure 19: Modèles de perception de la chitine chez Arabidopsis constitué d'AtCERK1 et AtLYK5 (d'après Gubaeva et al., 2018).

A. La chitine induit la dimérisation d'AtCERK1. La chitine se lie directement au domaine LysM2 qui induit la formation d'un homodimère et l'activation d'AtCERK1.

B. Deux monomères d'AtCERK1 lient un heptamère de chitine et forme un homodimère menant à l'activation d'AtCERK1.

C. Un homodimère préformé d'AtLYK5 lie deux molécules de chitine *via* ses trois domaines LysM et recrute deux récepteurs AtCERK1 afin de former un complexe actif formé d'hétérodimères.

D. Deux monomères d'AtCERK1 lient un homodimère d'AtLYK5 *via* deux heptamères de chitine.

d'un dimère d'AtCERK1 (Figure 19; Gubaeva et al., 2018; Liu et al., 2012) ou bien la formation d'un hétérotétramère composé d'un homodimère d'AtLYK5 et de deux récepteurs AtCERK1 (Figure 19 ; Cao et al., 2014; Gubaeva et al., 2018). En effet, en plus d'AtCERK1, deux autres LysM-RLK, AtLYK4 et AtLYK5, sont impliqués dans la perception de la chitine. De récentes études montrent ainsi que les réponses de défense induites par la chitine sont affaiblies chez les mutants *Atlyk4* (Wan et al., 2012) et *Atlyk5* (Cao et al., 2014). L'analyse de doubles mutants *Atlyk4*/*Atlyk5* a permis de mettre en évidence une redondance fonctionnelle entre ces deux LysM-RLK et de démontrer qu'ils sont indispensables pour la perception de la chitine (Cao et al., 2014). Cao et al. ont également montré qu'AtLYK5 interagit avec AtCERK1 en réponse à la chitine et qu'AtLYK5 est requis pour induire la dimérisation et la phosphorylation d'AtCERK1 (Figure 19). AtLYK5 possède une plus grande affinité de liaison à la chitine qu'AtCERK1, suggérant qu'AtLYK5 pourrait être le récepteur principal de la chitine chez Arabidopsis (Cao et al., 2014).

AtCERK1 est également impliqué dans la perception du chitosan partiellement acétylé, puisque le burst oxydatif normalement induit par ce type de chitosan est perdu chez le mutant *Atcerk1* (Gubaeva et al., 2018). Le chitosan partiellement acétylé nécessite un DP minimum de 6 et au moins quatre groupements N-acétyles pour induire des réponses (Gubaeva et al., 2018).

AtLYM2 est le plus proche homologue d'OsCEBiP chez Arabidopsis. AtLYM2 n'est pas requis pour induire les réponses de défense déclenchées par la chitine puisque sa signalisation n'est pas altérée chez les mutants *Atlym2* (Wan et al., 2012). Pourtant, AtLYM2 est biochimiquement fonctionnel en tant que protéine liant la chitine (Shinya et al., 2012). AtLYM2 est en fait impliqué dans la fermeture des plasmodesmes en réponse à la chitine, indépendamment d'AtCERK1, et dans la résistance contre *B. cinerea* (Faulkner et al., 2013). Ces résultats suggèrent qu'il existe deux voies de perception de la chitine chez Arabidopsis : la première impliquant AtCERK1 et la seconde, AtLYM2.

3.3. Signalisation et réponses immunitaires induites par les chito-oligosaccharides

La chitine et le chitosan induisent des évènements de signalisation et des réponses de défense chez les plantes comme chez les animaux. Chez les plantes, ces réponses incluent des flux d'ions, une dépolarisation de la membrane plasmique et la phosphorylation de protéines chez les cellules de tomates (Felix et al., 1998, 1993), la lignification chez le fruit du dragon (Ali et al., 2014), l'activation de chitinases et de glucanases chez le melon, le blé et la vigne (Aziz et al., 2006; Roby et al., 1987; Tayeh et al., 2015), la production de FAO (Kuchitsu et al., 1995) et la biosynthèse de JA et de phytoalexines chez le riz (Nojiri et al., 1996; Yamada et al., 1993), l'expression de gènes de défense chez Arabidopsis (Libault et al., 2007). Cependant, l'activité élicitrice de ces molécules dépend fortement de leur degré de polymérisation. En général, la plus forte activité est observée en réponse à des hexamères, heptamères ou octamères, et les COS plus courts sont peu ou pas actifs (Gubaeva et al., 2018; Hamel and Beaudoin, 2010).

Chez les animaux, la chitine et le chitosan induisent des réponses inflammatoires, le chitosan est ainsi utilisé comme un adjuvant dans les vaccins afin de stimuler la production d'anticorps et les réponses des lymphocytes T. Chez l'Homme et la souris, la chitine est perçue par le récepteur TLR2 (Toll-like Receptor 2 ; Fuchs et al., 2018).

Dans ce contexte bibliographique, nous avons voulu utiliser ces connaissances pour améliorer la protection d'une plante d'intérêt agronomique : la vigne.

4. Objectifs des recherches

4.1. Le projet ANR « KBBE PATRIC »

Le consortium PATRIC « PAMP-Triggered Immunity in Crops » du projet européen ANR « Plant-KBBE » comporte 7 partenaires (Espagnols, Allemands et Français) à la fois académiques (Université de Tübingen, Université de Valencia et Université de Bourgogne) et industriels (Plant Response Biotech, Elicityl). Il a pour objectif de promouvoir une production agricole compétitive et durable basée sur les connaissances acquises en laboratoire afin de développer des systèmes de production agricoles respectueux de l'environnement et conformes à la nouvelle réglementation

européenne en matière de pesticides. Le projet vise à promouvoir de nouveaux outils de protection des cultures, tels que l'utilisation de PAMP et de composés bioactifs capables de stimuler l'immunité des plantes mais aussi l'utilisation synergique de ces composés, en association avec des hormones ou des pesticides utilisés à dose réduite. La diversité génétique a également été exploitée pour identifier les PRR correspondant à des PAMP purifiés, ainsi que la caractérisation de la signalisation en aval pour améliorer la résistance induite aux agents pathogènes. Les gènes identifiés pourront être utilisés dans des programmes de sélection visant à obtenir des variétés de culture ayant une capacité accrue à détecter et à prévenir les infections par des agents pathogènes, éventuellement après traitement par des produits dérivés de PAMP. L'objectif à long terme de ce projet est de réduire, voire de prévenir, les maladies épidémiques touchant les principales cultures telles que la tomate, l'orge, la pomme de terre, le colza et la vigne.

4.2. Objectif de la thèse

Mon travail de thèse fait partie intégrante du projet ANR Plant KBBE « PATRIC ». En effet, les principaux objectifs de mon projet étaient d'identifier de nouveaux PAMP et PRR chez la vigne.

Dans un premier chapitre, nous avons étudié la signalisation induite par la chitine et le chitosan chez la vigne. Une approche phylogénétique nous a permis d'identifier des PRR impliqués dans la perception de la chitine et du chitosan chez *Vitis vinifera*.

Dans le cadre de ce projet, un intérêt particulier a été porté sur les oligosaccharides, puisque certaines de ces molécules possèdent des propriétés élicitrices (Trouvelot et al., 2014). Ainsi, les OG provenant de la pectine pariétale sont capables d'induire chez certaines espèces végétales l'activation des MAPK, la production d'H_2O_2 , l'expression de gènes de défense, un dépôt de callose, tous ces phénomènes contribuant à une résistance induite contre différents agents pathogènes (Ferrari, 2013). Il est donc tout à fait possible que d'autres oligosaccharides dérivés de parois végétales possèdent également une activité élicitrice. Un criblage de 19 molécules oligosaccharidiques a été réalisé afin de tester leur capacité à induire sous serre une protection de la vigne contre *P. viticola*. Nous avons identifié les xyloglucanes (Xh), des

fragments d'hémicellulose pariétale, comme de nouveaux éliciteurs actifs sur la vigne. Le second chapitre de cette thèse se focalise sur les évènements de signalisation cellulaire et moléculaire induits par les Xh chez la vigne. Nous avons par la suite utilisé des mutants de la plante modèle Arabidopsis pour caractériser des composants de la signalisation induite par les Xh.

Dans le dernier chapitre, nous avons cherché à identifier par une approche génétique un ou des PRR impliqués dans la perception des Xh chez Arabidopsis. Nous avons notamment développé la technique d'édition génomique CRISPR-Cas9 afin d'obtenir des doubles mutants de récepteurs candidats.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels

1.1. Matériels relatifs à la vigne

1.1.1. Suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires de vigne (*Vitis vinifera* cv. Gamay) sont cultivées dans le milieu Nitsch & Nitsch (1969, pH 5,5 ; Annexe 1). Elles sont maintenues sous agitation permanente (125 rpm) en salle climatisée (25°C) et en lumière continue (50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). Les suspensions cellulaires sont repiquées en fin de phase exponentielle de croissance tous les 7 jours par addition de 30 ml de la culture précédente dans 70 ml de milieu neuf. Pour la mesure des activités biologiques, les suspensions cellulaires saturées à 80% sont diluées au demi par addition de milieu de culture 24 h avant utilisation.

1.1.2. Plantes

Les plantes de vigne cv. Marselan (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon x *Vitis vinifera* cv. Grenache noir) sont issues de boutures herbacées cultivées en pot individuel sur un substrat tourbe/perlite (4/1 ; v/v) et placées en serre dans les conditions suivantes : 25°C jour, 18°C nuit, hygrométrie 50% et éclairage naturel complété d'un apport artificiel pendant la période hivernale. Les plantes sont arrosées quotidiennement et reçoivent un apport nutritif hebdomadaire (0.25% Topfert2 solution NPK 10-10-10 + oligoéléments, Plantin, France). Dans ces conditions, des plantes comportant 6 à 8 feuilles étalées, obtenues environ 1 mois après l'enracinement des boutures, sont utilisées pour les expériences.

1.1.3. Agents pathogènes

1.1.3.1. *Plasmopara viticola*

L'inoculum de *P. viticola* utilisé provient d'une population prélevée en Bourgogne en 2002 par le Service Régional de Protection des Végétaux de Beaune. Il est entretenu par repiquage chaque semaine sur des plantes de vignes sensibles (Marselan). Les

Mutants de signalisation					
Noms	**Locus (TAIR)**	**Annotation**	**Fournisseur NASC ou donneur**	**Identifiant**	**Perturbé dans**
cyp71A13	At2g30770	cytochrome p450	Olivier Lamotte		Voie de la camalexine (Nafisi et al., 2007)
pad3	At3g26830	phytoalexin deficient 3	Olivier Lamotte	CS3805	Voie de la camalexine (Zhou et al., 1999)
sid2-1	At1g74710	salicylic acid induction deficient 2	Olivier Lamotte		Voie du SA (Wildermuth et al., 2001)
npr1	At1g64280	nonexpresser of pr genes 1	Felix Mauch		Voie du SA (Spoel et al., 2003)
pmr4	At4g03550	powdery mildew resistant 4	Felix Mauch	CS3858	Voie de la callose (Vogel and Somerville, 2000)
dde2	At5g42650	delayed dehiscence 2	Olivier Lamotte		Voie du JA (Stintzi and Browse, 2000)
coi1-40	At2g39940	coronatine insensitive 1	Olivier Lamotte		Voie du JA (Dobón et al., 2013)
ein2	At5g03280	ethylene insensitive 2	Olivier Lamotte		Voie de l'ET (Alonso et al., 1999)
rbohD	At5g47910	respiratory burst oxidase homologue d	Felix Mauch		Voie des FAO (Torres et al., 2002)

Mutants de récepteurs				
Noms	**Locus (TAIR)**	**Annotation**	**Fournisseur NASC ou donneur**	**Identifiant Référence**
bak1-5	At4g33430	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase	Freddy Boutrot	(Schwessinger et al., 2011)

Suite page suivante

sporanges sont collectés à l'aide d'un pinceau sur la face inférieure de feuilles sporulantes et mis en suspension dans de l'eau osmosée. Leur concentration est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez et ajustée à 10^4 sporanges/ml. Cette suspension est pulvérisée sur la face inférieure des feuilles d'une plante saine jusqu'au point de ruissellement. Après une nuit dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau à température ambiante, la plante est replacée en serre. Après 6-7 jours, lorsque les feuilles présentent les symptômes caractéristiques de type « taches d'huile », la plante est placée une nuit dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau afin de provoquer sa sporulation. Ces feuilles peuvent alors servir de source d'inoculum.

1.1.3.2. *Botrytis cinerea*

La souche BMM de *B. cinerea*, (Zimmerli et al., 2001), est cultivée en boîte de Pétri sur milieu solide V8 (jus de légume commercial V8 dilué au demi, KH_2PO_4 5 g/l, agar 15 g/l, pH 6,0) dans un phytotron climatisé à l'obscurité à 20°C et repiquée toutes les semaines par dépôt de mycélium sur un milieu neuf. Les conidies sont ensuite collectées à l'aide d'eau ultra pure, filtrées, comptées à la cellule de Malassez et conserver à 4°C avant les tests de résistance induite.

1.2. Matériel relatif à *Arabidopsis thaliana*

1.2.1. Suspension cellulaire

Les suspensions cellulaires d'*A. thaliana* d'écotype Columbia (Col-0) sauvage sont cultivées dans le milieu Murashige et Skoog (Murashige and Skoog, 1962 ; milieu MS ; Annexe 2.) additionné de saccharose (30 g/l), de kinétine (1 mg/ml) et d'acide naphtalène-1 acétique (1 mg/ml) à pH 5,7. Elles sont maintenues sous agitation permanente (120 rpm) en salle climatisée (25°C) et en lumière continue (50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). En fin de phase exponentielle de croissance, les suspensions cellulaires sont repiquées par ajout de 30 ml de la culture précédente dans 70 ml de milieu neuf. A saturation, elles sont diluées au demi par addition de milieu de culture 24 h avant la mesure des activités biologiques.

sobir1	At2g31880	suppressor of bak1-interacting receptor-like kinase 1	Frederic Brunner	(Gao et al., 2009)
cerk1-2 /lyk1	At3g21630	chitin elicitor receptor kinase 1	Freddy Boutrot	(Miya et al., 2007; Wan et al., 2008)
lyk2	At3g01840	lysm-containing receptor-like kinase 2	Andrea Gust	
lyk3	At1g51940	lysm-containing receptor-like kinase 3	NASC	SALK_140374C
lyk4	At2g23770	lysm-containing receptor-like kinase 4	Andrea Gust	
lyk5	At2g33580	lysm-containing receptor-like kinase 5	Andrea Gust	
wak1	At1g21250	cell wall-associated kinase 1	Daniel Savatin	SALK_107175C
wak2	At1g21270	cell wall-associated kinase 2	Daniel Savatin	SAIL_12_D05
wak3	At1g21240	cell wall-associated kinase 3	Daniel Savatin	SAIL_1156_F8
wak4	At1g21210	cell wall-associated kinase 4	NASC	SALK_080632C
wakl3	At1g16140	wall associated kinase-like 3	NASC	SALK_122076C
wakl4	At1g16150	wall associated kinase-like 4	NASC	SALK_002429C
wakl7	At1g16090	wall associated kinase-like 7	NASC	SAIL_513_G10
wakl14-1	At2g23450	wall associated kinase-like 14	NASC	SALK_085371C
wakl14-2	At2g23450	wall associated kinase-like 14	NASC	SALK_049372
wakl22	At1g79670	wall associated kinase-like 22	NASC	SALK_077975C
ark1	At1G65790	receptor kinase 1	NASC	SALK_002112C
ark2	At1G65800	receptor kinase 2	NASC	SALK_082773
crk5	At4g23130	cystein-rich receptor-like protein kinase 5	Adrien Gauthier	(Bourdais et al., 2015)
crk6	At4g23140	cystein-rich receptor-like protein kinase 6	Adrien Gauthier	(Idänheimo et al., 2014)
crk7	At4g23150	cystein-rich receptor-like protein kinase 7	Adrien Gauthier	(Idänheimo et al., 2014)
crk10	At4g180	cystein-rich receptor-like protein kinase 10	Adrien Gauthier	

Tableau 4: Caractéristiques des différents mutants de signalisation et de récepteurs utilisés pour étudier la réponse aux Xh.

1.2.2. Plantes

Les lignées sauvages et mutantes des plantes d'*A. thaliana* sont issues de la germination de graines d'écotype Columbia (Col-0), obtenues au Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) ou disponibles au sein du laboratoire (Tableau 4). Les plantes sont cultivées sur mottes de tourbe (Jiffy-7), dans une chambre de culture climatisée dans les conditions suivantes : 10 h de jour à 20°C avec une intensité lumineuse de 175 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ et 14 h de nuit à 18°C. Après 15 jours ou 4 semaines de croissance, les plantes sont utilisées pour les expériences.

1.2.3. Agents pathogènes

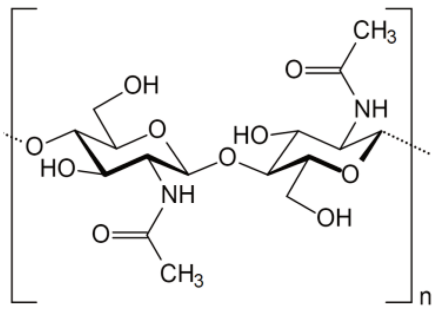
1.2.3.1. *Hyaloperonospora arabidopsidis*

La souche NOCO2 de *H. arabidopsidis*, fournie par Jean-Pierre Métraux (Fribourg, Suisse), est entretenue chaque semaine sur des plantes d'*A. thaliana* écotype Col-0 de 2 semaines. Les spores sont collectées en plaçant les feuilles sporulantes dans de l'eau osmosée et la concentration est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez puis ajustée à 5.10^4 sporanges/ml. Cette suspension est pulvérisée sur des plantes saines qui sont placées dans un phytotron (14 h de jour à 20°C, 10 h de nuit à 18°C). La sporulation est déclenchée 6 jours après inoculation en maintenant une humidité de 100% pendant 24 h.

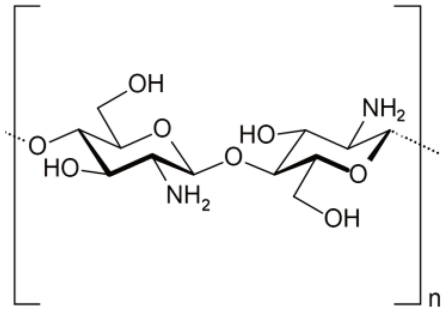
1.3. Eliciteurs

1.3.1. Chitine et chitosan

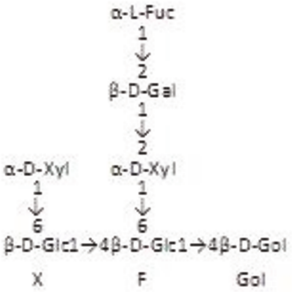
La chitine et le chitosan (Figure 20), de degré de polymérisation (DP) 6 et possédant un degré d'acétylation (DA) de 99,9% et 0,1% respectivement, sont fournis par la société Elicityl (Crolles, France). Ils sont extraits d'exosquelettes de crustacés, hydrolysés, purifiés par chromatographie et leurs DP et DA sont vérifiés par analyse ^{1}H-RMN. Les chito-oligosaccharides sont préparés à 1 ou 10 mg/ml dans l'eau ultra pure stérile.



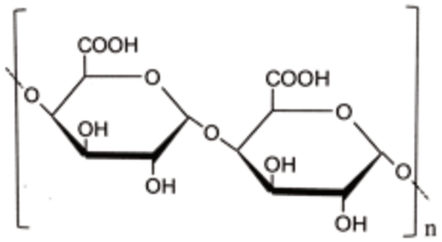
Chitine



Chitosan



Xh



OG

Figure 20: Structure chimique de la chitine, du chitosan (degré de polymérisation (DP) n=6), du xyloglucane (Xh) DP7 et des oligogalacturonates (OG ; DP n compris entre 10 et 15).

1.3.2. Oligogalacturonates

Les oligogalacturonates (OG) sont fournis par la société Elicityl (Crolles, France). Ils sont préparés extemporanément dans de l'eau ultra pure stérile et utilisés comme un mélange d'oligomères avec des DP compris entre 10 et 15 (Figure 20).

1.3.3. Xyloglucanes

Les xyloglucanes (Xh) sont purifiés et fournis par la société Elicityl (Crolles, France ; Figure 20). Ils sont préparés extemporanément dans de l'eau ultra pure. Une caractérisation fine des Xh réalisée par 3 analyses complémentaires (Chapitre IV) a montré que le constituant majeur était l'heptamaloxyloglucane (Xh DP7).

2. Méthodes

2.1. Traitement des cellules et des feuilles de vigne et d'Arabidopsis

2.1.1. Traitement des suspensions cellulaires

Avant chaque expérience, les suspensions cellulaires de vigne ou d'Arabidopsis sont diluées au demi 24 h auparavant et lavées deux fois dans du milieu M10 (mannitol 175 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM, K_2SO_4 10 mM, Mes 10 mM, pH 5,3) et de nouveau suspendues à 0,1 g de poids frais par ml. Après deux heures d'équilibration à 25°C sous agitation permanente à 130 rpm, les cellules sont traitées par le Xh à 0,1 ; 0,5 ou 1 mg/ml ou par les OG à 1 mg/ml (témoin positif). Les suspensions cellulaires contrôles (témoin négatif) sont traitées par un volume équivalent d'eau ultra pure.

2.1.2. Traitement des feuilles de vigne

Pour les expériences sur plantes entières, les feuilles de vigne de rang 2 et 3 sont traitées en serre par pulvérisation avec une solution de Xh ou d'OG à 5 mg/ml sur les faces supérieures et inférieures jusqu'au point de ruissellement avant inoculation 48 h plus tard.

Une alternative est le traitement de disques foliaires par flottaison. Dans ce cas, les disques foliaires de vigne (2 mm) sont prélevés sur des feuilles de rang 2 et 3, avec environ 12 disques par plantes et 3 plantes par condition. Les disques sont déposés en flottaison sur les solutions d'éliciteurs à 5 mg/ml dans des boîtes de Pétri carrées, face

Gènes	Locus (TAIR)	Numéro d'accession (NASC)	Séquences des amorces 5' – 3'	Sens (S) Antisens (A)	Produit PCR (pb)
WAKL3	At1g16140	SALK_122076C	TTCTCCAACTCTCTCGAGCTG	S	1138
			ACTTCTTCAGCCCTTACGGAG	A	
WAKL4	At1g16150	SALK_002429C	CCGTCGTAAATCAGACTTTGC	S	1079
			AAGACTTGCATTTGTTGGACG	A	
WAKL7	At1g16090	SAIL_513_G10	ATCTTGATGCCAATCTGTTGC	S	1004
			TGTGTACACGCCTGAGAAGTG	A	
WAKL14	At2g23450	SALK_085371C	TGCCGTGATGGATTGACTAAC	S	1118
			GATGCTTAGCCTTCCACAGTG	A	
WAKL14	At2g23450	SALK_049372	GTAAAAACGCTCCACCAACAG	S	1056
			ATCAACGTTCAACGAAGATGG	A	
WAKL22	At1g79670	SALK_077975C	TACCAACCAAGCTCAATCACC	S	1029
			TATGAATGATTTGCGTTGGTG	A	
ARK1	At1G65790	SALK_002112C	ATGAAATTGCCAGATACCACG	S	1225
			ACCTCGTTCATGAACTCATCG	A	
ARK2	At1G65800	SALK_082773	CGAATTGGTAAAAGCAAGCAG	S	1191
			TCGGGAATTCTGATGACAAAG	A	
LB2	ADN-T	Lignées SALK	ACTGGCCGTCGTTTTACAACG	S	-
LB3	ADN-T	Lignées SAIL	CCAATCTCGATACACCAAATCG	S	-

Tableau 5: Séquences des amorces utilisées pour génotyper les mutants d'Arabidopsis commandés au NASC.

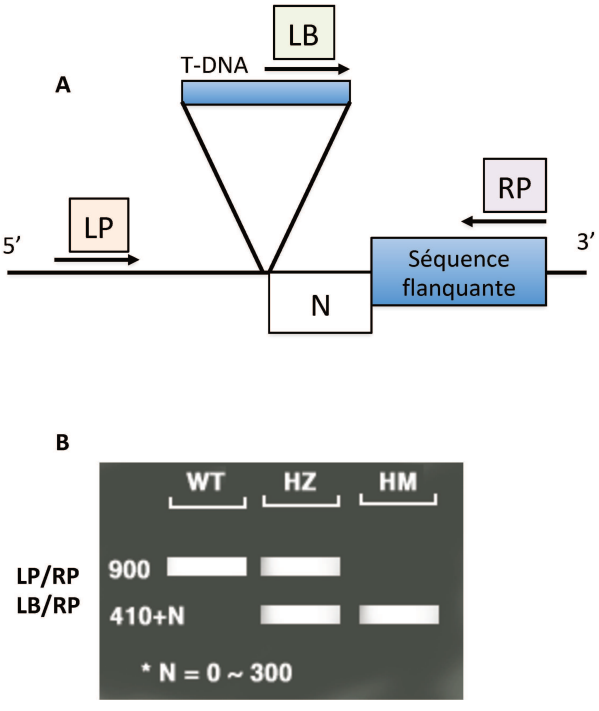


Figure 21: Génotypage des mutants T-DNA.
A. Position des amorces utilisées pour le génotypage. LP et RP : Left & Right primers. LB : T-DNA Left Border primer. N : Différence entre le site d'insertion et la position de la séquence flanquante généralement entre 0 et 300 paires de bases (pb).
B. Produits de PCR possibles visualisés sur gel d'agarose. WT (wild type, pas d'insertion) devrait générer un produit compris entre 900 et 1300 pb (LP/RP ; suivant la taille du produit) ; HM (Homozygote : insertions dans les deux chromosomes) va générer une bande de 410+N pb (LB/RP); HZ (Hétérozygotes) va générer les deux bandes.

inférieure au contact de la solution. Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture pendant 48 h (10 h de jour à 20°C, 14 h de nuit à 18°C).

2.1.3. Traitement des feuilles d'Arabidopsis

Les feuilles détachées d'Arabidopsis sont prélevées au niveau du pétiole avec un scalpel sur des plantes de 4 semaines et infiltrées sous vide pendant 1 min avec de l'eau osmosée. Après un repos de trois heures en flottaison sur de l'eau osmosée, les feuilles sont traitées par remplacement de l'eau avec les solutions de Xh ou d'OG à 1 mg/ml.

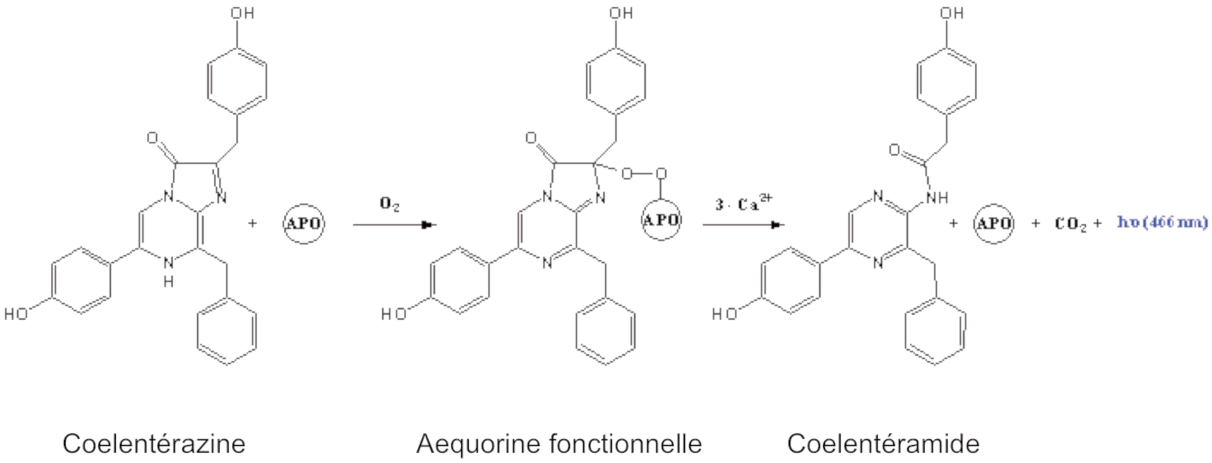
Alternativement, les plantes d'Arabidopsis sont traitées par pulvérisation avec une solution de Xh ou OG à 2,5 mg/ml sur les faces supérieures et inférieures des feuilles jusqu'au point de ruissellement avant inoculation 48 h plus tard.

2.2. Génotypage des plantes d'Arabidopsis

Pour contrôler l'homozygotie des lignées mutantes d'Arabidopsis, l'ADN génomique est extrait par 200 µl d'un tampon d'extraction (Tris HCl 1 M pH 7,5 ; NaCl 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 10%). Un µl d'ADN génomique est amplifié par PCR à l'aide des deux couples d'amorces LP/RP et LB/RP. Les amorces génomiques spécifiques LP (Left primer) et RP (Right primer) bordent l'ADN de transfert (ADN-T) intégré dans le gène cible (Tableau 5). L'amplification avec LP/RP est possible chez l'allèle sauvage (homozygote sauvage ou hétérozygote). En revanche, aucun fragment ne peut être amplifié avec cette paire d'amorces pour l'allèle muté car la taille du fragment T-DNA (généralement 5 à 25 kb) empêche l'amplification dans les conditions de PCR utilisées (Figure 21).

Une seconde réaction de PCR est réalisée à l'aide d'un mélange avec une amorce génomique (RP) et une amorce située dans la bordure gauche de l'ADN-T (Left Border ; LB2 pour les lignées SALK ou LB3 pour les lignées SAIL). Aucune amplification n'est possible chez la plante sauvage homozygote. L'amplification est néanmoins possible chez l'homozygote pour l'allèle muté et chez l'hétérozygote (Figure 21).

Les réactions de PCR se font dans un volume final de 15µl contenant: 1µl d'ADN génomique, 5µM d'amorces LP/RP ou LB/RP, 10 µM de dNTP, 2,5µl de tampon *Taq* polymérase 10X et 0,5 U de *Taq* polymérase (GO *Taq*, Promega). L'amplification est réalisée pendant 35 cycles contenant une étape de dénaturation de 30 sec à 95°C, une



Coelentérazine Aequorine fonctionnelle Coelentéramide

Figure 22: Reconstitution *in vivo* de l'aequorine fonctionnelle avec la coelentérazine.
L'aequorine fonctionnelle est reconstituée via la coelentérazine. L'interaction de 3 ions Ca^{2+} avec l'aequorine fonctionnelle induit un changement de conformation qui permet l'oxydation de la coelentérazine en coelentéramide, s'accompagnant d'une émission de luminescence proportionnelle à la concentration en Ca^{2+} libre. APO : apoaequorine

étape d'hybridation de 30 sec à 54°C et une extension de 70 sec à 72° C, suivie d'une extension finale de 10 min à 72°C. Les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose 1% (m/v) puis révélés sous ultra-violets après coloration au bromure d'éthidium.

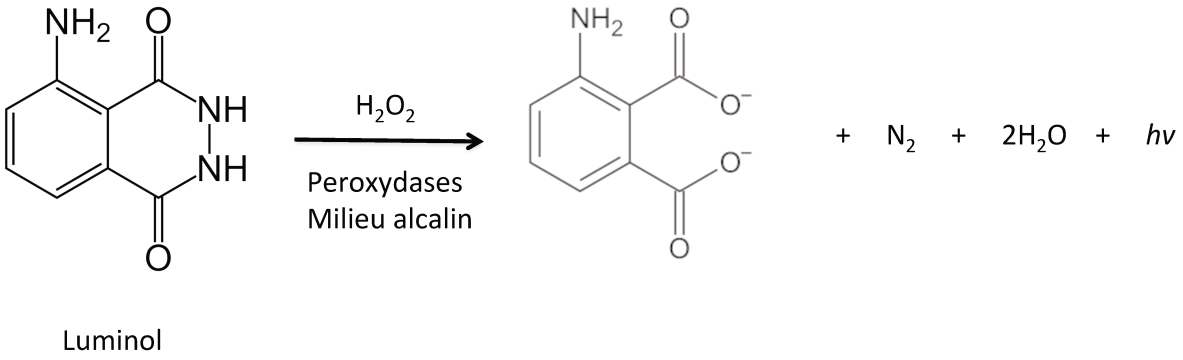
2.3. Variations de la concentration en calcium libre cytosolique

- Sur suspensions cellulaires de vigne

L'aequorine est reconstituée in vivo par addition de coelentérazine à des suspensions cellulaires de vigne transformées qui expriment constitutivement l'apoaequorine (protéine non fonctionnelle, Figure 22). Pour une reconstitution complète de l'aequorine, les cellules sont équilibrées 2 h à l'obscurité, en milieu M10 (§2.1) contenant de la coelentérazine 3 µM (Calbiochem). Après reconstitution, 250 µl de cellules sont prélevés et transférés dans un tube contenant déjà le traitement désiré. L'addition de cellules constitue le temps zéro, le tube est alors immédiatement placé dans la chambre du luminomètre (Lumat LB9507, Berthold). La luminescence est enregistrée en continu avec des intervalles d'une seconde (mesures exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) / seconde). Ces valeurs de luminescence sont converties en concentrations de Ca^{2+} libre dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), grâce à l'équation $p([Ca^{2+}]_{cyt}) = 0{,}332588\ (-\log k) + 5{,}5593$, décrite en détail par Rentel and Knight (2004), où k est la luminescence émise par seconde/la luminescence émise totale (Ranf et al., 2008). Cette équation prend en compte la luminescence émise lors de l'expérience, mais aussi la luminescence totale susceptible d'être émise par l'échantillon si toute l'aequorine reconstituée est mobilisée par le Ca^{2+}. Par conséquent, à la fin de chaque expérience, l'aequorine fonctionnelle non consommée est quantifiée par ajout d'une concentration saturante en calcium à des cellules lysées (ajout de 300 µl d'une solution de $CaCl_2$ 2M, 20 % éthanol). La luminescence émise est enregistrée jusqu'à un retour au niveau basal.

- Sur disques foliaires d'Arabidopsis

Des disques foliaires de plantes d'Arabidopsis exprimant constitutivement le gène codant l'apoaequorine sont pré-incubés toute une nuit à l'obscurité dans de l'eau ultra pure contenant 10 µM de coelentérazine. Après reconstitution de l'aequorine



Luminol

Figure 23: Chimiluminescence du luminol pour mesurer la production d'H_2O_2 sur des suspensions cellulaires en présence de peroxydases.

fonctionnelle, les disques sont traités avec les molécules à tester et la luminescence est enregistrée en continu avec des intervalles d'une seconde (mesures exprimées en unités relatives de luminescence (RLU) / seconde) à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB9507, Berthold). L'aequorine fonctionnelle non consommée est quantifiée par ajout d'un volume d'une solution de $CaCl_2$ 2M, 20 % éthanol. La luminescence émise est enregistrée jusqu'à un retour au niveau basal. Les valeurs de luminescence sont converties en concentrations de Ca^{2+} libre dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$), grâce à l'équation établie par Rentel and Knight (2004).

2.4. Production d'H_2O_2

2.4.1. Méthode sur suspensions cellulaires

La production d'H_2O_2 dans les suspensions cellulaires est mesurée par chimiluminescence du luminol. La réaction de ce composé en présence de peroxydases s'accompagne d'une émission de luminescence (Figure 23; Thorpe & Kricka, 1986). Ainsi, 250 µl de suspensions cellulaires sont mélangées à 300 µl de tampon H50 composé d'HEPES-KOH 50 mM, mannitol 175 mM, $CaCl_2$ 5 mM, K_2SO_4 0,5 mM, pH 8,5 et additionné de 50 µl de luminol 0,3 mM. La luminescence, mesurée sur une période de 10 s avec un luminomètre (Lumat LB9507, Berthold) est intégrée et exprimée en nmoles d'H_2O_2/g de poids frais de cellules grâce à une gamme étalon établie par addition de concentrations croissantes en H_2O_2 dans les suspensions cellulaires.

2.4.2. Méthode sur disques foliaires d'Arabidopsis

La production d'H_2O_2 sur disques foliaires est mesurée par chimiluminescence du luminol. Les disques sont déposés pendant une nuit à l'obscurité dans une plaque 96 puits contenant chacun 100 µl d'eau ultra pure. Le lendemain, l'eau ultra pure est renouvelée et les disques foliaires sont laissés au repos pendant 2 h minimum toujours à l'obscurité. L'eau est ensuite remplacée par 95 µl d'une solution contenant 91µl de tampon H50 (§2.4.1), de luminol 3 mM et 10 mg/ml de peroxydase de raifort (HRP ; 100 U/mg). Après 20 min de repos, 5 µl des molécules à tester sont ajoutés et la luminescence est mesurée pendant 30 min avec un luminomètre (Mithras LB 940, Berthold) en intégrant la luminescence émise sur une période de 5 s.

2.5. Immunodétection des MAPK phosphorylées

Les extraits protéiques sont obtenus par broyage mécanique des cellules de vigne ou des feuilles d'Arabidopsis et par ajout de 150 µl de tampon d'extraction (HEPES-KOH 50 mM, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, ß-glycéro-phosphate 50 mM, NaF 10 mM, PMSF 1mM et DTT 5 mM, pH 5,7). Après centrifugation (15 min, 20000 g, 4°C), une aliquote du surnageant est prélevée pour quantifier les protéines par spectrophotométrie selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant comme standard la sérum-albumine bovine (SAB) puis 300 µl de surnageant sont prélevés et traités par du tampon Laemmli (1970) à 95°C pendant 5 min. Les protéines totales (15 à 20 µg) sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en conditions dénaturantes et réductrices (SDS-PAGE) dans un tampon de migration (Tris 250 mM, glycine 1,92 M, SDS 0,5 % (m/v)). Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Biorad) et du tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,0375 % m/v, méthanol 20% (v/v)) pendant 30 min à 15 V. Le transfert des protéines sur la membrane est vérifié avec une coloration au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,5% m/v, acide acétique 1% v/v) puis celle-ci est éliminée par rinçage à l'eau osmosée. La membrane est ensuite incubée pendant 2 h à température ambiante dans du tampon TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% v/v) avec 2% de SAB (m/v) afin de saturer les sites de fixation libres de la membrane. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire polyclonal de lapin (dilution au 1/2000ème) dirigé contre les peptides phosphorylés des MAPKs humaines activées pERK1/2 (Cell Signaling) dans le tampon TBST supplémenté de 2% (m/v) de SAB. La membrane est ensuite lavée 2 fois pendant 10 min dans du TBST puis incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase HRP (Agrisera) dilué au 40000ème dans le tampon TBST additionné de 2% (m/v) de SAB. Après 3 lavages pendant 10 min avec le tampon TBST, la révélation du western blot est réalisée par chimiluminescence à l'aide du kit de détection LumiGlo (Cell Signaling).

			Séquence des amorces 5' – 3'	
Organismes	**Gènes**	**Identifiant**	**Sens**	**Antisens**
V. vinifera	*PAL*	XM_002268220	AGTCTCCATGGACAACACCCG	TGCTCAGCACTTTCGACATGG
V. vinifera	*STS*	XM_002263926	TACGCCAAGAGATTATCACT	CTAAAGAGTCCAAAGCATCT
V. vinifera	*EF1α*	XM_002284888	GAACTGGGTGCTTGATAGGC	AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA
Arabidopsis	*PR1*	At2g14610	ACTACAACTACGCTGCGAACA	TGGCTTCTCGTTCACATAATTCCC
Arabidopsis	*PR2*	At3g57260	GGGACGGCTCTCGTGGCTACC	CGCGCGTTATCGAAACTCGCGG
Arabidopsis	*PAD3*	At3g26830	GGGTACCATACTTGTTGAGATGG	TTGATGATCTCTTTGGCTTCC
Arabidopsis	*PDF1.2*	At2g26560	CACCCTTATCTTCGCTGCTCTTG	CACTTGTGTGCTGGGAAGACATAG
Arabidopsis	*OLI*	At4g26410	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGA	GGTCCGACATACCCATGATCC

Tableau 6: Séquences des amorces spécifiques utilisées pour étudier l'expression des gènes de défense chez la vigne et Arabidopsis.
EF1α et *OLI* sont utilisés comme gènes de référence chez la vigne et Arabidopsis, respectivement.

2.6. Synthèse d'ADNc et PCR quantitative (qPCR)

Les ARN totaux sont extraits à partir de 0,1 g de cellules de vigne ou de 3 feuilles d'Arabidopsis à l'aide de Trizol suivant les recommandations du fabriquant (Invitrogen). Après transcription inverse sur 1 µg d'ARN totaux dans un volume total de 10 µl (Supercript III reverse transcriptase, Invitrogen), les ADN complémentaires (ADNc) sont dilués au 1/200ème dans l'eau ultra pure stérile. Quatre µl d'ADNc sont soumis à une qPCR dans un volume final de 10 µl avec le mix ABsolute SYBRGreen Rox (ThermoScientific) contenant le fluorophore, la polymérase, les dNTP, le tampon de réaction de l'enzyme et les amorces (0,5 µM ; Tableau 6). La réaction d'amplification des ADNc est réalisée à l'aide d'un thermocycleur Sequence Detection System (ABI Prism) selon les conditions suivantes : après une étape de dénaturation de 15 min à 95°C, 40 cycles de 3 étapes de 15 s à 95°C (dénaturation), 30 s à 60°C (hybridation des amorces sur les ADNc), 45 s à 72°C (amplification du brin complémentaire), puis une étape finale composée de 15 s à 95°C, 15 s à 60°C et 15 s à 95°C. Grâce à la fluorescence mesurée en continue, le facteur d'activation de l'expression du gène cible est calculée à l'aide du logiciel selon la méthode de Livak and Schmittgen (2001) comme étant égal à $2^{-\Delta\Delta Ct}$; avec $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (échantillon traité) - ΔCt (échantillon eau) et ΔCt = Ct (gène cible) – Ct (gène de référence). Les gènes *Elongation Factor 1α* (*EF1α) et le gène At4g26410* (*OLI*) sont utilisés comme gènes de référence respectivement chez la vigne et Arabidopsis (Czechowski et al., 2005; Dubreuil-Maurizi et al., 2010).

2.7. Tests de résistance induite

2.7.1. Vigne – *Botrytis cinerea*

Après traitement (§2.1.2), les disques foliaires sont déposés sur du papier Whatman humidifié à l'eau osmosée dans une boîte en plastique transparente. Vingt µl d'inoculum à 5.10^4 conidies/ml, mis en suspension dans du Potato Dextrose Broth dilué au quart (PDB, Difco ; 6g/l), sont déposés sur chaque disque et les boîtes sont placées dans une chambre climatique à 20°C/18°C (jour/nuit) avec une photopériode de 10 h de jour. Trois jours après inoculation, le plus grand diamètre de chaque lésion est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse digital.

2.7.2. Arabidopsis – *Botrytis cinerea*

Deux jours après traitement (§2.1.3), 8 feuilles de 4 plantes pour chaque condition sont inoculées avec une gouttelette de 6µl de PDB dilué au quart (6 g/l) contenant 5.10^4 conidies/ml. Les plantes sont placées en chambre de culture dans des mini serres dans les conditions suivantes : 10 h de photopériode, 20°C jour, 18°C nuit, avec 100% d'humidité. Trois jours après inoculation, le plus grand diamètre de chaque lésion est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse digital.

2.7.3. Arabidopsis – *Hyaloperonospora arabidopsidis*

Pour chaque traitement (§2.1.3), 4 tapis de plantules de 15 jours (contenant une centaine de plantes chacun) sont inoculés par pulvérisation d'une suspension de conidies à 5.10^4/ml dans de l'eau osmosée dans les conditions de 10 h de photopériode, 20°C/18°C (jour/nuit) avec 100% d'humidité pendant 24 h. La sporulation du pathogène est observée 7 jours après inoculation en plaçant les plantes dans des conditions d'humidité proches de 100%. Les conidies sont récoltées en déposant les feuilles coupées dans de l'eau osmosée et dénombrées avec une cellule de Malassez. Le développement du pathogène est quantifié par le nombre de conidies par gramme de poids frais de feuilles.

2.7.4. Arabidopsis – *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000

Les bactéries sont étalées sur du milieu Luria-Bertani (LB ; Annexe 3) agar et cultivées 48 h à 19°C. Les bactéries sont ensuite suspendues dans de l'eau distillée afin d'atteindre une densité optique de 0,1 (mesurée à 600 nm), puis placées sur agitation en présence de Silwet L-77 (200µl/L ; 0,02% (v/v)) pendant 20 min. La solution est pulvérisée sur les plantes d'Arabidopsis âgées de 2 semaines. Trois à cinq jours après l'inoculation, les parties aériennes de chaque génotype d'Arabidopsis sont prélevées et placées dans une plaque 24 puits contenant chacun 500 µl d'eau distillée additionnée de Silwet L-77 0,02%, sur agitation pendant 2 h à 200 rpm à 28°C. Des dilutions en cascades sont ensuite réalisées dans une plaque 96 puits et les solutions bactériennes sont déposées à l'aide d'un réplicateur de plaques sur des boîtes de Pétri carrées

quadrillées contenant du LB agar additionné de rifampicine (50 µg/ml) et kanamycine (100 µg/ml). Les boîtes sont incubées pendant 48 h à 25°C et les colonies sont comptées.

2.8. Détection des différents métabolites de défense

2.8.1. Analyse des métabolites chez Arabidopsis

Pour déterminer les variations de concentrations de JA, SA, SAG (SA glucosylé) et camalexine lors de l'inoculation, les feuilles des plantes infectées ou non par *B. cinerea* d'Arabidopsis ont été recueillies et congelées immédiatement dans de l'azote liquide. Avant l'extraction, un mélange d'étalons internes contenant 100 ng d'acide dihydrojasmonique, de d6-SA et de propyl-parabène a été ajouté. Du tissu lyophilisé (0,05 g) a été homogénéisé dans 2,5 ml d'eau ultrapure. Après centrifugation (5 000 g, 40 min), le surnageant est repris avec de l'éther diéthylique, comme décrit dans Flors et al. (2008). La phase organique séchée a été remise en solution dans 1 ml de mélange eau/méthanol (90:10) et une aliquote a été injectée dans le système HPLC. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un système HPLC Waters Alliance 2690 (Milford, Massachusetts, États-Unis) et d'une colonne en phase inverse Nucléosil ODS (100 x 2 mm id; 5 ml; Scharlab, Barcelone, Espagne; http: // www.scharlab.es). Le système chromatographique a été connecté à une interface Quatro LC (quadripole hexapole quadrupol; http://www.micromass.co.uk). Les quantifications des métabolites ont été effectuées avec le logiciel Mass Lynx (v 1.4, Mycromass) en utilisant les standards internes comme référence et les courbes standard en tant que quantificateurs.

2.8.2. Dosage du resvératrol chez la vigne

A différents temps de traitement, des aliquotes de 2 ml de suspensions cellulaires sont prélevées et filtrées sur des filtres GF/A. Les filtrats sont directement analysés par chromatographie (ultra HPLC, Waters, Milford, MA, USA) comme décrit par Boutegrabet et al. (2011). Chaque échantillon de 10 µl est chargé sur une colonne BEH C-18 (Waters, Eschborn, Germany) équilibrée avec un mélange d'eau/acétonitrile/acide formique (100/10/0,1 ; v/v/v) et d'acétonitrile (100%). Le resvératrol est élué par gradient linéaire de 0 à 42% d'acétonitrile avec un débit de 0,65 ml/min. Le resvératrol est quantifié grâce à des courbes d'étalonnage réalisées avec un standard, par détection

fluorimétrique (λex = 330 nm, λem = 400 nm) et les caractéristiques chromatographiques des métabolites ont été calculées à l'aide du logiciel Waters Empower.

2.8.3. Quantification de la production de callose chez Arabidopsis

Après traitement ou infection par *B. cinerea*, les feuilles d'Arabidopsis sont plongées pendant une nuit dans du méthanol absolu pour fixer les tissus et solubiliser les pigments chlorophylliens. Les feuilles sont ensuite transférées durant une demi-journée dans l'hydrate de chloral (2,5 mg/ml) pour décolorer les tissus. Après rinçage au tampon phosphate (Na_2HPO_4 0,1 M, pH 8), les feuilles sont colorées pendant une nuit au bleu d'aniline (0,05% dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 8) et montées entre lame et lamelle avant observation au microscope à épifluorescence (Leica DMRB, λ_{ex} 340 nm - 380 nm, λ_{em} 425 nm). Le dépôt de callose a été quantifié comme le ratio entre le nombre de pixels bleus correspondant à la callose et le nombre total de pixels du champ observé, en utilisant le seuil automatique « Shanbhag » du logiciel ImageJ.

2.9. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est observée en utilisant un colorant vital, le Di-Acétate de Fluorescéine (DAF) qui, de nature lipophile, pénètre dans les cellules à travers la membrane plasmique. Lorsque la cellule est vivante, ses estérases hydrolysent le DAF et libèrent alors la fluorescéine acide fluorescente non lipophile. Après 24 heures de traitement à l'eau ou avec les différents éliciteurs, 500 µl de cellules ont été incubées avec le DAF solubilisé dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO, 20 µg/ml). L'observation en microscopie à épifluorescence (λ_{ex} 450-490 nm, λ_{em} 515 nm) permet de mettre en évidence des cellules vivantes marquées en vert par le fluorophore. Les cellules incolores sont considérées comme mortes. La viabilité cellulaire est évaluée par observation de 1000 cellules par condition.

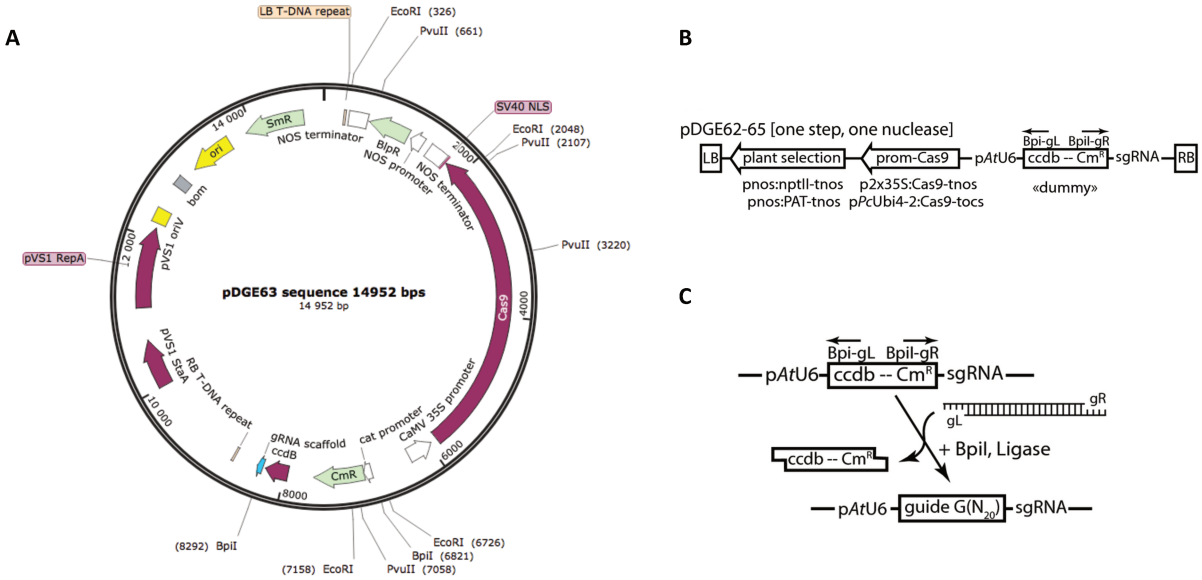


Figure 24: Carte génétique du vecteur pDGE63.

A. Carte de restriction du plasmide pDGE63 établie à partir du logiciel Snapgene.

B. Schéma simplifié de la série des vecteurs pDGE62-65 incluant le vecteur pDGE63 (Ordon et al., 2017).

C. Principe de clonage des oligonucléotides guides par Golden Gate (Ordon et al., 2017).

2.10. Effet anti fongique sur la croissance *in vitro* de *B. cinerea*

Une suspension de 2.10^5 conidies/ml contenue dans du PDB (6 g/l, Difco) est incubée à température ambiante avec de l'eau ou des solutions de Xh à différentes concentrations, préalablement stérilisées avec des filtres Millex 0,22 µm stériles (Sigma). La croissance du mycélium est évaluée en mesurant la densité optique à 492 nm toutes les deux heures pendant 58 h à l'aide d'un lecteur de plaques (Bioscreener).

2.11. Stratégie d'édition génomique par CRISPR-Cas9

2.11.1. Clonage d'oligonucléotide

Dix µM d'oligonucléotides correspondant à la région ciblée des gènes *ARK* d'Arabidopsis sont dénaturés à 98°C pendant 5 min puis dilués à 50 nM (50 fmol/µl). Le clonage des oligonucléotides dans le vecteur de destination pDGE63 (Figure 24 A, B; pDGE Dicot Genome Editing Kit, Addgene ; Ordon et al., 2017) se fait par recombinaison de type Golden Gate (Figure 24 C) en mélangeant 2 µl de plasmide pDGE63 à 100 ng/µl, 1 µl d'oligonucléotides à 50 fmol/µl, 5 µl de tampon de ligation (2X, New England Biolabs), 1 µl de SAB à 1mg/ml, 0,5 µl d'enzyme de restriction *BpiI* (1U/µl, New England Biolabs), 0,5 µl d'enzyme T4 DNA ligase (1U/µl, NEB) dans les conditions suivantes : 29 cycles de 2 min à 37°C et 5 min à 16°C, 10 min à 50°C et 10 min à 80°C.

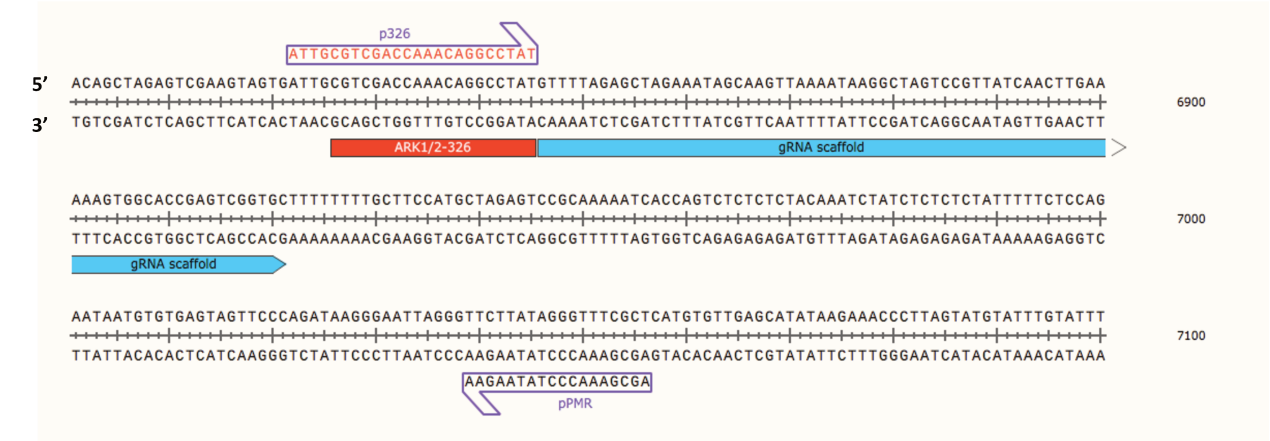
2.11.2. Transformation d'ADN plasmidique dans *E. coli*

Cinquante µl de bactéries *E. coli* compétentes *ccdb* survival ou TOP10 (Invitrogen) sont incubées en présence de 2 ng des plasmides natifs ou recombinants, sur la glace pendant 30 min avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 30 sec. Elles sont ensuite incubées dans 250 µl de milieu riche *Super Optimal Broth with Catabolite repression* (SOC ; Annexe 4) sous agitation (180 rpm) à 37°C pendant 1 h. Deux cent µl de la transformation sont étalées sur milieu LB agar supplémenté avec l'antibiotique spectinomycine (100 µg/ml) et incubés une nuit à 37°C. L'extraction des plasmides sur des colonies isolées est réalisée à l'aide du kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN est ensuite dosé et digéré par l'enzyme de restriction *PvuII* (§2.13.2) afin de vérifier les cartes de

	Séquences des amorces 5’ – 3’	
Noms	**Sens**	**Antisens**
pPMR	AGCGAAACCCTATAAGAA	-
p326	ATTGCGTCGACCAAACAGGCCTAT	AAACATAGGCCTGTTTGGTCGACG
p337	ATTGTGGTCGACGAATATAACCGG	AAACCCGGTTATATTCGTCGACCA
pARK1	CCCGCATCAAGTTCGCG	GGAGTCTCTGAGCAAGAAATTACC
pARK2	CCGACTCAAGTTCACGTTGG	CGAAACTCTGCCACAAAAATCC

Tableau 7: Séquences des amorces utilisées lors des différentes étapes de vérification de l’édition génomique par CRISPR-Cas9.

A



B

Figure 25: Localisation des amorces pPMR, p326 et p337 sur les séquences des plasmides recombinants pDGE63-326 (A) et pDGE63-337 (B) à l’aide du logiciel Snapgene (www.snapgene.com).
En rouge et en violet sont représentées les séquences des ARNg ARK1/2-326 et ARK1/2-337 respectivement.

restriction. Le séquençage des constructions a été réalisé chez ATGC Biotech à l'aide des amorces pPMR (AGCGAAACCCTATAAGAA).

2.11.3. Digestion enzymatique

Les digestions enzymatiques sont réalisées à l'aide de deux enzymes de restriction : *EcoRI* (Invitrogen) et *PvuII* (New England Biolabs) dans les conditions suivantes : 1 µg d'ADN plasmidique, 2,5 µl de tampon 10X, 1 µl d'enzyme (20 U/µl) dans un volume final de 20 µl à 37°C pendant 1 h. L'ADN digéré est séparé sur gel d'agarose 1% puis révélé sous ultra-violets après coloration au bromure d'éthidium.

2.11.4. Transformation des Agrobactéries compétentes

Un µg de plasmide est ajouté à 100 µl d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 compétentes et ces dernières sont congelées dans l'azote liquide pendant 5 min avant de subir un choc thermique à 37°C durant 5 min. Les bactéries sont placées sur la glace pendant 3 min puis incubées 3 h à 28°C sous agitation. Après centrifugation, le culot de bactéries est repris dans 100 µl de milieu *Yeast Extract Peptone* (YEP ; Annexe 5) avant d'être étalé sur boîte de Pétri contenant du milieu YEP additionné de 100 µg/ml de spectinomycine, 50 µg/ml de rifampicine et 25 µg/ml de gentamicine et incubé à 28°C pendant 2 jours. Trois colonies par construction sont isolées et cultivées à 28°C sous agitation (180 rpm) dans un milieu LB additionné de 100 µg/ml de spectinomycine, 50 µg/ml de rifampicine et 25 µg/ml de gentamicine.

2.11.5. Vérification des transformants par PCR sur colonies

Une partie d'une colonie d'*A. tumefaciens* (§2.13.5) est bouillie à 95°C pendant 5 min. Une PCR de vérification est réalisée à l'aide de 5 µl de la préparation précédente d'*A. tumefaciens*, 5 µl de 5X Green Buffer (Promega), 0,5 µl de dNTP 10 mM, 1 µl d'amorces 10 µM spécifiques aux constructions (Tableau 7, Figure 25) et 0,125 µl d'enzyme GoTaq (Promega) dans un volume final de 25 µl dans les conditions suivantes : 3 min à 95°C, 34 cycles de 3 étapes de 30 sec à 95°C, 30 sec à 57°C et 1 min à 72°C et une étape finale de 10 min à 72°C. L'ADN amplifié est séparé sur gel d'agarose 1% puis révélé sous ultra-violets après coloration au bromure d'éthidium.

2.11.6. Transformation des plantes d'Arabidopsis par la méthode de « floral dip »

Les plantes d'Arabidopsis destinées à être transformées par *A. tumefaciens* sont en floraison et la hampe florale principale a été préalablement coupée de manière à privilégier l'apparition d'hampes florales secondaires. La transformation se fait selon le protocole adapté de Clough and Bent (1998). Les suspensions d'*A. tumefaciens* provenant de la culture de 24 h en milieu LB (additionné de 100 µg/ml de spectinomycine, 50 µg/ml de rifampicine et 25 µg/ml de gentamicine ; §2.11.4) sont centrifugées afin de reprendre le culot à une densité optique de 0,8 à 600 nm dans une solution contenant du saccharose 5%, du Silwet L-77 0,02% et de l'acétosyringone 200 µM. Après 2 h d'agitation des bactéries (180 rpm), les hampes florales d'Arabidopsis sont trempées dans la suspension d'*A. tumefaciens* pendant quelques secondes puis placées dans une mini serre fermée à l'abri de la lumière pendant 48 h. Les plantes sont ensuite cultivées en jour long (16 h de jour à 22°C et 8 h de nuit à 20°C) jusqu'à l'obtention de graines. Trois plantes ont été transformées pour chaque construction.

2.11.7. Sélection des plantes transformées

Les graines issues des plantes transformées par *A. tumefaciens* sont stérilisées (SDS 0,05% + éthanol 70% pendant 10 min suivi d'un rinçage à l'éthanol 95% pendant 3 min) puis sechées et semées sur boîtes contenant du MS/2 additionné de 1% (m/v) de saccharose et de 50 µg/ml de glufosinate-ammonium (Sigma). Les boîtes sont placées dans une chambre de culture climatisée dans les conditions suivantes : 10 h de jour à 20°C avec une intensité lumineuse de 100 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, 14 h de nuit à 18°C. Les plantes résistantes au glufosinate sont transférées sur des mottes de tourbes (Jiffy-7) avant extraction d'ADN génomique puis séquençage au niveau du site théorique de coupure par la Cas9.

CHAPITRE III : PERCEPTION DES CHITO-OLIGOSACCHARIDES CHEZ LA VIGNE

1. Résumé de la publication

1.1. Résultats principaux

La chitine est un homopolymère de β-1,4-N-acétyl-glucosamines trouvé notamment dans la paroi des champignons. La chitine et ses dérivés oligosaccharidiques tels que le chitosan, dérivé déacétylé de chitine, peuvent induire des réponses de défenses chez les dicotylédones et les monocotylédones (Aziz et al., 2006; Povero et al., 2011; Shibuya and Minami, 2001). Le mécanisme de perception de la chitine a d'abord été caractérisé chez le riz avec l'identification du complexe moléculaire composé d'OsCEBiP (chitin-elicitor binding protein ; Kaku et al., 2006) et d'OsCERK1 (chitin elicitor receptor kinase ; Hayafune et al., 2014; Shimizu et al., 2010). Chez Arabidopsis, AtCERK1, un homologue d'OsCERK1, joue un rôle crucial dans la perception de la chitine (Miya et al., 2007).

Nos résultats ont montré que la chitine et le chitosan induisent différentes réponses immunitaires chez la vigne (*Vitis vinifera*), suggérant l'existence d'un récepteur associé. En utilisant la séquence peptidique d'AtCERK1, la famille des gènes LysM receptor-like kinases (LysM-RLK) a été caractérisée chez la vigne. Une analyse phylogénétique a permis d'identifier 3 gènes candidats, nommés *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* et *VvLYK1-3*, appartenant au même clade qu'AtCERK1 et OsCERK1. Nos résultats montrent que *VvLYK1-1* et *VvLYK1-2* sont capables de réaliser la complémentation fonctionnelle du mutant *Atcerk1*, puisqu'ils restaurent la phosphorylation des MAPK et l'expression du gène de défense *FRK1* induit par la chitine et le chitosan. De plus, l'expression de VvLYK1-1 chez le mutant *Atcerk1* restaure la résistance à la pénétration d'*Erysiphe necator*, l'agent de l'oïdium de la vigne.

Ces résultats nous ont ainsi permis d'identifier 2 récepteurs indépendants participant à la perception de la chitine et du chitosan chez la vigne, dont VvLYK1-1 qui joue aussi un rôle dans la résistance basale à la pénétration d'*Erysiphe necator*. Ils ont

été acceptés pour publication dans Plant Biotechnol. J. (https://doi.org/10.1111/pbi.13017).

Plant Biotechnology Journal

Plant Biotechnology Journal (2018), pp. 1–14 doi: 10.1111/pbi.13017

The grapevine (*Vitis vinifera*) LysM receptor kinases VvLYK1-1 and VvLYK1-2 mediate chitooligosaccharide-triggered immunity

Daphnée Brulé[1,†], Clizia Villano[2,†], Laura J. Davies[3], Lucie Trdá[1], Justine Claverie[1], Marie-Claire Héloir[1], Annick Chiltz[1], Marielle Adrian[1], Benoît Darblade[4], Pablo Tornero[5], Lena Stransfeld[6], Freddy Boutrot[6], Cyril Zipfel[6], Ian B. Dry[3,*] and Benoit Poinssot[1,*]

[1]*Agroécologie, Agrosup Dijon, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, CNRS ERL 6003, Dijon, France*
[2]*University of Naples Federico II, Portici, Naples, Italy*
[3]*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Adelaide, SA, Australia*
[4]*Elicityl, Crolles, France*
[5]*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain*
[6]*The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, UK*

Received 30 April 2018; accepted 23 September 2018.
**Correspondence* (Tel +33 380 693 458; fax +33 380 693 753; email benoit.poinssot@inra.fr and Tel +61 8 83038632; email ian.dry@csiro.au)
†Both authors contributed equally.

Keywords: pathogen-associated molecular pattern, pattern recognition receptor, *Vitis vinifera*, immune responses, *Erysiphe necator*, resistance.

Summary

Chitin, a major component of fungal cell walls, is a well-known pathogen-associated molecular pattern (PAMP) that triggers defense responses in several mammal and plant species. Here, we show that two chitooligosaccharides, chitin and chitosan, act as PAMPs in grapevine (*Vitis vinifera*) as they elicit immune signalling events, defense gene expression and resistance against fungal diseases. To identify their cognate receptors, the grapevine family of LysM receptor kinases (LysM-RKs) was annotated and their gene expression profiles were characterized. Phylogenetic analysis clearly distinguished three *V. vinifera* LysM-RKs (VvLYKs) located in the same clade as the *Arabidopsis* CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (AtCERK1), which mediates chitin-induced immune responses. The *Arabidopsis* mutant *Atcerk1*, impaired in chitin perception, was transformed with these three putative orthologous genes encoding VvLYK1-1, -2, or -3 to determine if they would complement the loss of AtCERK1 function. Our results provide evidence that VvLYK1-1 and VvLYK1-2, but not VvLYK1-3, functionally complement the *Atcerk1* mutant by restoring chitooligosaccharide-induced MAPK activation and immune gene expression. Moreover, expression of *VvLYK1-1* in *Atcerk1* restored penetration resistance to the non-adapted grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). On the whole, our results indicate that the grapevine VvLYK1-1 and VvLYK1-2 participate in chitin- and chitosan-triggered immunity and that VvLYK1-1 plays an important role in basal resistance against *E. necator*.

1.2. Ma contribution à l'étude

Ces travaux ont débuté avant mon arrivée au laboratoire, durant la thèse de Lucie Trdá et ont été poursuivis par Daphnée Brulé, en collaboration avec les équipes de Cyril Zipfel (Royaume Uni), Ian Dry (Australie) et Pablo Tornero (Espagne). J'ai participé à cette étude en réalisant différentes répétitions biologiques, notamment des western blot et des qPCR mais également en apportant une aide technique lors des tests de résistance contre les différents agents pathogènes. J'ai aussi réalisé les expériences complémentaires de mesure de la production d'H_2O_2 sur disques foliaires.

2. Publication 1

The grapevine (*Vitis vinifera*) LysM receptor kinases VvLYK1-1 and VvLYK1-2 mediate chitooligosaccharide-triggered immunity.

[1]Daphnée Brulé[*], [2]Clizia Villano[*], [3]Laura J. Davies, [1]Lucie Trdá, [1]Justine Claverie, [1]Marie-Claire Héloir, [1]Annick Chiltz, [1]Marielle Adrian, [4]Benoît Darblade, [5]Pablo Tornero, [6]Lena Stransfeld, [6]Freddy Boutrot, [6]Cyril Zipfel, [3]Ian B. Dry✉, [1]Benoit Poinssot✉.

[1]Agroécologie, Agrosup Dijon, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, CNRS ERL 6003, Dijon, France.

[2]University of Naples Federico II, Portici, Naples, Italy.

[3]Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Adelaide, South Australia, Australia.

[4]Elicityl, 746 avenue Ambroise Croizat, Crolles, France.

[5]Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain.

[6]The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom.

* Both authors contributed equally. ✉Corresponding authors: benoit.poinssot@inra.fr and Ian.Dry@csiro.au

Plant Biotechnol J. 2018 Sep 26. doi: 10.1111/pbi.13017.

Summary

Chitin, a major component of fungal cell walls, is a well-known pathogen-associated molecular pattern (PAMP) that triggers defense responses in several mammal and plant species. Here we show that two chitooligosaccharides, chitin and chitosan, act as PAMPs in grapevine (*Vitis vinifera*) as they elicit immune signaling events, defense gene expression, and resistance against fungal diseases. To identify their cognate receptors, the grapevine family of LysM receptor kinases (LysM-RKs) was annotated and their gene expression profiles characterized.

Phylogenetic analysis clearly distinguished three V. vinifera LysM-RKs (VvLYKs) located in the same clade as the Arabidopsis CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (AtCERK1), which mediates chitin-induced immune responses. The Arabidopsis mutant *Atcerk1*, impaired in chitin perception, was transformed with these three putative orthologous genes encoding VvLYK1-1, -2 or -3 to determine if they would complement the loss of AtCERK1 function.

Our results provide evidence that VvLYK1-1 and VvLYK1-2, but not VvLYK1-3, functionally complement the *Atcerk1* mutant by restoring chitooligosaccharide-induced MAPK activation and immune gene expression. Moreover, expression of VvLYK1-1 in *Atcerk1* restored penetration resistance to the non-adapted grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*).

On the whole, our results indicate that the grapevine VvLYK1-1 and VvLYK1-2 participate in chitin- and chitosan-triggered immunity and that VvLYK1-1 plays an important role in basal resistance against *E. necator*.

Key words: Chitooligosaccharides, pathogen-associated molecular pattern (PAMP), pattern recognition receptor (PRR), Vitis vinifera, immune responses, powdery mildew, *Erysiphe necator*, resistance.

Introduction

Plants are constantly exposed to potentially pathogenic microbes such as bacteria, fungi, oomycetes or viruses. However, plants have developed effective immune systems triggering various defense reactions against invading pathogens upon the perception of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs; Dodds and Rathjen, 2010). The recognition of these conserved microbial signatures is mediated by pattern recognition receptors (PRRs), which also detect plant endogenous molecules released by hydrolytic enzymes during interaction with the pathogen, and called damage-associated molecular patterns (DAMPs; Boller and Felix, 2009; Boutrot and Zipfel, 2017). PRRs have a characteristic structure defined by the presence of a ligand-binding ectodomain, a single transmembrane domain and, for some of them, an intracellular kinase domain. The structure of the ectodomain determines binding specificity: PRRs containing a leucine-rich repeat ectodomain mostly bind peptides, such as flagellin or elongation factor Tu (EF-Tu) from bacteria, whilst lysine motif (LysM)-containing PRRs preferentially bind carbohydrates such as chitin or peptidoglycans from fungi and bacteria, respectively (Boutrot and Zipfel, 2017; Trdá et al., 2015). PAMP perception by PRRs leads to PAMP-triggered immunity (PTI), which is characterized by a wide range of defense responses including the production of reactive oxygen species (ROS), calcium influx, mitogen- activated protein kinase (MAPK) phosphorylation and expression of defense-related genes (Yu et al., 2017).

Several distinct microbial patterns are composed from *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues, including fungal chitin or bacterial peptidoglycan (PGN) present in microbial cell walls (Gust et al., 2012). Chitin, and its derivatives, are representative PAMPs from fungal cell walls known to induce immune responses in both monocots and dicots, indicating the presence of a conserved mechanism to perceive these chitooligosaccharides in a wide range of plant species (Shinya et al., 2015). In plants, chitin elicits a variety of defense responses including the activation of the phenylpropanoid pathway and production of pathogenesis-related (PR) proteins such as peroxidases, chitinases or thaumatin-like proteins (Boller and Felix, 2009; Kaku et al., 2006; Miya et al., 2007). Chitosan, a deacetylated derivative of chitin, is also a potent elicitor of plant immunity (Aziz et al., 2006; Povero et al., 2011). In grapevine, chitosan elicits phytoalexin production, chitinase and glucanase activities leading to resistance

against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*, the causal agents of grey mould and downy mildew, respectively (Aziz et al., 2006).

The mechanism of chitin perception and signaling in plant cells was first characterized in rice with the identification of the chitin-elicitor binding protein, CEBiP (Kaku et al., 2006), which contains three extracellular LysM motifs and is anchored to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor (Gong et al., 2017). Chitin perception in rice triggers the formation of a heterodimer complex between OsCEBiP and OsCERK1, a protein which contains an intracellular kinase domain required for signal transduction. Thus, two LysM proteins are required for chitin perception and signaling in rice (Hayafune et al., 2014; Shimizu et al., 2010). In *Arabidopsis thaliana*, AtCERK1/LYK1, a homolog of OsCERK1, has been shown to play a crucial role in both chitin signaling (Miya et al., 2007; Wan et al., 2008) and bacterial PGN perception (Gimenez-Ibanez et al., 2009; Willmann et al., 2011). Homodimers of AtCERK1/LYK1 were shown to directly bind long chain chitin oligomers (Liu et al., 2012). However, more recent data suggest that other members of the LysM-RK gene family in *Arabidopsis* may also be involved in chitin perception. For example, Cao et al (2014) proposed that AtLYK5 (and/or AtLYK4), which have inactive kinase domains, may be the primary receptors for chitin, and that chitin perception may result in the formation of an AtLYK5-AtLYK1 heterotetramer, triggering intracellular signal transduction.

The majority of commercially grown grapevine cultivars are derived from the species *Vitis vinifera*, which is highly susceptible to cryptogamic diseases, such as downy mildew (*Plasmopara viticola*), grey mould (*Botrytis cinerea*) and powdery mildew (*Erysiphe necator*). These two last pathogens are ascomycete fungi containing chitooligosaccharides in their cell walls. These diseases cause significant losses to viticultural production and control of these pathogens is heavily dependent on frequent fungicide application. The level of fungicide application has serious economic, environmental and potential health implications and has driven research efforts into alternative strategies (Trouvelot et al., 2014; Walters et al., 2013). Among them is the generation of new resistant varieties by introgression of downy and powdery mildew resistance (*R*) genes from wild North American grapevine species (Qiu et al., 2015). However, whilst *R*-gene triggered resistance is very effective at controlling pathogens, widespread use of *R*-genes may impose a selection pressure on parasites to evolve and

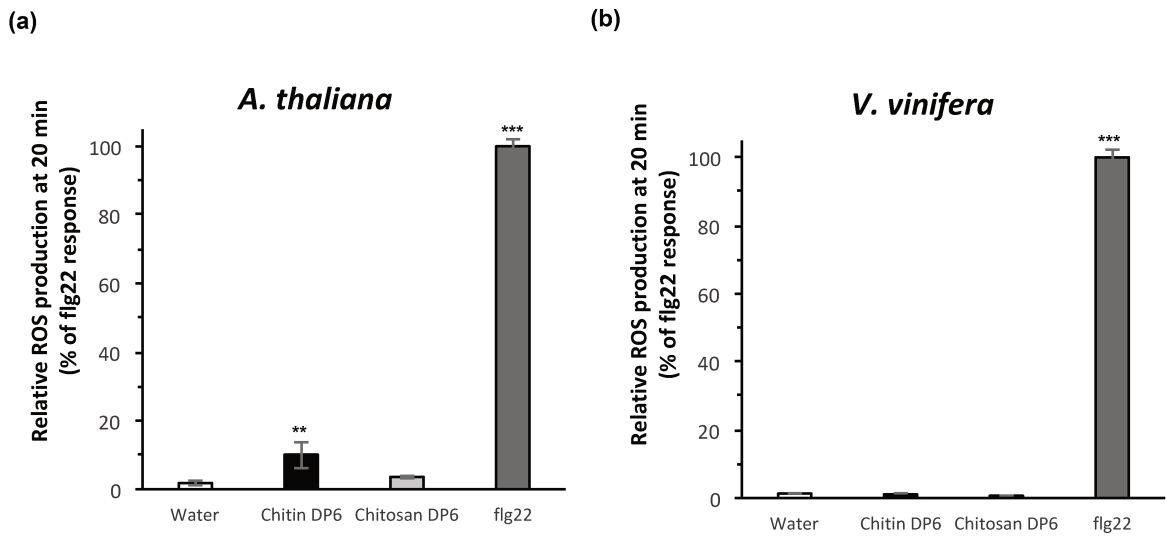


Figure S1: Chitin and chitosan DP6 did not induce similarly ROS production in Arabidopsis and grapevine cells.

Relative H_2O_2 production in **(a)** *A. thaliana* or **(b)** *V. vinifera* cells 20 min post-treatment with chitin DP6 (100 µg mL^{-1}), chitosan DP6 (100 µg mL^{-1}) and flg22 (1 µM) treatments or water (negative control). ROS production was measured by chemiluminescence of luminol according to Trdá et al. (2014) and results are expressed relatively to flg22 (positive control=100%). Values are means ± SE from three independent experiments (n=3). Asterisks indicate a statistically significant difference between control and the elicitor treatment (Tukey's pairwise test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$).

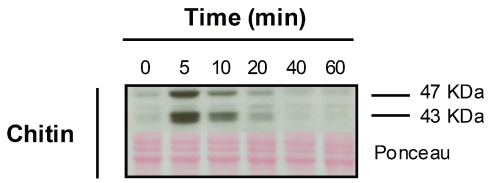


Figure S2: The crab shell chitin also induced defense responses in grapevine cells.

Activation kinetics of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in grapevine cells treated with 100 µg.mL^{-1} of the unpurified crab shell chitin NA-COS-Y (Lloyd et al., 2014). MAPKs were detected by immunoblot with an antibody raised against the human phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (α-pERK1/2). Fifteen µg of proteins were loaded in each lane. Homogeneous loading was checked by Ponceau red staining. This result shows one representative experiment out of three.

evade R protein recognition, thereby compromising the durability of this control strategy (Jones and Dangl, 2006). Thus, characterization of new PRRs in a given plant species by identifying their cognate PAMPs and understanding their involvement in disease resistance may provide more durable and broad-spectrum immunity (Piquerez et al., 2014), notably by promoting a PTI-based crop protection (Boutrot and Zipfel, 2017; Wiesel et al., 2014).

In this study, we have investigated whether two chitooligosaccharides, chitin and chitosan, are active PAMPs in grapevine. We also report on the functional characterization of members of the *VvLYK* gene family, with particular focus on three orthologs of *AtCERK1/LYK1* and *OsCERK1*, designated *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* and *VvLYK1-3*. By functional complementation of the *Arabidopsis Atcerk1* mutant, we demonstrate that *VvLYK1-1* and *VvLYK1-2* are involved in the chitooligosaccharide-induced immune responses in *V. vinifera*. Moreover, *VvLYK1-1* was demonstrated to confer basal resistance against the grapevine powdery mildew *E. necator* when expressed in *A. thaliana*.

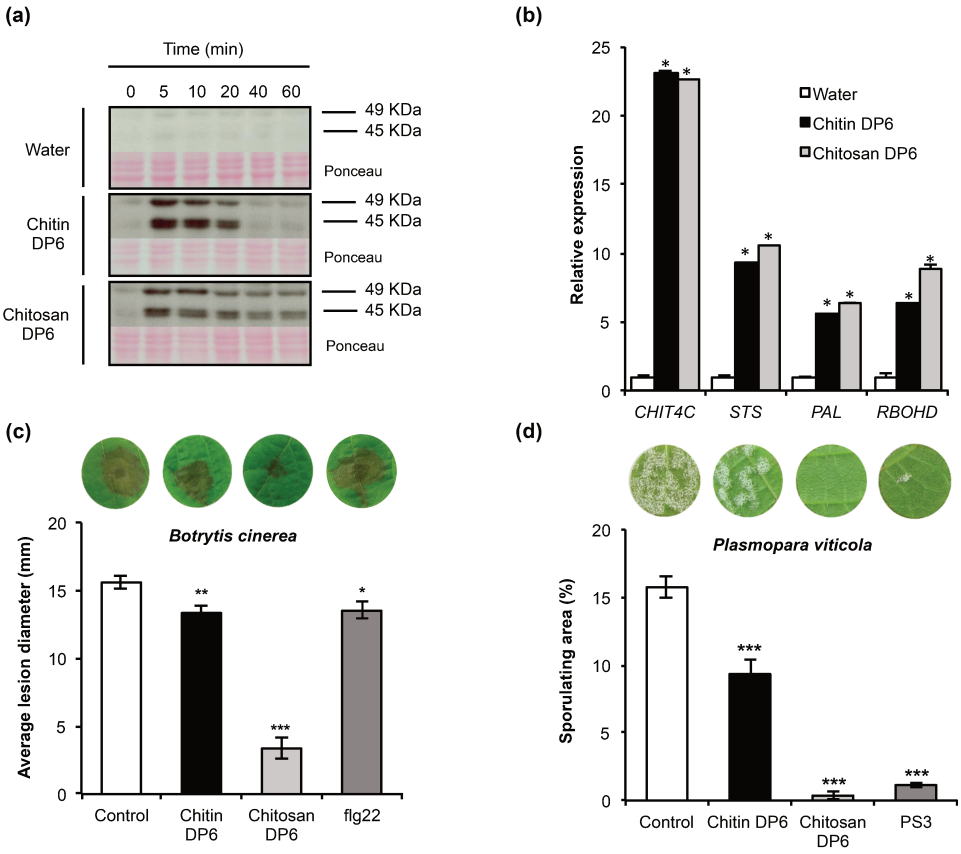


Figure 26: Chitin and chitosan induced defense responses and resistance to pathogens in grapevine.

(**a**) Activation kinetics of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) detected by immunoblotting with an antibody raised against the human phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (α-pERK1/2) in grapevine cells treated with chitin DP6 (100 µg mL^{-1}), chitosan DP6 (100 µg mL^{-1}) or water (negative control). Homogeneous loading was checked by Ponceau red staining. (**b**) Expression of defense genes encoding an acidic chitinase (*Chit4C*), a stilbene synthase (*STS*), a phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) and a respiratory burst oxidase homolog D (*RbohD)* measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 1h post-treatment with chitin DP6 (100 µg mL^{-1}), chitosan DP6 (100 µg mL^{-1}) or water. Values represent the mean of triplicate data ± SE (n=3) from one experiment out of three and data were normalized by the housekeeping gene *EF1α* and compared with water (negative control), set as 1. Asterisks (*) indicate statistically significant differences between water and chitooligosaccharide treatment, using an unpaired heteroscedastic Student's t test ($P<0.05$). (**c**) Development of *B. cinerea* at 3 days post-inoculation (dpi) on grapevine leaf discs treated 48h before with chitin DP6 (1 mg mL^{-1}), chitosan DP6 (1 mg mL^{-1}) or flg22 (10 µM) previously solubilized in Dehscofix 0.1% and compared with control (adjuvant : Dehscofix 0.1%). Values represent the mean of lesion diameters ± SE (n ≥ 36 discs from 3 different plants) from one representative experiment out of three. (**d**) Sporulation caused by *P. viticola* at 8 dpi on grapevine leaf discs treated 48h before inoculation with chitin DP6 (100 µg mL^{-1}), chitosan DP6 (100 µg mL^{-1}) or 2.5 mg mL^{-1} sulfated laminarin (PS3) previously solubilized in Dehscofix 0.1% and compared with control (adjuvant : Dehscofix 0.1%). Sporulating leaf area was evaluated by image analysis Visilog 6.9 software (Kim Khiook et al., 2013). Values represent the mean of percentage of sporulating area ± SE (n=30 discs from 3 different plants) from one representative experiment out of three. Asterisks indicate a statistically significant difference between control and the elicitor treatment (Student's t-test; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$). A representative leaf disc for each treatment is shown. Similar results were obtained in at least three independent experiments.

Results

Chitooligosaccharides trigger immune responses and induced resistance in grapevine

Chitooligosaccharides with a degree of polymerization (DP) ranging from 6 to 8 (hexamer to octamer) are the most effective at triggering ROS production and defense gene expression in rice and *Arabidopsis*, respectively (Miya et al., 2007; Petutschnig et al., 2010). In grapevine, chito-oligosaccharides with a MW of 1500 (*i.e.* DP6) were shown to be the most effective at triggering phytoalexin production and expression of chitinase and glucanase, compared to chitooligosaccharides with a MW of 3000 and 10,000 (*i.e.* DP13-45) (Aziz et al., 2006). In this study, chitooligomers with a DP of 6 were used to test if their perception by grapevine triggers immune responses similar to that commonly observed in *Arabidopsis* or rice. To also investigate the importance of the degree of acetylation (DA), the early signaling events and defense gene expression induced by chitin hexamer (DA 99.9% and DP 6) or deacetylated chitosan hexamer (DA 0.1% and DP 6) were characterized in *V. vinifera* cell suspensions.

Contrary to what has been previously observed in *Arabidopsis* (Albert et al., 2006; Miya et al., 2007), chitin DP6 did not induce any oxidative burst in grapevine cells (Fig. S1) whereas flg22 triggered the expected positive response (Trdá et al., 2014). Similarly, the fully deacetyled chitosan DP6 did not elicit any H_2O_2 production in grapevine cell suspension (Fig. S1).

However, chitin DP6 induced a rapid and transient phosphorylation of two MAPKs with relative molecular masses of 45 and 49 kDa, which was not observed in water-treated control cells (Fig. 26a). Interestingly, chitosan DP6 also activated the phosphorylation of these two MAPKs but for a longer period (Fig. 26a). In parallel, treatment of grapevine cells with unpurified crab shell chitin NA-COS-Y, previously used to elicit ROS production and defense gene expression in *Brassica* species (Lloyd et al., 2014), was also shown to activate these two MAPKs (Fig. S2).

In response to chitooligosaccharide treatment, the expression of defense genes known to be induced by different PAMPs in grapevine (Aziz et al., 2003; Dubreuil-Maurizi et al., 2010; Poinssot et al., 2003; Trdá et al., 2014) was examined by qPCR. One hour post-treatment (hpt), both chitin DP6 and chitosan DP6 markedly induced the

NCBI Gene	NCBI mRNA	NCBI Protein	Previous annotation (Zhang et al. 2009)	Closest Arabidopsis homolog	Suggested new gene name	Gene length[1] (bp)	Expression validated with EST data	Expression validated with RNA-Seq data
LOC100255092	XM_010658923.2	XP_010657225.1	*VvLYK1*	*AtLYK1*	*VvLYK1-1*	1 845	Y	Y
LOC100257218	XM_010657064.2	XP_010655366.1	*VvLYK2*	*AtLYK1*	*VvLYK1-2*	1 878	Y	Y
LOC100262323	XM_010657063.2	XP_010655365.1	*VvLYK3*	*AtLYK1*	*VvLYK1-3*	1 866	Y	Y
LOC100264694	XM_019225274.1	XP_019080819.1	*VvLYK11*	*AtLYK2*	*VvLYK2*	2 028	Y	Y
LOC100256626	XM_002283592.4	XP_002283628.2	*VvLYK12*	*AtLYK3*	*VvLYK3-1*	1 815	Y	Y
LOC100250732	**XM_019219283.1**	**XP_019074828.1**	**Not described**	***AtLYK3***	***VvLYK3-2***	**Unknown**	**No ESTs**	**Incomplete coverage**
LOC100256178	**XM_002272778.4**	**XP_002272814.3**	**Not described**	***AtLYK3***	***VvLYK3-3***	**Unknown**	**2 ESTs**	**Incomplete coverage**
LOC100242712	XM_002269372.3	XP_002269408.1	*VvLYK4*	*AtLYK4*	*VvLYK4-1*	2 037	1 EST	Y
LOC100264999	XM_010650900.2	XP_010649202.1	*VvLYK6*	*AtLYK4*	*VvLYK4-2*	1 947	1 EST	Y
LOC100258108	XM_002277295.4	XP_002277331.3	*VvLYK10*	*AtLYK5*	*VvLYK5-1*	2 167	Y	Y
Not annotated: tBLASTn match on emb AM480420.1	MF939897	New sequence	Not described	*AtLYK5*	*VvLYK5-2*	2 078	Y	Y
LOC100264758	XM_002280034.2	XP_002280070.1	*VvLYK7*	No match	*VVLYK6*	2 200	No ESTs	Y
LOC100259809	**XM_002269436.4**	**XP_002269472.2**	***VvLYK5***	**No match**	***VvLYK7***	**Unknown**	**No ESTs**	**Incomplete coverage**
LOC100248852	**XM_002281844.3**	**XP_002281880.2**	***VvLYK8***	**No match**	***VvLYK8***	**Unknown**	**1 EST**	**Incomplete coverage**
LOC100248488	**XM_002276794.3**	**XP_002276830.3**	***VvLYK9***	**No match**	***VvLYK9***	**Unknown**	**2 ESTs**	**Incomplete coverage**

[1] Gene length based on Cabernet Sauvignon sequence - verified by RNA Seq data. Genes in bold = putative pseudogene

Table S1 : The *Vitis vinifera* VvLYK family contains 15 putative genes in the grapevine genome.

expression of four selected grapevine defense genes (Fig. 26b) encoding an acidic chitinase (*CHIT4C*), a stilbene synthase (*STS*), a phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) and a respiratory burst oxidase homolog D (*RBOHD*).

To further characterize the immune responses triggered by chitooligosaccharides, we also investigated the efficacy of chitin- and chitosan-induced resistance in grapevine. Leaf discs were treated with chitin DP6 and chitosan DP6 for 48 h prior to inoculation with either the necrotrophic fungus *B. cinerea* or with the biotrophic oomycete *P. viticola*. Chitin treatment induced a low but significant resistance against these pathogens (Fig. 26c, d), whilst chitosan treatment significantly reduced *B. cinerea* lesion diameter and *P. viticola* sporulation (Fig. 26c, d). Indeed, the reduced susceptibility to *P. viticola* infection, triggered by chitosan, was comparable to that obtained by pretreatment with the β-1,3-glucan sulfated laminarin (PS3), a potent resistance inducer in grapevine (Gauthier et al., 2014).

Phylogenetic analysis and characterization of grapevine LysM-RKs (VvLYKs)

The results of Fig. 26 demonstrate that grapevine cells are capable of detecting chitooligosaccharides, suggesting the presence of a perception system. To identify the CERK1/LYK1 ortholog(s) in grapevine, genes encoding LysM-RKs were identified from the reference genome of *Vitis vinifera* cv Pinot Noir PN40024 (Jaillon et al., 2007). A previous annotation of VvLYK family based on the 8x grapevine genome predicted 12 gene family members (Zhang et al., 2009). However, our re-annotation of the *VvLYK* gene family, based on the most recent version of the 12x genome, predicts the presence of 15 putative genes encoding VvLYK proteins in the *V. vinifera* genome (Table S1). A maximum-likelihood phylogenetic tree indicated that out of these 15 LysM-RKs, 3 grapevine proteins are located in the same clade as the *Arabidopsis* AtCERK1/LYK1 and the rice ortholog OsCERK1 (Fig. 27a), proteins that have been shown to be involved in chitin perception/signaling. These proteins, designated as VvLYK1-1, VvLYK1-2 and VvLYK1-3, share 60%, 57% and 56% amino acid identity with AtCERK1/LYK1, respectively (Table S2). VvLYK1-1 and VvLYK1-2 also show the highest percentage of amino acid identity with the rice chitin co-receptor OsCERK1 (Table S2).

The expression profile of each putative *VvLYK* gene was analyzed using RNA-Seq and microarray data obtained from time course infection experiments of leaves and

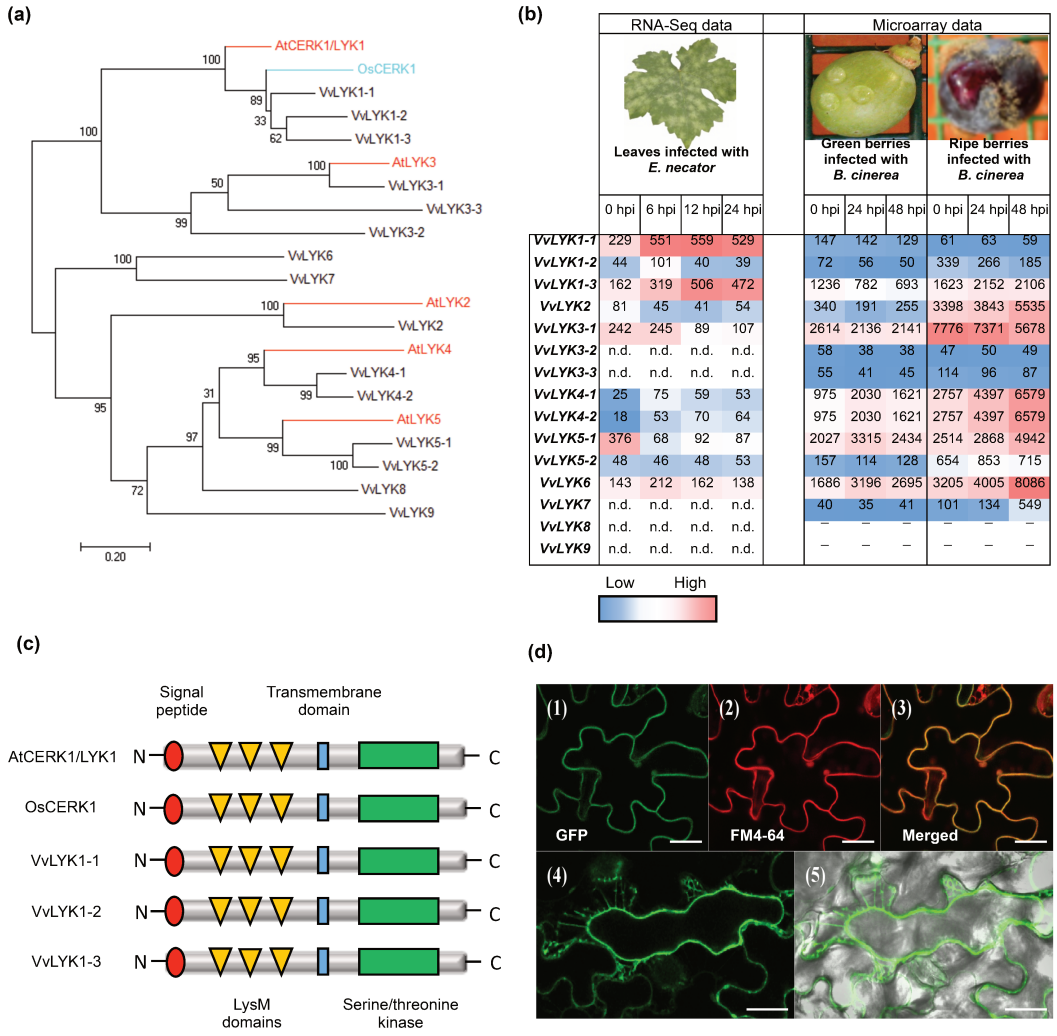


Figure 27: Phylogenetic analysis and characterization of grapevine LysM-RKs (VvLYKs).

(**a**) Maximum-likelihood phylogenetic tree drawn with MEGA 7 (Kumar et al., 2016) showing the relationship between the Arabidopsis proteins AtCERK1/LYK1 and AtLYK2-5 (red), the rice OsCERK1 (blue) and the most similar protein sequences of *Vitis vinifera* (black). Sequences used for the phylogenetic analysis were:

AtCERK1/LYK1 (NP_566689), AtLYK2 (OAP05017), AtLYK3 (NP_175606), AtLYK4 (NP_179957), AtLYK5 (NP_180916), OsCERK1 (A0A0P0XII1), VvLYK1-1 (XP_010657225), VvLYK1-2 (XP_010655366), VvLYK1-3 (XP_010655365), VvLYK2 (XP_019080819), VvLYK3-1 (XP_002283628), VvLYK3-2 (XP_019074828), VvLYK3-3 (XP_002272814), VvLYK4-1 (XP_002269408), VvLYK4-2 (XP_010649202), VvLYK5-1 (XP_002277331), VvLYK5-2 (MF177034), VvLYK6 (XP_002280070), VvLYK7 (XP_002269472), VvLYK8 (XP_002281880) and VvLYK9 (XP_002276830).

(**b**) *VvLYK* expression profiles during *E. necator* or *B. cinerea* infection. Results are expressed as Relative Expression Values. Colour range has been made independently from RNA-Seq or microarray data. (n.d. = no full length transcript detected in RNA Seq; _=no specific probe available in microarray). (**c**) Schematic structure of AtCERK1/LYK1, OsCERK1, VvLYK1-1, VvLYK1-2 and VvLYK1-3 based on the multiple alignment realized with T-coffee (Fig. S2). (**d**) Subcellular localization of VvLYK1-1-GFP in the line *Atcerk1/p35S::VvLYK1-1-GFP*. Leaves of *Arabidopsis thaliana* expressing VvLYK1-1-GFP were incubated with the plasma membrane dye FM4-64. Confocal microscopy imaging revealed the green GFP-tagged VvLYK1-1 (1), the red FM4-64 labelled plasma membrane (2) and the co-localization of both probes in *Arabidopsis* leaves (3). (4) NaCl (1M) induced plasmolysis and confocal microscopy imaging revealed that VvLYK1-1-GFP fluorescence followed the plasma membrane shrinking (5). Bars, 20 µm.

berries with *E. necator* and *B. cinerea* (Kelloniemi et al., 2015), respectively. In response to inoculation with the fungal pathogen *E. necator*, only *VvLYK1-1* and *VvLYK1-3* were clearly up-regulated across the entire 24h period, while *VvLYK1-2* and *VvLYK6* were transiently induced at 6 hpi (Fig. 27b). During *B. cinerea* infection, in the clade of *VvLYK1s* only *VvLYK1-3* was slightly induced in ripe susceptible berries (Fig. 27b). Interestingly, *VvLYK4-1/2* (detected using the same Nimblegen probe), *VvLYK5-1* and *VvLYK6* were strongly up-regulated in berries during infection by *B. cinerea* (Fig. 27b). *VvLYK2* expression is also much higher in ripe berries than green berries, suggesting that it could have an as yet unknown function during grape berry ripening. *VvLYK3-1* seemed to be repressed during the infection by both pathogens. Of note, we found *VvLYK3-2*, *VvLYK3-3*, *VvLYK7*, *VvLYK8* and *VvLYK9* to only be expressed at very low levels or were undetectable in the tissues examined (Fig. 27b). However, we cannot rule out the possibility that these genes are expressed at detectable levels in other tissues, such as roots or flowers, or in response to other biotic stresses.

As AtCERK1 and OsCERK1 are key components that mediate chitin-triggered signaling in *Arabidopsis* (Miya et al., 2007; Wan et al., 2008) and rice (Hayafune et al., 2014; Shimizu et al., 2010), we undertook further analysis of the three putative grapevine orthologs *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* and *VvLYK1-3.* Sequencing of the cloned full-length coding sequences (CDS) from *V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon revealed that genes *VvLYK1-1*, *-2* or *-3* consist of open-reading frames of 1845, 1878 and 1866 bp, respectively (Table S1). All three VvLYK1 proteins contain a similar domain structure with a signal peptide, three extracellular LysM motifs, a single transmembrane domain and a RD-type intracellular kinase domain (Fig. 27c and Fig. S3). Interestingly, the amino acids E110 and E114, shown to be involved in the binding of the N-acetyl moieties of $(GlcNAc)_5$ in AtCERK1/LYK1 (Liu et al., 2012) are mutated in the 3 VvLYK1 proteins (Fig. S3). All three VvLYK1 protein sequences share a high degree of identity (Fig. S3) and the kinase domains of VvLYK1-1 and VvLYK1-2 possess the highest identity with the kinase domains of AtCERK1/LYK1 and OsCERK1 (Fig. S3, Table S2).

All three VvLYK1 proteins have a predicted N-terminal signal peptide (Fig. S3). Confocal analysis of the *Atcerk1* mutant expressing a *VvLYK1-1-GFP* fusion expression construct showed a GFP signal co-localized with the red fluorescence of the plasma membrane-specific probe FM4-64 (Brandizzi et al., 2004) (Fig. 27d). Furthermore, when plasmolysis was triggered by the addition of 1M NaCl, VvLYK1-1-GFP fluorescence

	whole protein sequence		LysM domain		Kinase domain	
	Identity	Similarity	Identity	Similarity	Identity	Similarity
VvLYK1-1 vs AtCERK1	60%	73%	46%	68%	77%	85%
VvLYK1-2 vs AtCERK1	57%	71%	44%	65%	74%	84%
VvLYK1-3 vs AtCERK1	56%	69%	51%	68%	70%	80%
VvLYK1-1 vs OsCERK1	61%	73%	44%	58%	80%	91%
VvLYK1-2 vs OsCERK1	58%	71%	42%	57%	79%	89%
VvLYK1-3 vs OsCERK1	56%	70%	43%	61%	74%	86%

Results were obtained with the NCBI protein BLAST program on the whole protein sequence or the LysM ectodomain or the kinase domain. Protein sequences used: AtCERK1/LYK1 (NP_566689), OsCERK1 (A0A0P0XII1), VvLYK1-1 (XP_010657225), VvLYK1-2 (XP_010655366), VvLYK1-3 (XP_010655365). Lys Motifs (LysM, PF01476) and Kinase domain (PF07714) were annotated with SMART. The signal peptide and the outer juxtamembrane region were not included in each LysM domain.

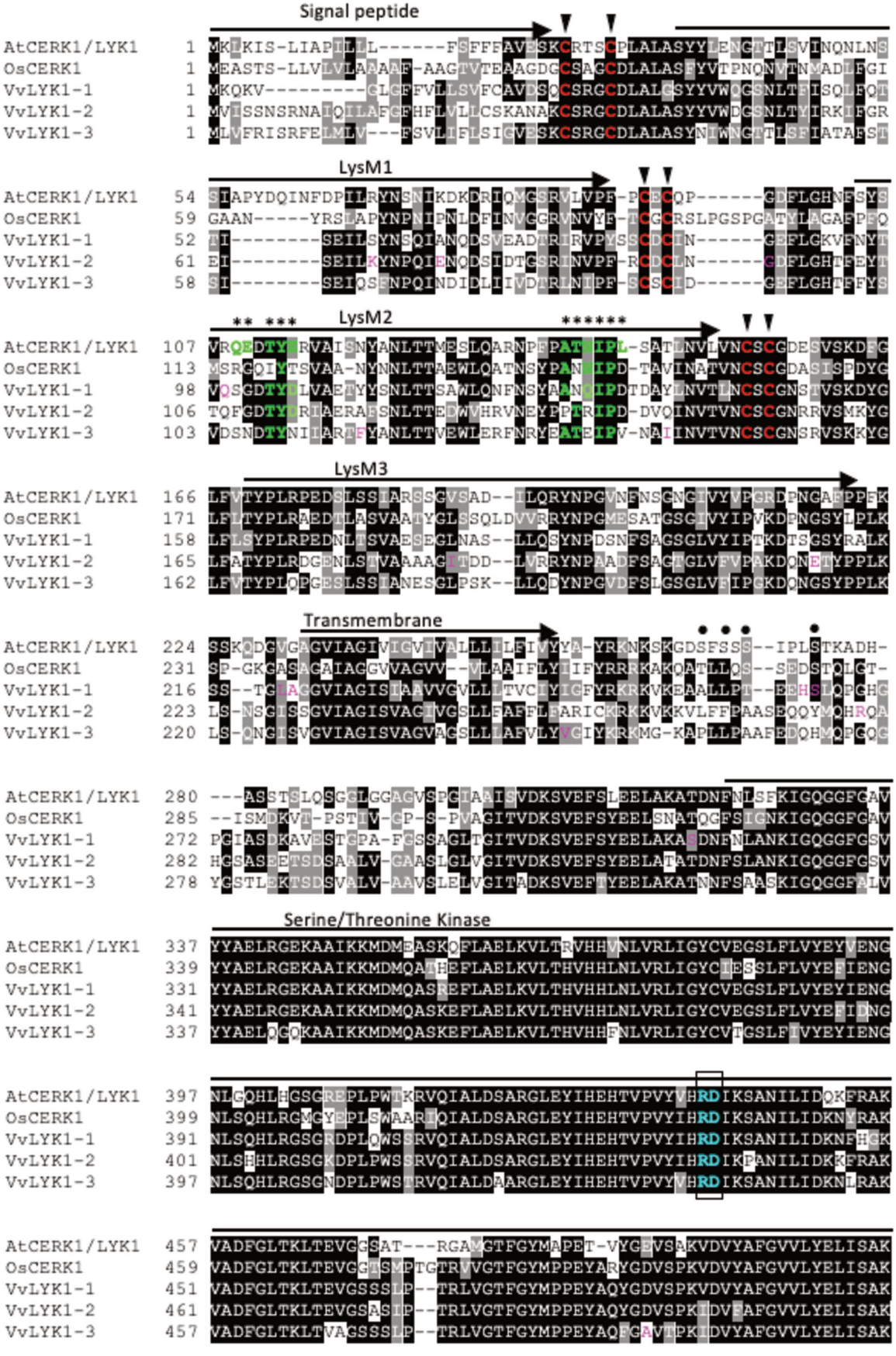
Table S2 : Percentage of amino acid identity or similarity between VvLYK1-1/-2/-3 and AtCERK1/LYK1 or OsCERK1.

followed the movement of the plasma membrane away from the plant cell wall (Fig. 27d). Both observations are consistent with VvLYK1-1 being localized to the plasma membrane.

VvLYK1-1 restores chitin-induced MAPK activation and *FRK1* expression in the *Atcerk1* mutant

To investigate whether VvLYK1-1, VvLYK1-2 or VvLYK1-3 are capable of activating chitooligosaccharide-triggered defenses, expression constructs comprising each native *VvLYK1* coding sequence (i.e. no C-terminal tag) under the control of a constitutive *35S* promoter were introduced into the *Atcerk1* mutant. Semi-quantitative PCR was performed on the leaves of T2 transgenic lines to test for the presence of the *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* or *VvLYK1-3* transcripts. Six transgenic lines were positively identified as expressing the *VvLYK1-1* transgene and five transgenic lines were identified for *VvLYK1-3* (Fig. 28a). However, analysis of five independent transgenic lines, confirmed to contain the *VvLYK1-2* construct by genomic PCR, indicated that transgene expression was either undetectable (lines #2, #12, #14) or at very low levels (lines #5 and #10) compared to *VvLYK1-1* and *VvLYK1-3* transgene expression (Fig. 28a). The failure to positively identify lines highly expressing *VvLYK1-2* suggested that this gene is potentially lethal when expressed under a strong constitutive *35S* promoter. This was confirmed by agro-infiltration of the *p35S::VvLYK1-2* construct into *N. benthamiana* leaves resulting in patchy necrosis after 48 h compared to leaf segments infiltrated with *Agrobacterium* alone (Fig. S4). As *VvLYK1-2* induces necrosis when over-expressed, this suggests that it may have a crucial function in defense and its expression needs to be tightly regulated *in planta*. Based on these results, *Arabidopsis* lines transformed with the *p35S::VvLYK1-2* construct were excluded from complementation analysis using a constitutive expression system.

Transgenic *Atcerk1/p35S::VvLYK1-1* and *Atcerk1/p35S::VvLYK1-3* lines were first examined for restoration of early chitin-induced events by analysing the phosphorylation of MAPKs in two independent lines following treatment with chitin (NA-COS-Y; Lloyd et al., 2014) for 10 min prior to protein extraction. Figure 3b shows that chitin treatment triggered the phosphorylation of two MAPKs, with relative molecular weights of 43 and 47 kDa, in WT Col-0 seedlings but no MAPK


Signal peptide
LysM1
LysM2
LysM3
Transmembrane
Serine/Threonine Kinase
AtCERK1/LYK1
OsCERK1
VvLYK1-1
VvLYK1-2
VvLYK1-3

phosphorylation was observed in *Atcerk1*, in agreement with the previous report of Miya et al. (2007). Chitin-induced MAPK activation was restored in the two independent *p35S::VvLYK1-1* lines *#2* and *#5* (Fig. 28b) but no MAPK phosphorylation was detected in protein samples extracted from the two independent *p35S::VvLYK1-3* lines #1 and #2 (Fig. 28b).

The expression of the defense gene encoding flagellin-induced receptor kinase 1 (*FRK1)* was also investigated 2 h after chitin treatment. Chitin induced a high level of expression of *FRK1* in WT Col-0 that was totally suppressed in the *Atcerk1* mutant (Fig. 28c). *FRK1* expression was partly restored in the two *p35S::VvLYK1-1* lines *#2* and *#5*, but remained close to the basal level in the two *p35S::VvLYK1-3* lines *#1 and #2* (Fig. 28c). Taken together, these results indicate that over-expression of *VvLYK1-1* can restore chitin-triggered immune responses in *Atcerk1* but *VvLYK1-3* cannot.

VvLYK1-1 expression restores penetration resistance in *Atcerk1* against the non-adapted powdery mildew *Erysiphe necator*

In addition to testing for complementation of MAPK activation and defense gene expression, the ability of *VvLYK1-1* and *VvLYK1-3* to restore resistance against a non-adapted grapevine powdery mildew pathogen in the *Atcerk1* mutant was also determined. *Arabidopsis thaliana* is a non-host for the fungus *E. necator*. Although a proportion of *E. necator* spores placed onto a Col-0 leaf will successfully penetrate the epidermal cell wall and form a haustorium under the first appressorium, the pathogen is unable to complete its life cycle on this host (Feechan et al., 2013).

Fig. 29a shows that the *Atcerk1* mutant is significantly more susceptible to penetration by *E. necator* than the WT Col-0, showing the important role of AtCERK1 in non-host resistance against non-adapted powdery mildew species. More precisely, the penetration rate of WT Col-0 leaves by *E. necator* spores ranged from 35-43 % with a mean at 39 % whereas in the *Atcerk1* mutant, the penetration rates ranged from 76-88% with a mean of 82% which approaches the rate of penetration by the adapted powdery mildew species *E. cichoracearum* on Col-0 (Feechan et al., 2013). Constitutive expression of *VvLYK1-1* in the *Atcerk1* mutant significantly reduced the mean penetration rates of *E. necator* in the leaves of all *Atcerk1/p35S::VvLYK1-1* lines to levels comparable to the penetration rates on WT Col-0 plants (31 to 40%; Fig. 29a). As additional negative

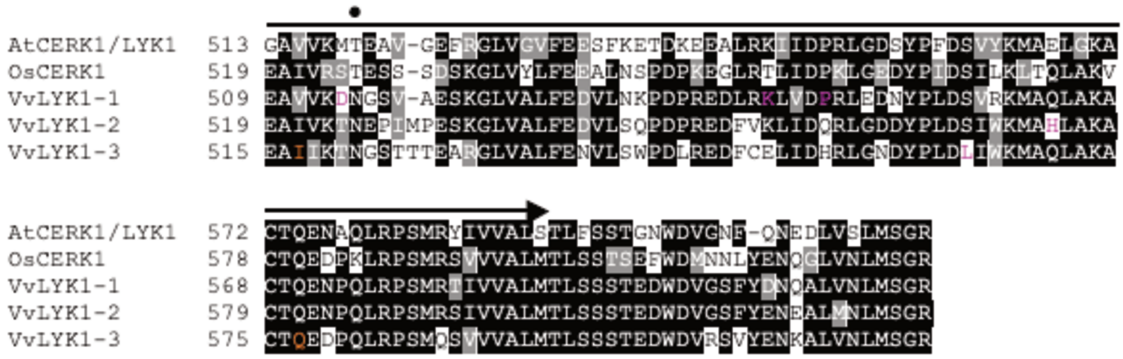


Figure S3 : Alignment of AtCERK1/LYK1, the rice OsCERK1 and its putative orthologs in grapevine (VvLYK1-1/-2/-3).

Protein sequences were aligned with T-Coffee. Black and gray shading representing identical and positive amino acids, respectively, was visualized with Boxshade. The predicted signal peptide, the lysin motifs (LysM), the transmembrane region and the serine/threonine (S/T) kinase are shown. The residues of the chitin-binding site in AtCERK1/LYK1 LysM2 are indicated by asterisks and their conservation is highlighted in the grades of green. The residues E110, E114 and I141 bind to N-acetyl moieties of $(GlcNAc)_5$, while Q109, T112, Y113, A138, T139, N140, P142 and L143 interact with hydroxyl and hydroxymethyl groups of glucose part (Liu *et al.*, 2012). Conserved Cys residues (in red) form disulfide bridges (indicated by arrows). The RD type of kinase is highlighted in blue. SNPs between the NCBI reference sequence from *V. vinifera* cv Pinot Noir (PN40024) and cv Cabernet-Sauvignon are highlighted in purple (VvLYK1-1: Q99H, L220I, A221S, H264Q, S265T, S313T, D514E, K543R, P547A; VvLYK1-2: K67T, E73K, G95R, I186V, E216G, R279G, H574Q; VvLYK1-3: F116Y, I142L, V250A, A493E, L564F) or in orange when compared to cv Gamay (VvLYK1-1: no SNP; VvLYK1-2: no SNP; VvLYK1-3: -224A, V250A, A493E, I517V, Q577L). Residues S266, S268, S270, S274 and T519 (indicated by ●) were found to be phosphorylated in AtCERK1/LYK1 after chitin treatment (Petutschnig *et al.*, 2010). A: Ala, C:Cys, D:Asp, E:Glu, F:Phe, G:Gly, H:His, I:Ile, K:Lys, L:Leu, M:Met, N:Asn, P:Pro, Q:Gln, R:Arg, S:Ser, T:Thr, V:Val, W:Trp, Y:Tyr.

controls, T2 lines #3 and #4 that had been generated through the same transformation procedure but had lost the introduced *VvLYK1-1* transgene through segregation, showed mean penetration rates of *E. necator* similar to *Atcerk1* (77 to 80%; Fig. 29a). This demonstrates that the complementation of penetration resistance in the *Atcerk1/p35S::VvLYK1-1* lines is a result of *VvLYK1-1* expression and is not related to the transformation process. In contrast, expression of *VvLYK1-3* in the five independent *Atcerk1/VvLYK1-3* lines did not significantly reduce *E. necator* mean penetration rates (58 to 72%; Fig. 29b) in comparison to the *Atcerk1* mutant or the negative T2 control lines (#9 and #10; Fig. 29b).

Together, the ability of VvLYK1-1 to restore MAPK activation, the expression of *FRK1* and penetration resistance against *E. necator* in the *Atcerk1* mutant background suggests that VvLYK1-1 mediates chitin sensing and might be important for grapevine defense against *E. necator*.

The inducible expression of *VvLYK1-2* also restores chitin-triggered responses in the *Atcerk1* mutant

Due to the toxicity of constitutively expressed *VvLYK1-2*, new constructs were generated in which *VvLYK1-2* expression is driven by an inducible promoter. The pABindGFP vector (Bleckmann et al., 2010) permitted the inducible expression of a C-terminally tagged VvLYK1-2-GFP fusion protein regulated by the β-estradiol *LexA* promoter in the *Atcerk1* mutant background. Two independent hygromycin-resistant T3 lines *Atcerk1/LexA::VvLYK1-2-GFP* #27 and #28 were selected to be homozygous and containing only one copy of the transgene.

Following β-estradiol treatment, confocal microscopy confirmed the presence of the VvLYK1-2-GFP protein at the cell periphery (Fig. 30a) suggesting a localization at the plasma membrane similar to VvLYK1-1 (Fig. 2d).

To investigate whether VvLYK1-2 can also restore chitin-induced signaling and immune responses in the *Atcerk1* mutant, MAPK activation and defense gene expression were analyzed. Fig. 30b shows that β-estradiol pre-treatment alone did not induce MAPK phosphorylation in the WT Col-0 or in the *Atcerk1* mutant. However, β-estradiol pre-treatment followed by a chitin treatment lead to the restoration of MAPK phosphorylation in the two independent *Atcerk1*/*LexA::VvLYK1-2-GFP* lines #27 and

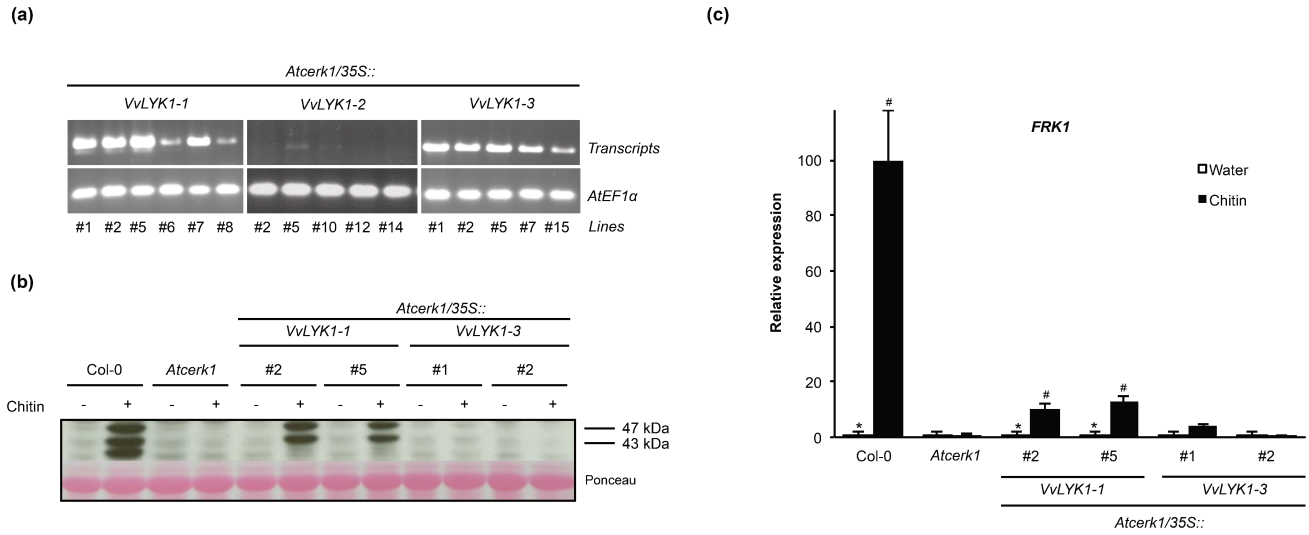


Figure 28: VvLYK1-1 restores chitin-induced immune responses in *Atcerk1.*

(**a**) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* and *VvLYK1-3* expression in leaf tissue of independently transformed *Atcerk1* lines. *AtEF1α* was used as an internal control. (**b**) Activation of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 10 min after chitin treatment (1 mg mL^{-1}) detected by immunoblotting with an antibody raised against the human phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (α-pERK1/2). Homogeneous loading was checked by Ponceau red staining. Similar results were obtained in three independent experiments. (**c**) Relative expression of a defense gene encoding flagellin-induced receptor kinase1 *(FRK1)* measured by qPCR, 2h after chitin treatment (1 mg mL^{-1}). Data show a representative experiment from three independent biological ones. Means of the triplicate data were normalized by the housekeeping gene *At4g26410* and expressed as a percentage of the chitin-treated WT Col-0, set as 100%. Asterisks (*) indicate statistically significant differences between water and chitin treatment whereas hash marks (#) indicate statistically significant differences between WT or transgenic line and *Atcerk1*, using an unpaired heteroscedastic Student's t test ($P<0.05$).

Figure S4: Necrosis observed in response to the over-expression of *VvLYK1-2* in *Nicotiana benthamiana*.

Symptoms observed 2d after leaf infiltration with (1) *A. tumefaciens* GV3101 alone (negative control), (2) *A. tumefaciens* GV3101 containing the construct $RPV1^{TIR1-193}$ (positive control; Williams et al. 2016), (3) *A. tumefaciens* GV3101 containing the construct *pART27-VvLYK1-2.*

#28 (Fig. 30b). Similarly, the chitin-induced expression of the defense gene *FRK1* was also restored in both lines *Atcerk1/pLexA::VvLYK1-2-GFP* #27 and #28 (Fig. 30c). These data indicate that VvLYK1-2, like VvLYK1-1, also restores MAPK activation and immune gene expression in the *Atcerk1* mutant. Unfortunately, the use of this transient β-estradiol-inducible expression system did not permit us to obtain reproducible results concerning the putative role of VvLYK1-2 in the resistance against *E. necator*.

VvLYK1-1 and VvLYK1-2 expression restore chitosan-triggered responses in the *Atcerk1* mutant

To further characterize these new grapevine PRRs, we also tested the responses triggered by chitosan in *Atcerk1/VvLYK1* transgenic lines (Fig. 31). Like chitin (Fig. 28), chitosan was able to strongly induce the phosphorylation of MAPKs in WT Col-0 and this signaling pathway was highly compromised in the *Atcerk1* mutant (Fig. 31a). Expression of *VvLYK1-1* in the *Atcerk1* mutant also restored chitosan-induced MAPK activation but *VvLYK1-3* did not (Fig. 31a). Similarly, the chitosan-induced expression of the defense gene *FRK1* was also restored at the WT or higher level in both lines *Atcerk1/p35S::VvLYK1-1* #2 and #5 whereas the *FRK1* transcript level in lines *Atcerk1/p35S::VvLYK1-3* #1 and #2 was comparable to the one in *Atcerk1* (Fig. 31b). Of note, the *FRK1* expression level in *Atcerk1* treated by chitosan is significantly higher than in water condition (Fig. 31b). Chitosan-induced phosphorylation of MAPKs (Fig. 31c) and *FRK1* defense gene expression (Fig. 31d) were also complemented in the two independent lines *Atcerk1/pLexA::VvLYK1-2-GFP* #27 and #28. Thus VvLYK1-1 and VvLYK1-2 also restore chitosan-triggered responses in *Atcerk1*.

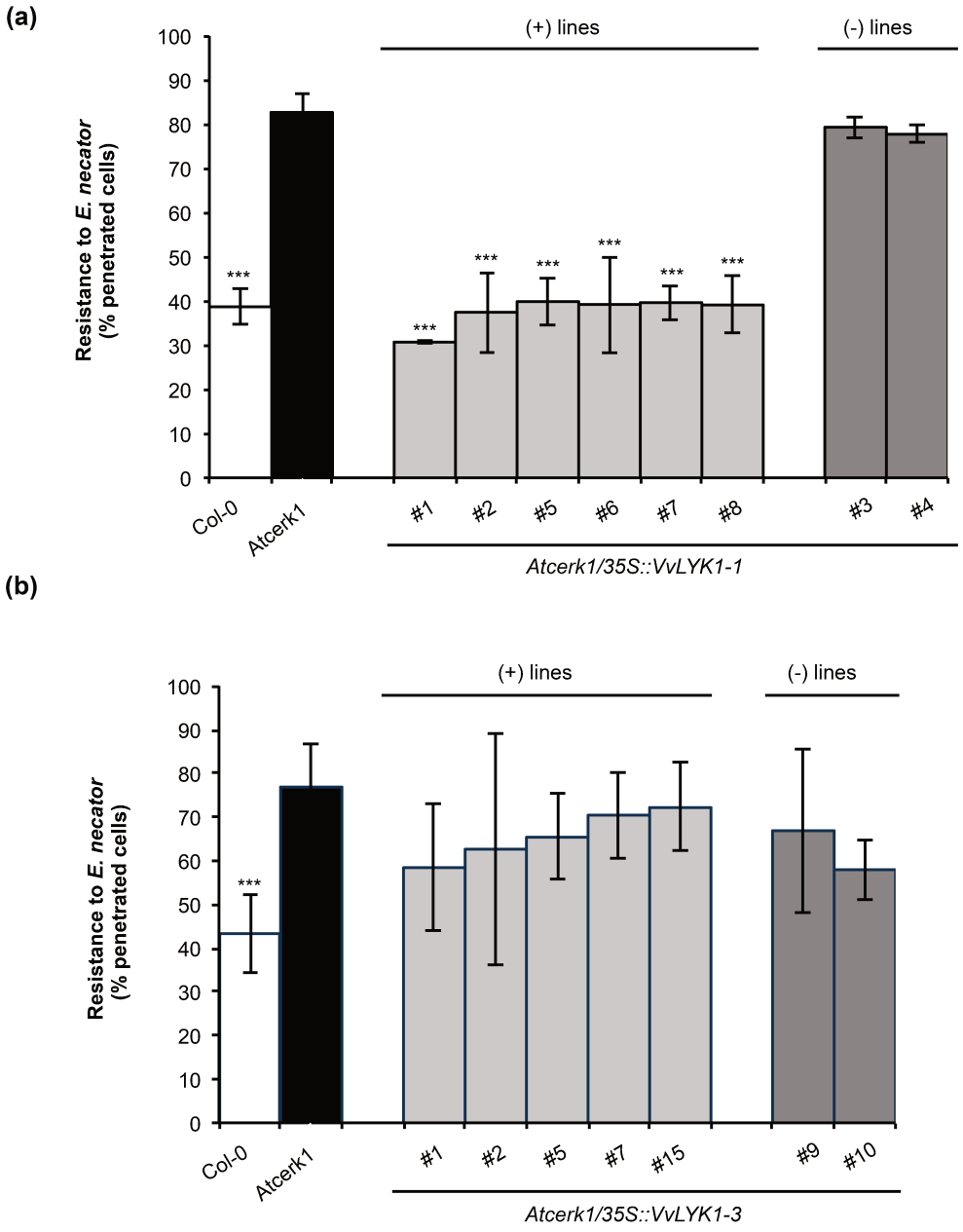


Figure 29: VvLYK1-1 expression restores penetration resistance against the non-adapted powdery mildew *Erysiphe necator* in *Atcerk1*.

Penetration efficiency (*i.e.* haustorium formation) of the non-adapted powdery mildew pathogen *E. necator* on Arabidopsis WT (Col-0), *Atcerk1* mutant and eight independent transgenic *Atcerk1* lines transformed with the *VvLYK1-1* construct (**a**) or seven lines transformed with the *VvLYK1-3* construct (**b**). One hundred germinated conidia were scored per leaf, with three leaves inoculated per line. Each data point represents the mean of three independent experiments ± SE. WT Col-0 and transgenic lines were compared to the mutant *Atcerk1* with a Student's *t*-test (***, P<0.001). (+) lines expressing the transgene. (-) lines with no detectable *VvLYK1* transcripts.

Discussion

Chitin is a well-known PAMP which elicits typical immune responses in *Arabidopsis* (Cao et al., 2014; Miya et al., 2007; Petutschnig et al., 2010; Wan et al., 2008) and a number of other plant species (Akamatsu et al., 2013; Ao et al., 2014; Felix et al., 1998; Hayafune et al., 2014; Kaku et al., 2006; Liu et al., 2016; Shimizu et al., 2010; Zeng et al., 2012). However, little is known about chitin perception in grapevine. Here we clearly demonstrate that chitin and chitosan, its deacetylated derivative, trigger grapevine immune responses such as phosphorylation of MAPKs and the expression of defense genes including *CHIT4C*, *STS*, *PAL* and *RBOHD*. Up-regulation of genes encoding chitinases and PAL was also observed in *Arabidopsis* and rice upon chitin treatment (Kaku et al., 2006; Miya et al., 2007). Surprisingly, these chitooligosaccharides did not induce any detectable H_2O_2 production in grapevine, in contrast to *Arabidopsis* (Miya et al., 2007) and rice (Hayafune et al., 2014). However, this lack of H_2O_2 production clearly does not prevent the phosphorylation of MAPKs showing independence between these two pathways, in accordance with results previously obtained in *N. benthamiana* and Arabidopsis (Segonzac et al., 2011; Xu et al., 2014).

We also show that chitin enhances the resistance of grapevine leaves to the necrotrophic fungus *B. cinerea* and the obligate biotrophic oomycete *P. viticola* (Fig. 26), as previously demonstrated following treatment with chitosan, flg22 or sulfated β-1,3-glucan (Aziz et al., 2006; Gauthier et al., 2014; Trdá et al., 2014). Similarly, treatment of rice plants with chitin reduced the susceptibility to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* (Tanabe et al., 2006). More recently, chitin treatment was also shown to reduce the susceptibility of *Arabidopsis* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv tomato (*Pto*) DC3000 and the fungus *Alternaria brassicicola* (Cao et al., 2014). All of these results confirm that stimulation of plant immune responses with PAMPs can trigger enhanced resistance against different plant pathogens.

The degree of acetylation (DA) of chitooligosaccharides appeared to have no effect on the amplitude of the immune responses in grapevine although the duration of the chitosan-triggered MAPK activation was longer (Fig. 26). Similarly, in *Arabidopsis*, the DA of chitooligosaccharides had no effect on the activation of PAL (Cabrera et al., 2006). In contrast, in wheat, chitosan oligomers with a DA of 50% were better able to induce PAL activity than those possessing a DA of 0% (Vander et al., 1998). Thus, the

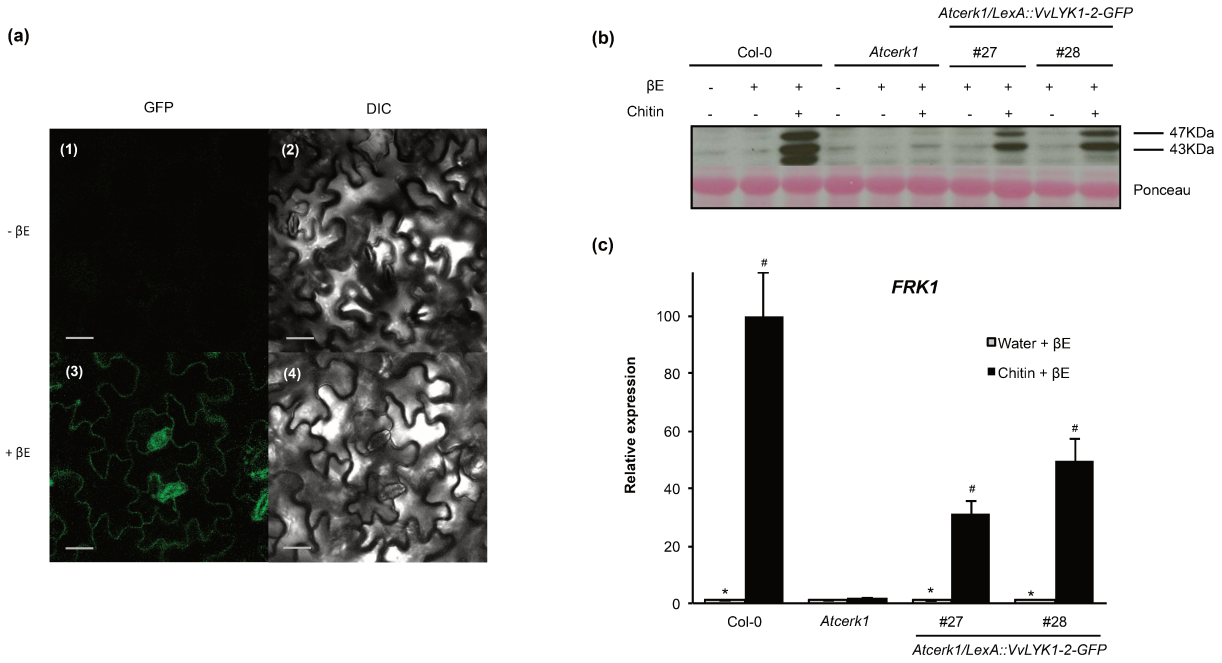


Figure 30: The inducible expression of VvLYK1-2 also restores chitin-triggered responses in *Atcerk1*.

(**a**) Subcellular localization of *VvLYK1-2-GFP* visualized by confocal microscopy 4h post-treatment with β-estradiol (βE). DIC, differential interference contrast. Bars, 20 µm. (**b**) Activation of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) detected 10 min after chitin treatment (1 mg mL^{-1}) by immunoblotting with an antibody raised against the human phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (α-pERK1/2). Homogeneous loading was checked by Ponceau red staining. Similar results were obtained in three independent experiments. (**c**) Relative expression of the defense gene encoding flagellin-induced receptor kinase1 *(FRK1)* measured by qPCR, 2h post-chitin treatment (1 mg mL^{-1}). Data show a representative experiment from three independent biological ones. Means of the triplicate data were normalized by the housekeeping gene *At4g26410* and expressed as a percentage of the transcript level in WT Col-0 plants treated by chitin + β-estradiol (βE), set as 100%. Asterisks (*) indicate statistically significant differences between water and chitin treatment whereas hash marks (#) indicate statistically significant differences between WT or transgenic line and *Atcerk1*, using an unpaired heteroscedastic Student's t test ($P<0.05$). For (**b**) and (**c**), inducible transgenic lines *Atcerk1/LexA::VvLYK1-2-GFP* were pre-treated, 1h before chitin treatment, with 10 µM β-estradiol (βE).

structure/activity of chitooligomers might differ depending on the plant species used (Yin et al., 2016).

The activation of MAPKs and defense gene expression in grapevine cells treated with chitin demonstrates that grapevine possesses the cognate PRRs. Zhang et al. (2009) previously proposed the grapevine LYK family to be comprised of 12 members. We undertook a re-examination of the predicted *LYK* gene family in grapevine in combination with published EST data and our own RNA-Seq data. This revealed a number of errors in the original Zhang et al. (2009) predictions both in terms of the predicted ORFs and gene number. For example, the previously annotated single *VvLYK10* gene (Zhang et al., 2009) was found to contain a tandemly arrayed *LYK* gene pair. The two ORFs encode proteins with a 74% amino acid similarity to each other and homology to AtLYK5 (49% and 51% amino acid similarity). Tandem *LYK* gene pairs have also been identified in legume and poplar plants (Zhang et al., 2009). We are therefore proposing a new annotation scheme for the grapevine *VvLYK* gene family which uses a naming convention based on sequence similarity to *Arabidopsis LYK* gene family (Fig. 2a, Table S1).

In *Arabidopsis*, AtCERK1/LYK1 has been demonstrated to play a key role in chitin-induced signaling. Grapevine encodes three putative orthologs of AtCERK1/LYK1, designated VvLYK1-1, VvLYK1-2 and VvLYK1-3. Our data demonstrates that the constitutive expression of *VvLYK1-1* or the inducible expression of *VvLYK1-2* in the *Atcerk1* mutant restores chitooligosaccharide-induced immune responses such as MAPK activation and expression of the defense gene *FRK1*. Thus our results demonstrate that these two independent grapevine proteins are functional orthologs of AtCERK1/LYK1, suggesting duplication events during the evolution of the ancestral genome of *V. vinifera* (Jaillon et al., 2007). VvLYK1-1 and/or VvLYK1-2 also restore chitosan perception by the *Atcerk1* mutant, as indicated by MAPK activation, suggesting that in grapevine the same PRRs can mediate both chitin and chitosan signaling. Similarly, an AtCERK1 protein band shift was detected in Arabidopsis after treatment with chitin or chitosan and the ectodomain of AtCERK1 has been shown to bind chitosan DP6 (Petutschnig et al., 2010). However, the fact that ROS production in Arabidopsis is induced by chitin DP6 but not by the fully deacetylated chitosan DP6 (Fig. S1) confirmed previous results of Gubaeva (2017) indicating that some downstream signaling events may be divergent. The fact that a weak signal for MAPKs activation and a significant *FRK1* transcript accumulation

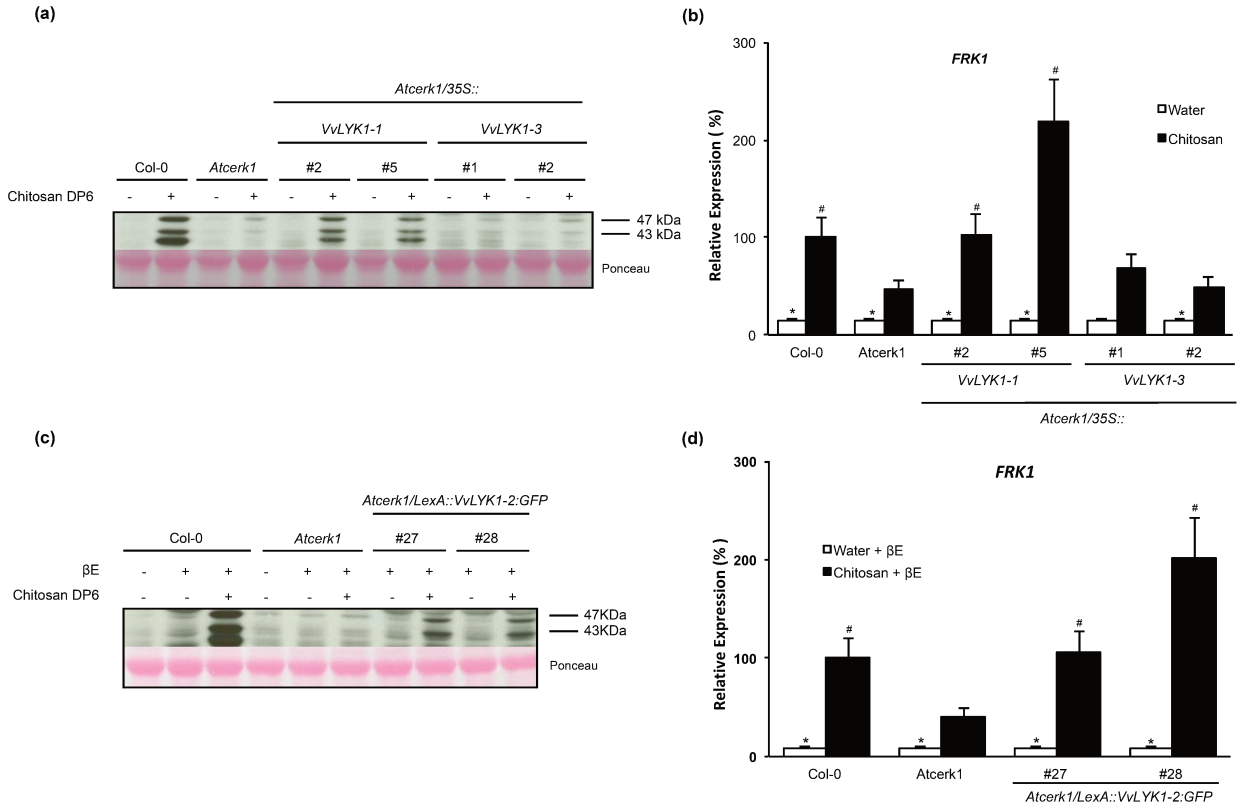


Figure 31: VvLYK1-1 and VvLYK1-2 expression restores chitosan-triggered responses in the *Atcerk1* mutant.

(**a, c**) Activation of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) detected 10 min after treatment with chitosan DP6 (1 mg mL^{-1}) by immunoblotting with an antibody raised against the human phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (α-pERK1/2). Homogeneous loading was checked by Ponceau red staining. (**b, d**) Expression of a defense gene encoding the flagellin-induced receptor-like protein kinase 1 *(FRK1)* measured by qPCR 2 h after chitosan treatment. Data show an average of three biological experiments that were normalized by housekeeping gene *At4g26410* and compared with Col-0 treated with chitosan, set as 100%. Asterisks (*) indicate statistically significant differences between water and chitosan treatment whereas hash marks (#) indicate statistically significant differences between WT or transgenic line and *Atcerk1*, using an unpaired heteroscedastic Student's t test ($P<0.05$). (**c**, **d**) All lines were pretreated 1h before elicitor treatment with β-estradiol (βE; 10 μM), when indicated.

are observed in the *Atcerk1* mutant following chitosan treatment (Fig. 31) is considered together with previous results demonstrating AtCERK1/LYK1-independent defense gene expression (Povero et al., 2011), suggests that different AtLYK proteins may be involved in detecting different chitooligosaccharides. A preliminary investigation of the response of five different *Atlyk* mutants to chitosan DP6 treatment shows that MAPK activation is weaker in the *Atlyk5* and *Atlyk3* mutants compared to WT Col-0 (Fig. S5) suggesting that the AtLYK3 and AtLYK5 proteins might also participate in the perception of chitosan oligomers in combination with AtCERK1/LYK1.

Interestingly, we were unable to obtain *Arabidopsis* lines with high levels of constitutively expressed *VvLYK1-2.* Furthermore, we observed an induction of cell death following transient expression of *VvLYK1-2* in tobacco (Fig. S4), confirming gene toxicity. Cell death in response to heterologous LysM-RK expression in *N. benthamiana* has previously been observed when *AtCERK1* was fused with the yellow fluorescent protein variant, sYFP2 and transiently expressed under the control of a *35S* promoter (Pietraszewska-Bogiel et al., 2013), demonstrating the importance of regulating *LYK* expression levels.

In order to confirm the results obtained from complementation studies in Arabidopsis, we also attempted to confirm the function of *VvLYK1-1* and *VvLYK1-2* in chitin and chitosan perception in grapevine by generating grapevine transgenics in which these genes had been silenced. However, no transformed calli were recovered in three independent agrobacterium-mediated transformations of somatic grapevine embryos with *p35S::antisense-VvLYK1-1* and *p35S::antisense-VvLYK1-2* constructs whereas parallel control transformations with a *p35S::GFP construct* were successful (data not shown).

VvLYK1-1 expression in the *Atcerk1* mutant background was demonstrated to restore non-host resistance against grapevine powdery mildew suggesting that VvLYK1-1 may participate in anti-fungal basal resistance also in grapevine. As the *Atcerk1* mutant is more susceptible to the non-adapted pathogen *E. necator*, it also indicates that AtCERK1/LYK1 plays a role in the non-host resistance against this grapevine pathogen. Paparella *et al.* (2014) previously showed that an *Atlyk3-1* mutant was more resistant to *B. cinerea* suggesting that AtLYK3 negatively regulates certain immune responses such as the production of phytoalexins, suggesting that different members of the AtLYK gene family may play a role in the basal resistance of *Arabidopsis* against different fungal

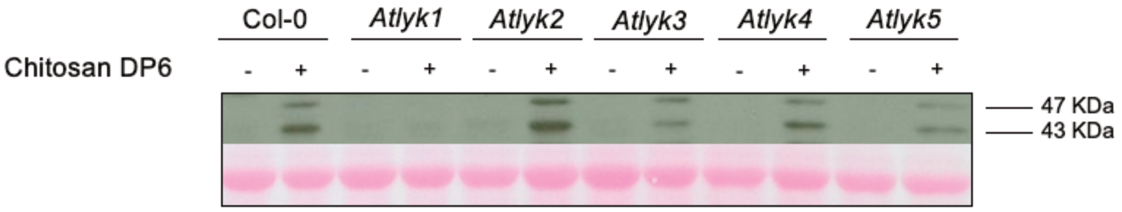


Figure S5: Immunodetection of MAPKs in Arabidopsis mutants *Atlyk1-5* in response to chitosan. Plants of the different Arabidopsis *Atlyk* mutants have been treated with 1 $mg.mL^{-1}$ chitosan DP6 for 10 min before protein extraction. Activation of the two MAPKs was detected by immunoblot with an antibody raised against the human phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (α-pERK1/2). Fifteen µg of proteins were loaded in each lane. Homogeneous loading was checked by Ponceau red staining. Similar results were obtained in three independent experiments.

pathogens. It is interesting to note that *VvLYK4-1/2*, *VvLYK5-1* and *VvLYK6* genes are highly up-regulated during *B. cinerea* infection of grapevine berries (Fig. 27). Thus, it is plausible that other members of the large VvLYKs family may exhibit specificity to the different ligands released during the interactions of grapevine with this kind of pathogen.

Cao et al. (2014) recently showed that AtLYK5 is able to bind chitin at a greater affinity than AtCERK1 and that chitin perception leads to the formation of an AtCERK1-AtLYK5 dimer which is required for AtCERK1 phosphorylation. These observations led them to propose that AtLYK5, and not AtCERK1, is the primary receptor for chitin perception and which has been proposed to be responsible for the activation of defense responses (Cao et al., 2014). Thus, one explanation of our complementation data is that VvLYK1-1 or VvLYK1-2 could dimerize with AtLYK5 in the presence of chitin, but that the interaction is not sufficiently effective to obtain a full restoration of MAPK activation and defense gene expression back to wild-type levels. This suggests the existence of molecular complexes for chitooligosaccharides perception in grapevine, as previously shown for rice (Hayafune et al., 2014) and *Arabidopsis* (Cao et al., 2014).

In summary, we present a re-annotation of the *VvLYK* gene family and demonstrate that two *AtCERK1/LYK1* orthologs, *VvLYK1-1* and *VvLYK1-2,* are involved in chitooligosaccharide signaling. Elucidating components of PAMP-triggered immunity in grapevine opens the possibility of developing grapevine varieties with durable resistance against fungal pathogens. *E. necator* has adapted to successfully infect grapevine by evolving host-specific effector proteins that target and re-programme the signalling pathways that lead to PAMP-triggered immunity. The introduction of PRRs from a closely related species that can function in *V. vinifera* but are not modulated by *E. necator*'s specific effector suite has the potential to restore PAMP-triggered immunity against this adapted pathogen (Heath, 2000; Lee et al., 2016). The proof of concept for this approach was demonstrated by the expression of the *Arabidopsis* PRR EFR in *N. benthamiana*, tomato, rice and wheat plants which conferred greater resistance against a range of phytopathogenic bacteria (Lacombe et al., 2010; Lu et al., 2015; Schoonbeek et al., 2015; Zipfel et al., 2006). Several components of the chitin-signalling network are known targets of numerous pathogen effector proteins (Gimenez-Ibanez et al., 2009; Mentlak et al., 2012; van den Burg et al., 2006; van Esse et al., 2007; van Esse et al., 2008; Yamaguchi et al., 2013; Zeng et al., 2012), supporting the hypothesis that the chitin-

signalling network is an excellent candidate for enhancing the grapevine immune response.

Thus, further experiments will be necessary to gain a better understanding of how grapevine cells specifically perceive different chitooligosaccharides *via* these complex receptors and to determine the role of each member of the *VvLYK* multigene family, particularly during its interactions with both beneficial and pathogenic microbes.

Experimental procedures

Plant, cell culture and fungal materials

Arabidopsis thaliana wild-type (WT) Columbia (Col-0), mutant *Atcerk1* (GABI-Kat_096F09, allele *Atcerk1-2*; Gimenez-Ibanez et al., 2009) or transgenic lines *Atcerk1/35S::VvLYK1-1/3* and *Atcerk1/LexA::VvLYK1-2-GFP* were grown under a 10/14-h day/night cycle at 20/18 °C (Trdá et al., 2014). For *in vitro* culture, *Arabidopsis* plants were grown on solid or in liquid half Murashige and Skoog (MS) medium including Nitsch vitamins (M0256; Duchefa, Haarlem, the Netherlands) supplied with 10 g L^{-1} sucrose. Seedlings were grown at 20 °C (day) or 18 °C (night) with a 14-h photoperiod.

Grapevine (*V. vinifera* cvs Cabernet Sauvignon and Marselan) cuttings were grown in a greenhouse until they had developed 6-8 leaves. The second and third youngest adult leaves from each plant were used for experiments, as previously indicated (Steimetz et al., 2012). Grapevine cells (*V. vinifera* cv. Gamay) were cultivated as described in Vandelle et al. (2006). For all experiments, 7-day-old cultures were diluted twice with new medium 24 h prior to use.

Grapevine powdery mildew *(E. necator* - isolate APC) was maintained detached leaves of *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon as previously described (Donald et al., 2002).

Grapevine downy mildew (*P. viticola* – isolate collected from a Burgundy vineyard) was routinely maintained on *V. vinifera* cv. Marselan plants as previously described (Steimetz et al., 2012).

Elicitors

Chitin and chitosan hexamer, with a degree of acetylation (DA) of 99.9 % and 0.1 %, respectively, were provided by Elicityl (Crolles, France). They were extracted from exoskeletons of crustaceans, hydrolyzed, purified by chromatography and finally their degree of polymerization (DP) and DA were verified by ^{1}H NMR analysis. The crab shell chitin NA-COS-Y (Lloyd et al., 2014), was obtained from Yaizu Suisankagaku Industry Co. (Yaizu, Japan). All the above mentioned described chitooligosaccharides were dissolved in sterile ultrapure water (pH 8.5) at a concentration of 1 or 10 mg mL^{-1}. Sulfated laminarin (PS3), used as a potent inducer of grapevine resistance (Gauthier et al., 2014), was provided by Goëmar Laboratories and dissolved in sterile ultrapure water.

The flagellin-derived flg22 peptide from *Xanthomonas campestris* pv *campestris* strain 305 (QRLSSGLRINSAKDDAAGLAIS) was purchased from Proteogenix and dissolved in sterile ultra-pure water at 1 mM, as previously described (Trdá et al., 2014).

MAPK activation

Grapevine cells were equilibrated as described in Dubreuil-Maurizi et al. (2010), then treated with chitooligosaccharides (100 µg mL^{-1}) or water (as control) and harvested at 0, 5, 10, 20, 40 and 60 min post-treatment. MAPK activation was detected after immunoblotting of the extracted proteins using anti-p42/44-phospho-ERK antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Transfer quality and homogeneous loading were checked by Ponceau red staining.

For *Arabidopsis* plantlets, 10- to 15-day-old liquid-grown seedlings were equilibrated for 24 h in fresh half MS medium. β-estradiol (10 µM) was added 1 h before elicitor treatment (1 mg mL^{-1}) for inducible transgenic lines *Atcerk1/LexA::VvLYK1-2-GFP*. Seedling samples were harvested 10 min after chitin or chitosan treatment.

Analysis of defense gene expression by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

For defense gene expression kinetics using grapevine cell suspensions, the cell culture density was adjusted to 0.1 g FWC mL^{-1} with NN medium, 16 h prior to experiment. Cells were then treated with 100 µg mL^{-1} chitooligosaccharides or water (as control) and harvested at 1 h post-treatment by filtration on GF/A filters.

For *Arabidopsis*, 10- to 15-day-old seedlings grown on solid half MS medium were transferred in liquid medium 2 d before treatment in a 24-well microtiter plate. β-estradiol (10 µM) was added 1h before treatment with 1 mg mL^{-1} of chitooligosaccharides for 2 h.

For both cells and seedlings, tissues were briefly ground before the addition of TRIzol® (Life Technologies). RNA extraction was then carried out following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Reverse transcription was performed using Superscript III (Invitrogen) for cells or M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) for seedlings, following the manufacturer's protocol. Real-time qPCR was carried out as described previously (Trdá et al., 2014), except that a 1:100 dilution of cDNA was used. The relative transcript level was calculated using the comparative DDCt method (Livak

and Schmittgen, 2001) with the previously validated grapevine *VvEF1α* (Dubreuil-Maurizi et al., 2010; Reid et al., 2006) or the Arabidopsis *At4g26410* (Czechowski et al., 2005) housekeeping gene as internal control for normalization (*AtOLI* in Table S3).

Confocal microscopy

Confocal microscopy was performed using a Leica TCS SP2-AOBS confocal laser scanning microscope with a 40X oil-immersion objective (numerical aperture 1.25; Leica, Nanterre, France). Inducible transgenic lines were sprayed with 200 µM β-estradiol, 4 h before visualization. Leaf segments were mounted in ultra-pure water or in 1 M NaCl solution for plasmolysis experiments. For FM4-64 staining, samples were incubated in 8 µM FM4-64 solution in water for 10 min prior to observation. Fluorescent markers were visualized at 488 nm. GFP and FM4-64 emissions were bandpass filtered at 500–525 nm and 616–694 nm, respectively.

Botrytis and downy mildew assays

Leaves from the second and third adult top leaves of at least 3 grapevine plants were first sprayed on both sides with elicitor solution in 0.1% surfactant (Deshcofix) or surfactant alone (control) for 48h.

For *B. cinerea* infection assays, 36 leaf discs (1.9 cm diameter) were incubated on moist Whatmann paper and inoculated on the upper surface with 1000 conidia in a 20 µL-droplet of potato dextrose broth (PDB), ¼ diluted. Inoculated discs were placed in a plastic box maintained in 100% humidity under a 10/14 h day/night cycle at 20/18°C. Infection intensity was assessed 3 d post-inoculation (dpi) by measuring the macerated lesion diameter.

For *P. viticola* infection, the lower leaf surface was sprayed with a freshly prepared suspension (2.10^4 sporangia mL^{-1}) and plants were maintained in 100% humidity for 2 h. Leaf discs (1 cm diameter) were cut, transferred onto moist Whatmann paper in a plastic box and maintained in 100% humidity under a 10/14 h day/night cycle at 20/18°C. Infection intensity was assessed at 8 dpi by measuring the sporulating area using image analysis Visilog 6.9 software (Kim Khiook et al., 2013).

Powdery mildew penetration assay on transgenic *Arabidopsis*

Four-week-old *Arabidopsis* plants were used to assess powdery mildew penetration efficiency. Two leaves per plant were infected with *E. necator* using a fine paintbrush. Detached leaf material was sampled 48 hpi and stained with trypan blue according to Koch and Slusarenko (1990). Fungal structures were visualized using a Zeiss (Göttingen, Germany) Axioscop 2 light microscope. A minimum of 100 germinated spores were scored on each leaf. Successful penetration of epidermal cells (% penetrated cells) was indicated by the presence of a haustorium or a secondary hyphae.

Phylogenetic analysis of the VvLYK family

Proteins were aligned with the CLUSTAL W program (Tables S1, S2). The Maximum Likelihood phylogenetic tree was generated with the MEGA7 software (Kumar et al., 2016), using a bootstrapping of 1000 replications.

Expression analysis of *VvLYK* genes in pathogen-infected grape tissues

Young glossy *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon leaves of similar developmental stage (~6 cm in diameter) were inoculated with *E. necator* conidia as described previously (Donald et al., 2002). The leaves were incubated at 23°C under a 16 h light/8 h dark cycle and sampled at 0, 6, 12 and 24 hpi into liquid nitrogen. Total RNA was extracted from two independent leaves each time point using the Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) and DNase-treated according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were assessed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Library construction and Illumina RNA sequencing (single end, 100 bp reads) were carried out at the Australian Genome Research Facility (Melbourne, Australia). Reads were mapped to the coding sequences of each predicted *VvLYK* cDNA sequence using CLC Genomics Workbench v6.0.1. Reads were normalized according to (a) length of the VvLYK reference sequence and (b) mean relative expression of *V. vinifera* cv Cabernet sauvignon housekeeping genes: elongation factor 1-alpha (XM_002284888); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (XM_002263109), phosphoenolpyruvate carboxylase (XM_010658735), to produce a Relative Expression Value (REV) at each time point of infection.

For microarray data, RNA was extracted from grape berries infected with *B. cinerea* then microarray hybridization and data analysis were performed as described in

Gene Family	ID	Sequence (5'-3')	Usage
VvLYK1-1	*VvLYK1-1_RT_F*	tacatgccaccagaatacgc	Semi-quantitative RT-PCR
	VvLYK1-1_RT_R	aaggtcctctcgtggatcag	Semi-quantitative RT-PCR
	VvLYK1-1_R2	taaacagatccaaagccacc	Genotyping
	VvLYK1-1_F2	gtgggcttgtttacattcctac	Genotyping
	VvLYK1-1_qF	tggctttgttcgaggatgtg	qPCR
	VvLYK1-1_qR	cgagtgggtagttatcttcaagc	qPCR
	VvLYK1-1_Xho_F	cgc**ctcgag**caaatgaaacagaaggtggg	Vector construction
	VvLYK1-1_Xba_R	cgc**tctaga**aaggaaaaatggtgaagtattg	Vector construction
	VvLYK1-1_GW_F	<u>cacc</u>atgaaacagaaggtgggtttaggg	Gateway construction
	VvLYK1-1_GW_R	ggcccttccagacattagattgacgagg	Gateway construction
VvLYK1-2	*VvLYK1-2_RT_F*	cgtcttgtgggtacatttgg	Semi-quantitative RT-PCR
	VvLYK1-2_RT_R	tcctcaaacaaagcaacgag	Semi-quantitative RT-PCR
	VvLYK1-2_F2	cccgaatttgtaaaaggaag	Genotyping
	VvLYK1-2_R2	cacaggaactgtatgctcatg	Genotyping
	VvLYK1-2_qF	gaccagaggcttggagatga	qPCR
	VvLYK1-2_qR	catcccaatcttcggttgatga	qPCR
	VvLYK1-2_Xba_R	cgc**tctaga**tgctaccttcctgacattag	Vector construction
	VvLYK1-2_Xho_F	ggc**ctcgag**aaacatggtcatttcatcaac	Vector construction
	VvLYK1-2_GW_F	<u>cacc</u>atggtcatttcatcaaacagcaggaacgc	Gateway construction
	VvLYK1-2_GW_R	ggcccttcctgacattagattcatcagagcc	Gateway construction
VvLYK1-3	*VvLYK1-3_RT_F*	ttcttcattgcccactcgtc	Semi-quantitative RT-PCR
	VvLYK1-3_RT_R	caagtcctcttgcttcagtgg	Semi-quantitative RT-PCR
	VvLYK1-3_R2	atatcctatcaggcgaaccag	Genotyping
	VvLYK1-3_F2	gttgatttcagccttggtagtg	Genotyping
	VvLYK1-3_qF	ggcaatgactacccacttgac	qPCR
	VvLYK1-3_qR	ttagtgcgacaactactgactg	qPCR
	VvLYK1-3_Xba_R	cgc**tctaga**cacactatcttcctgacatc	Vector construction
	VvLYK1-3_Xho_F	gcg**ctcgag**ccatctttgctagggtttc	Vector construction
	VvLYK1-3_GW_F	<u>cacc</u>atgttggtttttagaatctcaagg	Gateway construction
	VvLYK1-3_GW_R	ggctcttcctgacatcagattcactagagc	Gateway construction
Housekeeping genes	*AtEF1_F*	tgagcacgctcttcttgctttca	Semi-quantitative RT-PCR
	AtEF1_R	ggtggtggcatccatcttgttaca	Semi-quantitative RT-PCR
	AtOLI_qF	gagctgaagtggcttccatga	qPCR
	AtOLI_qR	cgtccgacatacccatgatcc	qPCR
	VvEF1α_qF	gaactgggtgcttgataggc	qPCR
	VvEF1α_qR	aaccaaaatatccggagtaaaaga	qPCR
Defense genes	*AtFRK1_qF*	tgaaggaagcggtcagattt	qPCR
	AtFRK1_qR	ctgactcatcgttggcctct	qPCR
	VvCHIT4C_qF	gcaaccgatgttgacatatca	qPCR
	VvCHIT4C_qR	cgtcgccctagcaagtgag	qPCR
	VvSTS1.2_qF	aggaagcagcattgaaggctc	qPCR
	VvSTS1.2_qR	tgcaccaggcatttctacacc	qPCR
	VvPAL_qF	agtctccatggacaacacccg	qPCR
	VvPAL_qR	tgctcagcactttcgacatgg	qPCR
	VvRBOHD_qF	caccaccatgcttcagtccctccat	qPCR
	VvRBOHD_qR	agcgatcttcttgaagacttgtcgcc	qPCR

Table S3 : Primers used in this study. For each primer, gene family, name used (ID), sequence (5'-> 3') and usage are reported. Underlined <u>cacc</u> is used for Gateway directional TOPO cloning. Letters in bold indicate restriction sites added to the 5' end of gene-specific primer sequences to facilitate cloning.

Kelloniemi *et al*. (2015). All microarray expression data are available at GEO under the entry GSE65969.

Generation of the *Atcerk1/VvLYK1* transgenic lines

The coding sequences of *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* and *VvLYK1-3* from *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon were amplified from grapevine leaf cDNA prepared as previously described (Feechan et al., 2013). Gene-specific primers were designed with 5'-*Xho* I or *Xba* I restriction sites to facilitate sub-cloning (Table S3). Amplified products of the expected size were cloned into pCR-BLUNT vector and verified by sequencing. The coding sequences were subcloned into pART7 vector (Gleave, 1992) between the *35S* promoter and *OCS* terminator sequences. The *35S-VvLYK1-OCS* expression cassettes were subcloned as *Not* I fragments into the binary vector pART27 and then transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA-105 for *Arabidopsis* transformation or *A. tumefaciens* strain GV3101 for agroinfiltration experiments (Williams et al., 2016).

The GFP-tagged constructs were amplified using primers designed to replace the stop codon with an Ala codon (GCC nucleotides, Table S3). PCR products of the expected size were first directionally subcloned into pENTR™/D-TOPO® vector (Invitrogen), then inserted into Gateway expression vectors by using Gateway LR Clonase™ II enzyme mix (Invitrogen). The three full-length coding sequences of *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* and *VvLYK1-3* were cloned into pK7FWG2 (kanamycin resistance) to obtain a constitutive overexpression construct (*p35S::VvLYK1-1/-2/-3-GFP*) or in pABindGFP (Bleckmann et al., 2010; hygromycin resistance) for a β-estradiol inducible gene expression (*pLexA::VvLYK1-2-GFP*).

The *Arabidopsis Atcerk1* mutant (Gimenez-Ibanez et al., 2009) was transformed using the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Antibiotic resistant transgenic plants were screened in the T1 generation as described previously (Zipfel et al., 2006).
For analysis of *VvLYK1-1/-2/-3* transgene expression in the T2 generation, seed collected from selfed T1 lines was sown into soil and plants grown in a controlled growth chamber under a 10/14h day/night cycle at 24°C. Leaf material (~50 mg) was sampled from individual T2 segregating lines and the presence of the *VvLYK1-1/-2/-3* transgene confirmed by genomic PCR. Positive lines were resampled for total RNA extraction, cDNA synthesis and semi-quantitative PCR analysis of *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* or *VvLYK1-3* transcript expression using primers listed in Table S3.

Accession numbers

Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon sequences: *VvLYK1-1* (MF177032), *VvLYK1-2* (MF177033), *VvLYK1-3* (MF177034). *VvLYK* sequences fused with Cter-GFP tag: *VvLYK1-1-GFP* (MF537036), *VvLYK1-2-GFP* (MF537037) and *VvLYK1-3-GFP* (MF537038).

Acknowledgements

We thank Angelica Jermakow, Nayana Arunasiri, Adam Wells, Soufiane Nassiri, Agnès Klinguer and Lucile Jacquens for excellent technical assistance. This work has benefited of the expertise of Christine Arnould and Elodie Noirot from the regional Centre of Microscopy/DImaCell platform (Dijon, France). We thank Gary Stacey for the gift of homozygous seeds of GABI-Kat_096F09 *Atcerk1* mutant line. We also thank Andrea Gust and Frederic Brunner for the gift of homozygous seeds of the *Atlyk2-5* mutant lines.

Funding

This work has been financially supported by ANR (PATRIC project, grant ANR-13-KBBE-0001) (to BP), the Regional Council of Bourgogne Franche-Comté (PARI grant 2016-9201AAO050S01636 and FEDER grant BG0005888) and INRA for the funding of Justine Claverie's PhD, by the Gatsby Charitable Foundation (to CZ), and by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) grants BB/G024936/1 (ERA-PG 'PRR CROP' (to CZ).

Author Contribution

DB, CV, LJD performed most of the experiments; LT, FB, CZ and BP conceived the original screening and research plans; JC, AC, BD and LS provided technical assistance; MCH, FB, CZ and BP supervised the experiments, LT, DB, LJD and PT designed the experiments and analysed the data; DB, LJD, IBD and BP conceived the project and wrote the article with contributions of all the authors; FB, MA and CZ supervised and complemented the writing. All the authors of this manuscript have not any conflict of interest.

References

Akamatsu, A., Wong, H.L., Fujiwara, M., Okuda, J., Nishide, K., Uno, K., Imai, K., Umemura, K., Kawasaki, T., Kawano, Y. and Shimamoto, K. (2013) An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. *Cell Host Microbe* 13, 465-476.

Albert, P., Miya, A., Hiratsuka, K., Kawakami, N. and Shibuya, N. (2006) A high-throughput evaluation system for *Arabidopsis* mutants for defense signaling. *Plant Biotechnology* 23, 459-466.

Ao, Y., Li, Z., Feng, D., Xiong, F., Liu, J., Li, J.F., Wang, M., Wang, J., Liu, B. and Wang, H.B. (2014) OsCERK1 and OsRLCK176 play important roles in peptidoglycan and chitin signaling in rice innate immunity. *Plant J* 80, 1072-1084.

Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bezier, A., Lambert, B., Joubert, J.M. and Pugin, A. (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 1118-1128.

Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. and Vernet, G. (2006) Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* 96, 1188-1194.

Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A. and Simon, R. (2010) Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol* 152, 166-176.

Boller, T. and Felix, G. (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 379-406.

Boutrot, F. and Zipfel, C. (2017) Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 55, 257-286.

Brandizzi, F., Irons, S.L., Johansen, J., Kotzer, A. and Neumann, U. (2004) GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system. *J Microsc* 214, 138-158.

Cabrera, J.C., Messiaen, J., Cambier, P. and Van Cutsem, P. (2006) Size, acetylation and concentration of chitooligosaccharide elicitors determine the switch from defence involving PAL activation to cell death and water peroxide production in Arabidopsis cell suspensions. *Physiologia Plantarum* 127, 44-56.

Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A. and Stacey, G. (2014) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *Elife* 3.

Clough, S. and Bent, A. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* 16, 735-743.

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W.R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139, 5-17.

Dodds, P. and Rathjen, J. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11, 539-548.

Donald, T.M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A.F., Bouquet, A., Thomas, M.R. and Dry, I.B. (2002) Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor Appl Genet* 104, 610-618.

Dubreuil-Maurizi, C., Trouvelot, S., Frettinger, P., Pugin, A., Wendehenne, D. and Poinssot, B. (2010) beta-Aminobutyric Acid Primes an NADPH Oxidase-Dependent

Reactive Oxygen Species Production During Grapevine-Triggered Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1012-1021.

Feechan, A., Jermakow, A.M., Ivancevic, A., Godfrey, D., Pak, H., Panstruga, R. and Dry, I.B. (2013) Host cell entry of powdery mildew is correlated with endosomal transport of antagonistically acting VvPEN1 and VvMLO to the papilla. *Mol Plant Microbe Interact* 26, 1138-1150.

Felix, G., Baureithel, K. and Boller, T. (1998) Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiol* 117, 643-650.

Gauthier, A., Trouvelot, S., Kelloniemi, J., Frettinger, P., Wendehenne, D., Daire, X., Joubert, J.M., Ferrarini, A., Delledonne, M., Flors, V. and Poinssot, B. (2014) The sulfated laminarin triggers a stress transcriptome before priming the SA- and ROS-dependent defenses during grapevine's induced resistance against Plasmopara viticola. *PLoS One* 9, e88145.

Gimenez-Ibanez, S., Ntoukakis, V. and Rathjen, J.P. (2009) The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* 4, 539-541.

Gleave, A.P. (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* 20, 1203-1207.

Gong, B.Q., Xue, J., Zhang, N., Xu, L., Yao, X., Yang, Q.J., Yu, Y., Wang, H.B., Zhang, D. and Li, J.F. (2017) Rice Chitin Receptor OsCEBiP Is Not a Transmembrane Protein but Targets the Plasma Membrane via a GPI Anchor. *Mol Plant* 10, 767-770.

Gubaeva, E., Gubaev, A., Melcher, R., Cord-Landwehr, S., Singh, R., Gueddari, N.E.E. and Moerschbacher, B.M. (2017) Chitosan perception in Arabidopsis requires the chitin receptor AtCERK1 suggesting an improved model for receptor structure and function. bioRxiv.

Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M. and Nürnberger, T. (2012) Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci* 17, 495-502.

Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., Arima, S., Squeglia, F., Ruggiero, A., Tokuyasu, K., Molinaro, A., Kaku, H. and Shibuya, N. (2014) Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E404-413.

Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3, 315-319.

Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pe, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wincker, P. and French-Italian, P. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463-U465.

Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11086-11091.

Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A. (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7, 193-195.

Kelloniemi, J., Trouvelot, S., Héloir, M.C., Simon, A., Dalmais, B., Frettinger, P., Cimerman, A., Fermaud, M., Roudet, J., Baulande, S., Bruel, C., Choquer, M., Couvelard, L., Duthieuw, M., Ferrarini, A., Flors, V., Le Pêcheur, P., Loisel, E., Morgant, G., Poussereau, N., Pradier, J.M., Rascle, C., Tdra, L., Poinssot, B. and Viaud, M. (2015) Analysis of the molecular dialogue between gray mold (Botrytis cinerea) and grapevine (Vitis vinifera) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. *Mol Plant Microbe Interact*.

Kim Khiook, I.L., Schneider, C., Heloir, M.C., Bois, B., Daire, X., Adrian, M. and Trouvelot, S. (2013) Image analysis methods for assessment of H2O2 production and Plasmopara viticola development in grapevine leaves: application to the evaluation of resistance to downy mildew. *J Microbiol Methods* 95, 235-244.

Koch, E. and Slusarenko, A. (1990) Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* 2, 437-445.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P., Staskawicz, B., Jones, J.D. and Zipfel, C. (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol* 28, 365-369.

Lee, S., Whitaker, V.M. and Hutton, S.F. (2016) Mini Review: Potential Applications of Non-host Resistance for Crop Improvement. *Front Plant Sci* 7, 997.

Liu, S., Wang, J., Han, Z., Gong, X., Zhang, H. and Chai, J. (2016) Molecular Mechanism for Fungal Cell Wall Recognition by Rice Chitin Receptor OsCEBiP. *Structure* 24, 1192-1200.

Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J.M. and Chai, J. (2012) Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* 336, 1160-1164.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25, 402-408.

Lloyd, S.R., Schoonbeek, H.J., Trick, M., Zipfel, C. and Ridout, C.J. (2014) Methods to study PAMP-triggered immunity in Brassica species. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 286-295.

Lu, F., Wang, H., Wang, S., Jiang, W., Shan, C., Li, B., Yang, J., Zhang, S. and Sun, W. (2015) Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR. *J Integr Plant Biol* 57, 641-652.

Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P. and Talbot, N.J. (2012) Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by magnaporthe oryzae is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* 24, 322-335.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. and Shibuya, N. (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is

essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19613-19618.

Paparella, C., Savatin, D.V., Marti, L., De Lorenzo, G. and Ferrari, S. (2014) The Arabidopsis LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE3 regulates the cross talk between immunity and abscisic acid responses. *Plant Physiol* 165, 262-276.

Petutschnig, E., Jones, A., Serazetdinova, L., Lipka, U. and Lipka, V. (2010) The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LysM-RLK) CERK1 Is a Major Chitin-binding Protein in Arabidopsis thaliana and Subject to Chitin-induced Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 28902-28911.

Pietraszewska-Bogiel, A., Lefebvre, B., Koini, M.A., Klaus-Heisen, D., Takken, F.L., Geurts, R., Cullimore, J.V. and Gadella, T.W. (2013) Interaction of Medicago truncatula lysin motif receptor-like kinases, NFP and LYK3, produced in Nicotiana benthamiana induces defence-like responses. *PLoS One* 8, e65055.

Piquerez, S.J., Harvey, S.E., Beynon, J.L. and Ntoukakis, V. (2014) Improving crop disease resistance: lessons from research on Arabidopsis and tomato. *Front Plant Sci* 5, 671.

Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P. and Pugin, A. (2003) The endopolygalacturonase 1 from Botrytis cinerea activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 553-564.

Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Kapetis, D., Zolezzi, F., Piaggesi, A. and Perata, P. (2011) Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *J Plant Res* 124, 619-629.

Qiu, W., Feechan, A. and Dry, I. (2015) Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (Erysiphe necator), the causal agent of powdery mildew disease. *Hortic Res* 2, 15020.

Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. and Lund, S.T. (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* 6, 27.

Schoonbeek, H.J., Wang, H.H., Stefanato, F.L., Craze, M., Bowden, S., Wallington, E., Zipfel, C. and Ridout, C.J. (2015) Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytol* 206, 606-613.

Segonzac, C., Feike, D., Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Zipfel, C. and Rathjen, J.P. (2011) Hierarchy and roles of pathogen-associated molecular pattern-induced responses in Nicotiana benthamiana. *Plant Physiol* 156, 687-699.

Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H. and Shibuya, N. (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant Journal* 64, 204-214.

Shinya, T., Nakagawa, T., Kaku, H. and Shibuya, N. (2015) Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Curr Opin Plant Biol* 26, 64-71.

Steimetz, E., Trouvelot, S., Gindro, K., Bordier, A., Poinssot, B., Adrian, M. and Daire, X. (2012) Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against Plasmopara viticola. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79, 89-96.

Tanabe, S., Okada, M., Jikumaru, Y., Yamane, H., Kaku, H., Shibuya, N. and Minami, E. (2006) Induction of resistance against rice blast fungus in rice plants treated with a potent elicitor, N-acetylchitooligosaccharide. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1599-1605.

Trdá, L., Boutrot, F., Claverie, J., Brulé, D., Dorey, S. and Poinssot, B. (2015) Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Front Plant Sci* 6, 219.

Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S. and Poinssot, B. (2014) The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium Burkholderia phytofirmans and plant pathogenic bacteria. *New Phytol* 201, 1371-1384.

Trouvelot, S., Héloir, M.C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X. and Adrian, M. (2014) Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front Plant Sci* 5, 592.

van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H., Vervoort, J. and de Wit, P.J. (2006) Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol Plant Microbe Interact* 19, 1420-1430.

van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, I., de Wit, P.J. and Thomma, B.P. (2007) The chitin-binding Cladosporium fulvum effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 1092-1101.

van Esse, H.P., Van't Klooster, J.W., Bolton, M.D., Yadeta, K.A., van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., de Wit, P.J. and Thomma, B.P. (2008) The Cladosporium fulvum virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* 20, 1948-1963.

Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M. and Pugin, A. (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kin in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 429-440.

Vander, P., V rum KM, Domard, A., Eddine El Gueddari N and Moerschbacher, B.M. (1998) Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol* 118, 1353-1359.

Walters, D.R., Ratsep, J. and Havis, N.D. (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* 64, 1263-1280.

Wan, J., Zhang, X., Neece, D., Ramonell, K., Clough, S., Kim, S., Stacey, M. and Stacey, G. (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 471-481.

Wiesel, L., Newton, A.C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E.M., Birch, P.R. and Hein, I. (2014) Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Front Plant Sci* 5, 655.

Williams, S.J., Yin, L., Foley, G., Casey, L.W., Outram, M.A., Ericsson, D.J., Lu, J., Boden, M., Dry, I.B. and Kobe, B. (2016) Structure and Function of the TIR Domain from the Grape NLR Protein RPV1. *Front Plant Sci* 7, 1850.

Willmann, R., Lajunen, H., Erbs, G., Newman, M., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J., Cullimore, J., Jehle, A., Gotz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A. and Nurnberger, T. (2011) Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 19824-19829.

Xu, J., Xie, J., Yan, C., Zou, X., Ren, D. and Zhang, S. (2014) A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *Plant J* 77, 222-234.

Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K., Ishihama, N., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Tsuge, S., Ochiai, H., Tada, Y., Shimamoto, K., Yoshioka, H. and Kawasaki, T. (2013) A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. *Cell Host Microbe* 13, 347-357.

Yin, H., Du, Y. and Dong, Z. (2016) Chitin Oligosaccharide and Chitosan Oligosaccharide: Two Similar but Different Plant Elicitors. *Front Plant Sci* 7, 522.

Yu, X., Feng, B., He, P. and Shan, L. (2017) From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annu Rev Phytopathol* 55, 109-137.

Zeng, L., Velásquez, A.C., Munkvold, K.R., Zhang, J. and Martin, G.B. (2012) A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *Plant J* 69, 92-103.

Zhang, X.C., Cannon, S.B. and Stacey, G. (2009) Evolutionary genomics of LysM genes in land plants. *BMC Evol Biol* 9, 183.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T. and Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125, 749-760.

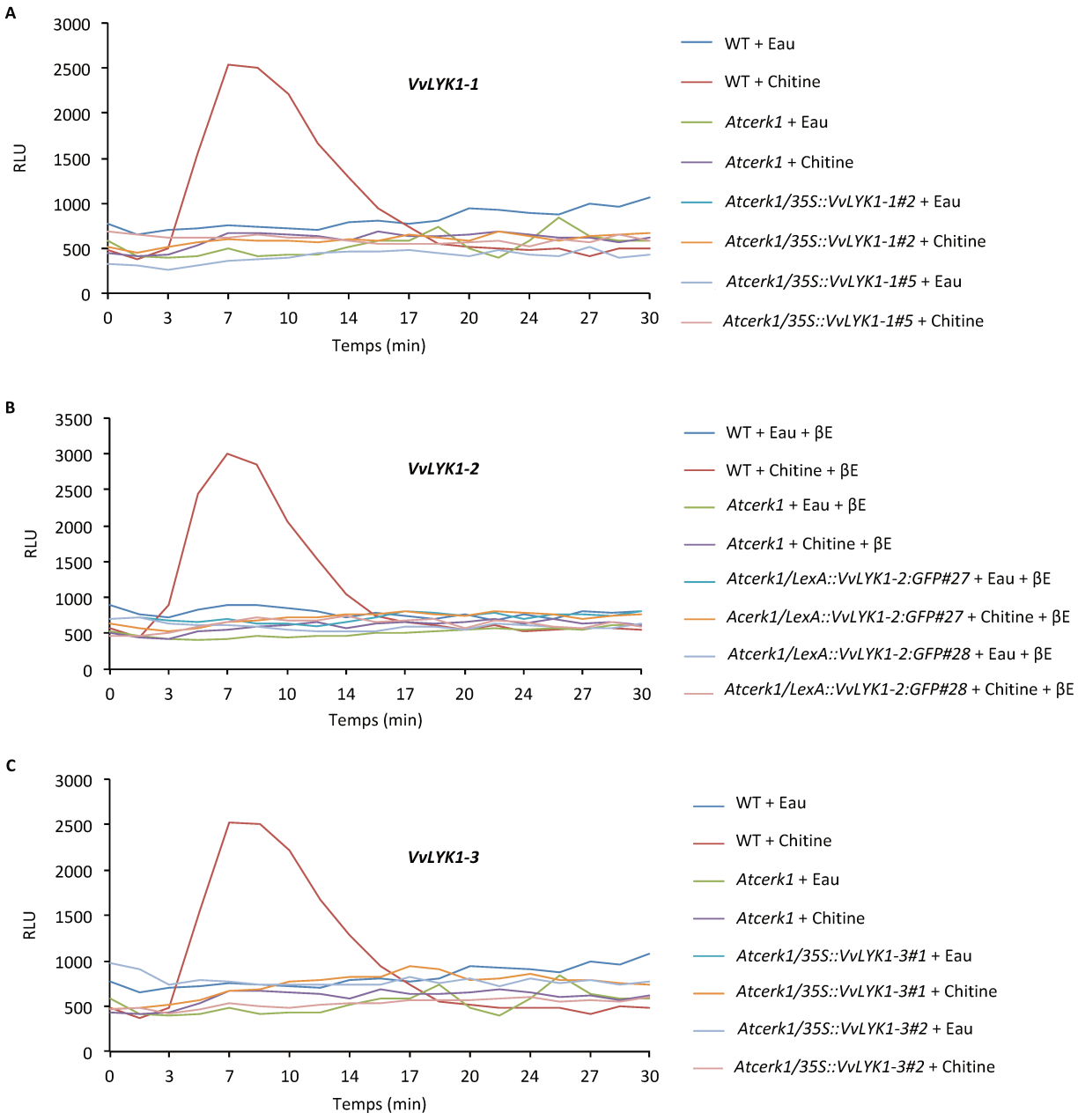


Figure 32: Mesure de la production d'H_2O_2 en réponse à la chitine sur disques foliaires des lignées transgéniques *Atcerk1/VvLYK1*.

La production d'H_2O_2 sur disques foliaires de plantes sauvages (WT), du mutant *Atcerk1* et des lignées transgéniques surexprimant constitutivement *VvLYK1-1* (#2, #5 ; A), *VvLYK1-2* (#27, #28 ; B) et *VvLYK1-3* (#1, #2 ; C) est mesurée par chimiluminescence du luminol en réponse à la chitine (1 mg/ml). B. Toutes les lignées inductibles sont prétraitées une heure avant le traitement au ß-œstradiol (ßE ; 10µM). Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

3. Résultats complémentaires

3.1. Mesure de la production d'H_2O_2 en réponse à la chitine sur disques foliaires des lignées *Atcerk1/VvLYK1*

D'après les résultats précédents, aucune production d'H_2O_2 n'est détectée sur suspensions cellulaires de vigne en réponse à un traitement à la chitine, contrairement aux réponses observées chez Arabidopsis (Figure S1 de l'article, §2 du chapitre III). La production d'H_2O_2 dans les disques foliaires est mesurée par chimioluminescence du luminol afin de déterminer si les lignées transgéniques *Atcerk1/VvLYK1* sont capables de restaurer la production d'H_2O_2. Comme attendu, un traitement à la chitine induit une production d'H_2O_2 chez la plante sauvage et aucune réponse n'est détectable chez le mutant *Atcerk1* (Figure 32). En ce qui concerne les lignées transgéniques *Atcerk1/VvLYK1*, nous n'avons pas détecté d'H_2O_2 après un traitement à la chitine, suggérant que l'expression de *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* et *VvLYK1-3* dans le mutant *Atcerk1* ne restaure pas la production de FAO (Figure 32).

3.2. Biotests de résistance à *Botrytis cinerea* d'*Atcerk1* et des lignées surexprimant *VvLYK1-1* et *VvLYK1-3*

Afin de déterminer si VvLYK1-1 et VvLYK1-3 jouent un rôle dans la résistance contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea*, les plantes sauvages (Col-0), le mutant *Atcerk1* et les lignées transgéniques *Atcerk1/35S::VvLYK1-1* et *Atcerk1/35S::VvLYK1-3* ont été inoculées avec une suspension de conidies de *B. cinerea* à 5.10^4/ml. Les mesures des symptômes à 3 jpi montrent que le mutant *Atcerk1* et les lignées *Atcerk1/35S::VvLYK1-1* et *Atcerk1/35S::VvLYK1-3* présentent des diamètres de lésions globalement comparables à ceux observés chez les plantes sauvages Col-0 (Figure 33 A). Ainsi, le récepteur AtCERK1 ne semble pas impliqué dans la résistance basale contre *B. cinerea* et la surexpression constitutive de *VvLYK1-1* et *VvLYK1-3* ne modifie pas significativement la réponse d'*Atcerk1* à ce champignon nécrotrophe.

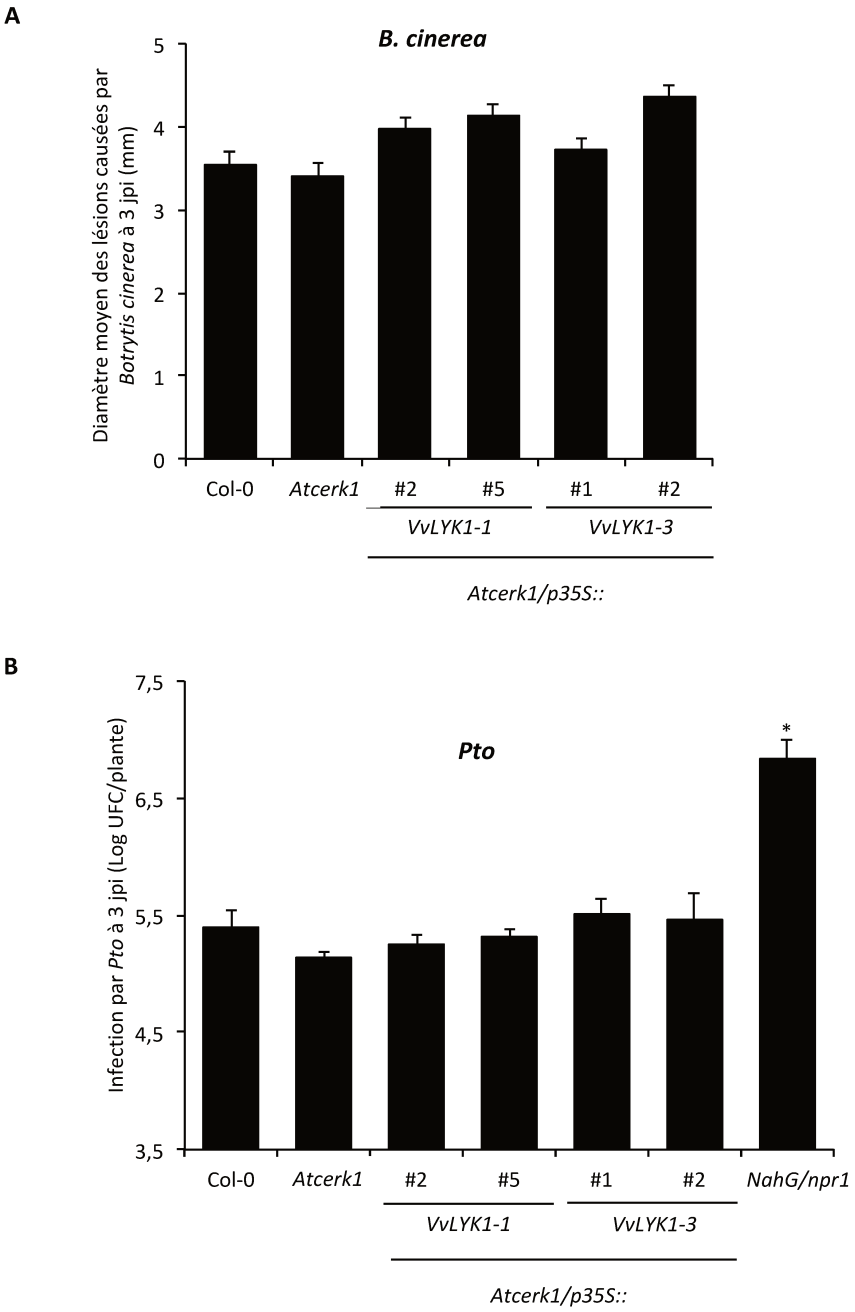


Figure 33: VvLYK1-1 et VvLYK1-3 ne participent pas à la résistance basale contre le champignon *Botrytis cinerea* ni contre *Pseudomonas syringae* pv. tomato (*Pto*) DC3000 à 3 jpi.

Les plantes sauvages WT Col-0, le mutant *Atcerk1*, la lignée *NahG/npr1* (seulement pour les infections par *Pto*) et les lignées transgéniques surexprimant constitutivement *VvLYK1-1* (#2, #5) ou *VvLYK1-3* (#1, #2) sont infectées par *B. cinerea* (A) ou *Pto DC3000* (B). Le diamètre moyen des lésions causées par *B. cinerea* (A) et le nombre « d'unité formant colonie » (UFC) de *Pto* par plante (B) sont quantifiés à 3 jours post-inoculation (jpi). Les histogrammes représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les astérisques indiquent une différence significative des moyennes entre les plantes WT Col-0 et les différentes lignées (test t de Student, $P<0,05$).

3.3. Biotests de résistance à *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 d'*Atcerk1* et des lignées surexprimant *VvLYK1-1* et *VvLYK1-3*

De la même manière, nous avons cherché à savoir quelle était l'implication de VvLYK1-1 et VvLYK1-3 dans la résistance basale à l'agent pathogène *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 (*Pto*). Les plantes ont été inoculées avec une suspension de *Pto* (densité optique 0,1 à 600 nm) et la résistance a été évaluée en quantifiant le nombre « d'unité formant colonie » (UFC) par plante. La lignée hypersensible *NahG/npr1* est utilisé comme un contrôle d'infection (Cao et al., 1997; Lawton et al., 1995). Comme attendu, le taux d'UFC par plante chez la lignée *NahG/npr1* est significativement supérieur à celui observé chez les plantes sauvages Col-0 (Figure 33 B). Etonnamment, le mutant *Atcerk1* n'est pas plus sensible à l'infection par *Pto* comparé aux plantes sauvages. L'expression constitutive de *VvLYK1-1* et *VvLYK1-3* dans le mutant *Atcerk1* ne modifie pas la croissance de l'agent pathogène puisque le taux d'UFC est similaire chez les lignées transgéniques et chez le génotype sauvage (Figure 33 B). La surexpression de *VvLYK1-1* ou *VvLYK1-3* ne semble donc pas modifier la résistance basale à *Pto*.

4. Discussion

4.1. Les lignées *Atcerk1/VvLYK1* ne restaurent pas la production de FAO chez le mutant *Atcerk1*.

Après un traitement par la chitine, l'expression de *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* ou *VvLYK1-3* chez le mutant *Atcerk1* ne restaure pas la production d'H_2O_2 normalement induite chez le sauvage. Nos résultats précédents ont montré que l'expression de *VvLYK1-3* chez *Atcerk1* ne restaurait pas la phosphorylation des MAPK, ni l'expression du gène de défense *FRK1* après un traitement par la chitine. Il n'est donc pas étonnant de ne pas observer de production d'H_2O_2 sur disques foliaires en réponse à la chitine. En revanche pour les deux autres lignées, nous avons observé que l'expression de *VvLYK1-1* ou *VvLYK1-2* chez le mutant *Atcerk1* permettait de restaurer l'activation des MAPK et l'expression de *FRK1*, démontrant leur rôle dans la perception de la chitine. Néanmoins, la complémentation d'*Atcerk1* par *VvLYK1-1* ou *VvLYK1-2* ne restaure pas la production d'H_2O_2 chez Arabidopsis. Une première hypothèse est que notre méthode de mesure

n'est pas assez fine pour détecter une production faible d'H_2O_2. Il faudrait donc réaliser un dosage plus sensible en utilisant par exemple la fluorescence du produit d'oxydation du 10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine (Amplex® Red) qui permet de détecter des quantités d' H_2O_2 de l'ordre du picomole. Néanmoins, cette production d'H_2O_2 n'étant pas induite chez *V. vinifera*, une autre hypothèse suggère que l'absence du signal H_2O_2 pourrait être associée à des spécificités des récepteurs VvLYK1, particularité transférée avec le PRR dans le fonds génétique d'Arabidopsis. De plus, nous avons observé que l'expression de *VvLYK1-1* ou *VvLYK1-2* chez le mutant *Atcerk1* ne semble pas restaurer complètement la phosphorylation des MAPK ni l'expression du gène de défense *FRK1* à des niveaux similaires à ceux observés chez le sauvage. Ces résultats suggèrent l'existence chez la vigne d'un complexe moléculaire impliqué dans la perception de la chitine qui pourrait nécessiter la présence simultanée de VvLYK1-1 et VvLYK1-2 pour permettre une activation optimale des réponses immunitaires de la plante. L'absence de ce complexe moléculaire complet chez Arabidopsis pourrait expliquer une activation globalement plus faible des réactions de défense en présence d'un seul PRR de vigne. Le croisement des deux lignées transgéniques *Atcerk1/35S::VvLYK1-1* et *Atcerk1/LexA::VvLYK1-2* devrait permettre de vérifier cette hypothèse.

4.2. AtCERK1, VvLYK1-1 et VvLYK1-3 ne participent pas à la résistance basale contre *Botrytis cinerea* et *Pseudomonas syringae pv.* tomato DC3000.

Nos résultats ont montré que VvLYK1-1 jouait un rôle dans la résistance à la pénétration d'*Erysiphe necator*. Wan et al. (2008) ont montré que le mutant *Atcerk1* était plus sensible à l'infection par *Erysiphe cichoracearum* et *Alternaria brassicicola.* En revanche, AtCERK1, VvLYK1-1 et VvLYK1-3 ne semblent pas participer à la résistance basale contre *B. cinerea*. En effet, aucune différence significative du diamètre des lésions causées par le champignon n'a été observée chez le mutant *Atcerk1* ni chez les lignées *Atcerk1/VvLYK* testées. Paparella et al. (2014) ont montré que le mutant *Atlyk3* était plus résistant à l'infection par *B. cinerea,* suggérant l'implication des autres membres de la famille AtLYK dans la résistance à la pourriture grise. De plus, nos résultats mettent en évidence l'augmentation de l'expression des gènes *VvLYK4-1/2*, *VvLYK5-1* et *VvLYK6* en réponse à une infection par *B. cinerea* sur baies, suggérant que ces PRR pourraient jouer

un rôle dans l'interaction avec ce champignon. Un autre VvLYK pourrait donc être impliqué dans la perception de PAMP produits lors de l'interaction avec *B. cinerea*.

De la même manière, aucune différence significative n'a été observée en réponse à l'infection par *Pto* chez le mutant *Atcerk1* ni chez les lignées exprimant *VvLYK1-1* ou *VvLYK1-3*. De manière surprenante, le mutant *Atcerk1* n'est pas plus sensible à l'infection par *Pto* comparé aux plantes sauvages, contrairement aux résultats obtenus par Gimenez-Ibanez et al. (2009) et Willmann et al. (2011). Ces résultats peuvent s'expliquer par des différences de protocoles, notamment l'âge des plantes ou lors des étapes d'inoculation. Néanmoins, Wan et al. (2008) ont également montré que la mutation dans le gène *AtCERK1* n'avait pas d'effet sur l 'infection par *Pto*. De plus notre contrôle positif, le mutant *NahG/npr1*, est bien plus sensible à *Pto* que les plantes sauvages Col-0, suggérant que l'infection a bien fonctionné (Cao et al., 1997; Lawton et al., 1995). Ces résultats mettent en évidence qu'il doit exister d'autres PRR de vigne dont la surexpression constitutive pourrait conduire à une résistance accrue à *Pto*.

Il serait donc intéressant de tester la résistance basale des autres mutants *Atlyk* afin de transformer le ou les mutants d'Arabidopsis plus sensibles à l'infection par *B. cinerea* ou *Pto* avec les gènes orthologues de vigne.

CHAPITRE IV : IDENTIFICATION D'UN NOUVEL ELICITEUR DE L'IMMUNITE DES PLANTES: LES XYLOGLUCANES

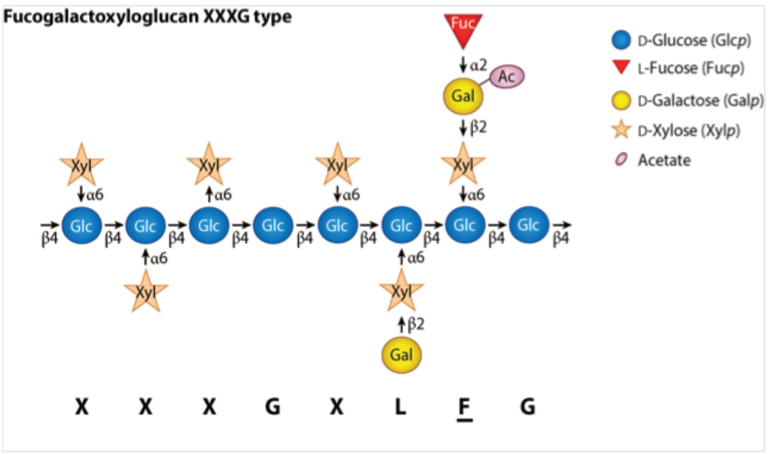
1. Contexte et résultats principaux

1.1. Présentation des xyloglucanes

La paroi primaire est composée d'un réseau complexe de polysaccharides de cellulose, de pectine, d'hémicellulose, de glycoprotéines de structure et dans certains types cellulaires, de lignine (Somerville et al., 2004). Le polysaccharide de base est la cellulose, un homopolymère linéaire constitué de glucoses reliés par des liaisons ß-(1,4), et dont l'assemblage forme les microfibrilles. Les xyloglucanes (Xh) sont les principaux composants de l'hémicellulose chez les angiospermes (Scheller and Ulvskov, 2010) et sont fortement liés aux microfibrilles par des liaisons hydrogène, par des liaisons covalentes lors de réactions de transglycosylation ou en étant piégés dans la microfibrille lors de leur synthèse (Hrmova et al., 2007; Pauly et al., 1999; Valent and Albersheim, 1974). Les Xh sont des hétéro-polysaccharides ramifiés : la chaîne principale formée de glucoses reliés en ß-(1,4) possède des motifs mono-, di- ou trisaccharidiques liés en position 6. Ces branches latérales, dont la composition varie en fonction de l'origine des Xh, possèdent néanmoins une certaine régularité : trois résidus β-D-glucosyles xylosylés consécutifs sont suivis par un glucose non substitué. Les résidus α-D-xylosyles peuvent eux-mêmes portés des unités β-D-galactosyles ou plus rarement des résidus α-L-arabinosyles en position 2. Les résidus D-galactosyles peuvent également être substitués par des unités α-L-fucosyles en position 2 et leur hydroxyle en position 6 peut être acétylé (Figure 34; Pauly and Keegstra, 2016). Une nomenclature a été établie où chaque chaîne latérale associée à son résidu glucosyle est désignée par une lettre (Figure 34; Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).

Les Xh ont plusieurs rôles connus au sein de la plante. Tout d'abord, ils peuvent servir de réserve d'énergie pour les graines lors de la germination, avant que le système photosynthétique ne se mette en place (Edwards et al., 1985; Santos, 2004). Les Xh ont également un rôle structural au sein de la paroi primaire *via* le réseau qu'ils constituent avec les microfibrilles de cellulose, afin de renforcer la paroi (Takeda et al., 2002;

A



B

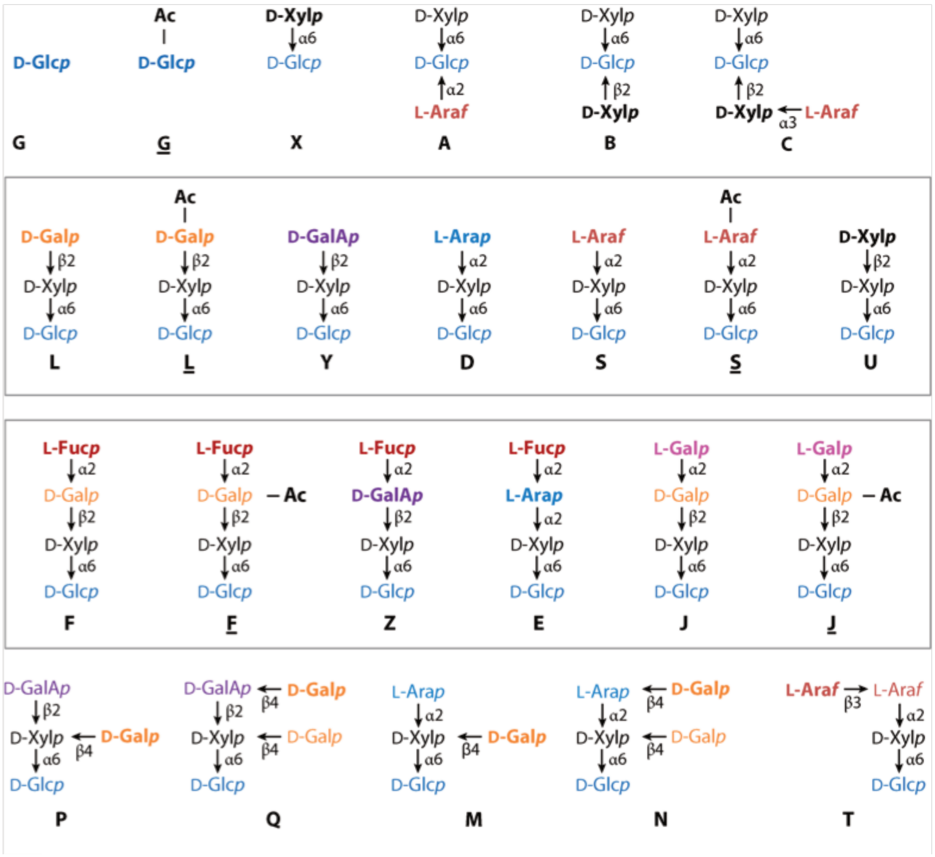


Figure 34: Structure des xyloglucanes (Xh) d'après Pauly and Keegstra (2016).

A. Structure schématique d'un type de Xh : un fucogalactoxyloglucane XXXGXLFG présent dans la paroi primaire des angiospermes. Ac : groupe acétyle ; Fuc : Fucose ; Gal : Galactose ; Glc : Glucose ; Xyl : Xylose.

B. Composition et diversité des chaînes latérales des Xh. Une nomenclature a été établie où chaque chaîne latérale associée à son résidu glucosyle est désignée par une lettre (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). Les chaînes latérales O-acétylées sont soulignées. Ac : groupe acétyle ; Ara : Arabinose ; Fuc : Fucose ; Gal : Galactose ; GalA : Acide Galacturonique ; Glc : Glucose ; Xyl : Xylose ; p : pyranose ; f : furanose.

Whitney et al., 2006). Il a aussi été montré que les Xh de type XXFG inhibent l'élongation des segments d'hypocotyles de pois induite par l'auxine de synthèse 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, suggérant un rôle dans la croissance cellulaire (York et al., 1984). De récentes études montrent que des traitements de suspensions cellulaires de tabac par des Xh induisent une accélération de l'expansion et de la division cellulaire, des modifications de la croissance de la racine primaire ainsi qu'une expression différentielle de 591 gènes dont certains sont considérés comme des gènes de défense codant par exemple pour une Chitinase basique, une protéine JAZ ou une SA méthyle transférase (González-Pérez et al., 2014). Enfin, utilisés à faibles concentrations, les Xh induisent une résistance à certains stress abiotiques, en particulier au froid et au stress hydrique (Salvador et Lasserre, 2010).

1.2. Contexte et objectifs de l'étude

Dans le cadre du projet ANR Plant KBBE « PATRIC », 19 molécules ont été testées pour leur capacité à induire sous serre une protection de la vigne contre le mildiou. Les Xh se sont révélés être des éliciteurs actifs sur vigne. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude a été d'une part, d'évaluer l'efficacité des Xh à induire des réponses de défense chez la vigne et d'autre part, de caractériser leur mode d'action chez la plante modèle Arabidopsis.

1.3. Résumé de la publication

Dans un premier temps, nous avons focalisé ce projet de recherche sur l'étude des évènements de signalisation induits par les Xh chez la vigne. La caractérisation des Xh, en particulier leur pureté et l'absence de contamination par des acides galacturoniques (fragments de pectine) ou de cellobioses (fragments de cellulose) ont été vérifiées par 3 techniques complémentaires : la chromatographie ionique avec détecteur par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD), la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF et la résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H-RMN). Nous avons mis en évidence que les Xh induisent, sur suspensions cellulaires de vigne, la phosphorylation de MAPK, la production de resvératrol ainsi que l'activation de gènes

de défense tels que *PAL* et *STS*, tous deux codant des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de cette phytoalexine. Nous avons également montré qu'un prétraitement de 48 h par les Xh induisait une résistance sur disques foliaires contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea*. Afin de comprendre plus en détails les mécanismes impliqués dans la résistance induite par les Xh, nous avons ensuite étudié les évènements de signalisation et de défense activés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Nos résultats indiquent que les Xh sont également capables d'induire chez Arabidopsis la phosphorylation de deux MAPK, identifiées comme étant MPK3 et MPK6, l'accumulation des transcrits de gènes de défense (*PR1* et *PAD3)* et un dépôt de callose dépendant de la callose synthase PMR4. La résistance induite contre *B. cinerea* a également été confirmée sur plantes d'Arabidopsis où elle s'accompagne d'une surexpression des gènes de défense *PR1*, *PAD3*, *PR2* et *PDF1.2*, principalement à 48 h après inoculation. Enfin, en utilisant des mutants d'Arabidopsis perturbés dans différentes voies de signalisation et de défense, nous avons identifié que les voies des phytoalexines, du SA, du JA et de l'ET étaient impliquées dans la résistance induite par les Xh contre *B. cinerea*. Ces résultats ont été acceptés pour publication dans Frontiers in Plant Science (https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01725).

frontiers in Plant Science | Plant Microbe Interactions

Front. Plant Sci. | doi: 10.3389/fpls.2018.01725

The cell wall-derived xyloglucan is a new DAMP triggering plant immunity in Vitis vinifera and Arabidopsis thaliana.

Justine Claverie[1], Suzanne Balacey[1], Christelle Lemaître-Guillier[1], Daphnée Brulé[1], Lucie Granet[1], Elodie Noirot[1], Xavier Daire[1], Marie-Claire Héloir[1], Benoît Darblade[2] and Benoît Poinssot[1]*

[1]INRA UMR1347 Agroécologie, France
[2]Elicityl, France

Damage-associated molecular patterns (DAMPs) are endogenous molecules that can activate the plant innate immunity. DAMPs can derive from the plant cell wall, which is composed of a complex mixture of cellulose, hemicellulose and pectin polysaccharides. Fragments of pectin, called oligogalacturonides (OG), can be released after wounding or by pathogen-encoded cell wall degrading enzymes (CWDEs) such as polygalacturonases (PGs). OG are known to induce innate immune responses, including the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), production of H_2O_2, defense gene activation and callose deposition. Thus we hypothesized that xyloglucans (Xh), derived from the plant cell wall hemicellulose, could also act as an endogenous elicitor and trigger a signaling cascade similar to OG. Our results indicate that purified Xh elicit MAPK activation and immune gene expression in grapevine (Vitis vinifera) and Arabidopsis (Arabidopsis thaliana) to trigger induced resistance against necrotrophic (Botrytis cinerea) or biotrophic (Hyaloperonospora arabidopsidis) pathogens. Xh also induce resveratrol production in grapevine cell suspension and callose deposition in Arabidopsis which depends on the callose synthase PMR4. In addition, we characterized some signaling components of Xh-induced immunity using Arabidopsis mutants. Our data suggest that Xh-induced resistance against B. cinerea is dependent on the phytoalexin, salicylate, jasmonate and ethylene pathways.

Keywords: DAMP-triggered immunity, induced resistance, MAPK (Mitogen-activated protein kinase), Botrytis cinerea, elicitor

Received: 17 Aug 2018; **Accepted:** 06 Nov 2018.

2. Publication 2

The cell wall-derived xyloglucan is a new DAMP triggering plant immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*.

[1]Justine Claverie, [1]Suzanne Balacey, [1]Christelle Lemaître-Guillier, [1]Daphnée Brulé, [1]Annick Chiltz, [1]Lucie Granet, [1]Elodie Noirot, [1]Xavier Daire, [2]Benoît Darblade, [1]Marie-Claire Héloir, [1]Benoit Poinssot✉.

[1]Agroécologie, Agrosup Dijon, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, CNRS ERL 6003, Dijon, France.
[2]Elicityl, 746 avenue Ambroise Croizat, Crolles, France.

One sentence summary: Xyloglucan derived from the plant cell wall hemicellulose elicits MAPK activation and immune gene expression in grapevine (*Vitis vinifera*) and Arabidopsis to trigger induced resistance against necrotrophic (*Botrytis cinerea*) or biotrophic (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) pathogens.

Author Contributions: JC, SB, CLG performed most of the experiments; CLG, XD and BP conceived the original screening and research plans; DB, AC, MCH and BD provided technical assistance; MCH, XD and BP supervised the experiments, JC, SB, EN, LG, XD, MCH and BP designed the experiments and analysed the data; JC, XD, BD and BP conceived the project and wrote the article with contributions of all the authors.

✉Corresponding author: benoit.poinssot@inra.fr

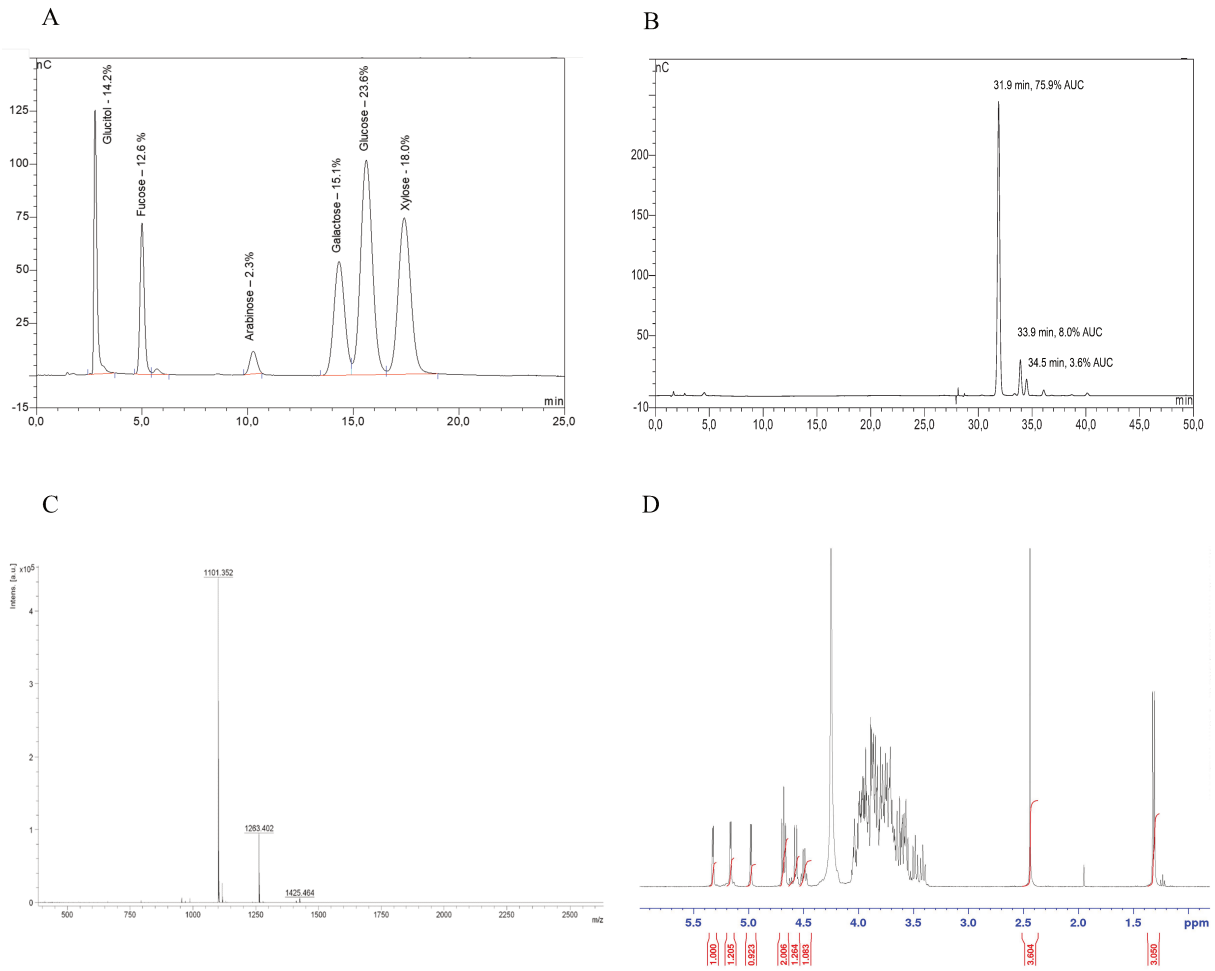
Frontiers in Plant Science

Abstract

Damage-associated molecular patterns (DAMPs) are endogenous molecules that can activate the plant innate immunity. DAMPs can derive from the plant cell wall, which is composed of a complex mixture of cellulose, hemicellulose and pectin polysaccharides. Fragments of pectin, called oligogalacturonides (OG), can be released after wounding or by pathogen-encoded cell wall degrading enzymes (CWDEs) such as polygalacturonases (PGs). OG are known to induce innate immune responses, including the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), production of H_2O_2, defense gene activation and callose deposition. Thus we hypothesized that xyloglucans (Xh), derived from the plant cell wall hemicellulose, could also act as an endogenous elicitor and trigger a signaling cascade similar to OG. Our results indicate that purified Xh elicit MAPK activation and immune gene expression in grapevine (*Vitis vinifera*) and Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) to trigger induced resistance against necrotrophic (*Botrytis cinerea*) or biotrophic (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) pathogens. Xh also induce resveratrol production in grapevine cell suspension and callose deposition in Arabidopsis which depends on the callose synthase PMR4. In addition, we characterized some signaling components of Xh-induced immunity using Arabidopsis mutants. Our data suggest that Xh-induced resistance against *B. cinerea* is dependent on the phytoalexin, salicylate, jasmonate and ethylene pathways.

Introduction

Plant resistance is based on their ability to perceive microorganisms and induce immune responses to stop their invasion. This recognition is possible *via* the perception of eliciting molecules released during the plant/pathogen interaction. These elicitors, called MAMPs or PAMPs (Microbe or Pathogen-Associated Molecular Patterns), comprise conserved molecular patterns such as peptides of bacterial flagellin (flg22) or fungal chitin oligomers (Newman et al., 2013; Brulé et al., 2018) and activate a set of defense-associated responses termed PAMP-triggered immunity (PTI; Jones and Dangl, 2006). Plants are also able to distinguish the non-self from the damaged-self *via* a complex recognition system (Trdá et al., 2015). Thus, endogenous elicitors released from the wounded host have been described as DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) including extracellular ATP, peptides or fragments of cell walls (Heil and Land, 2014). Plant cell walls are composed of a complex mixture of polysaccharides, such as cellulose, hemicellulose and pectin. Pectin-derived oligogalacturonides (OG) are well-characterized DAMPs as they elicit a broad range of defense responses in several plant species (Ferrari et al., 2013). In the model plant *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), OG trigger the phosphorylation of two mitogen-activated protein kinases (MAPK), called *At*MPK3 and *At*MPK6 (Denoux et al., 2008). *At*MPK3 is involved in the basal resistance against *Botrytis cinerea* whereas *At*MPK6 is essential for the OG- or flg22-induced resistance against this pathogen (Galletti et al., 2011). Moreover, OG induce a nitric oxide production (Rasul et al., 2012) and an oxidative burst mediated by the NADPH oxidase Respiratory Burst Oxidase Homolog D (AtRbohD; Rasul et al., 2012). Activation of these signaling components leads to a defense transcriptome reprogramming including the transcription of *Phytoalexin Deficient 3* (*PAD3;* Galletti et al., 2008) and *Pathogenesis Related 1* (*PR-1*; Manzoor et al., 2013). Later, a callose production leads to a cell wall reinforcement dependent on the callose synthase Powdery Mildew Resistant 4 (PMR4; Ferrari et al., 2013) and AtRbohD (Galletti et al., 2008). Last, OG are able to trigger resistance of *A. thaliana* and grapevine against *B. cinerea* (Aziz et al., 2004; Ferrari et al., 2007), protection of wheat against powdery mildew (Randoux et al., 2009) and potato against *Pectobacterium carotovorum* (Davidsson et al., 2013). Interestingly, the expression of a fungal PG coupled to a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in transgenic Arabidopsis demonstrates that the *in vivo* release of OG is sufficient to trigger the plant immunity (Benedetti et al., 2015). The mechanism of OG perception was characterized in Arabidopsis



E

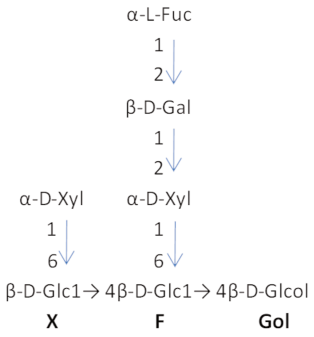


Figure 35 : Xyloglucan (Xh) characterization.
A. HPAEC-PAD PA1 chromatogram of hydrolysed Xh. Xh monosaccharide composition is based on glucitol, fucose, arabinose, galactose, glucose and xylose. The specific identification of monosaccharides is based on internal standards. Indicated percentages correspond to dry weight of each monosaccharide when 100 mg of Xh are injected based on calibration curves for each standard. **B**. HPAEC-PAD PA100 chromatogram of native Xh. The main peak (75.9% AUC) at 31.9 min, corresponds to heptamaloxyloglucan DP7 XFGol and the two minor peaks at 33.9 min, and 34.5 min, correspond to oligomers of DP8 and DP9, respectively. No free monosaccharides are detected in Xh. **C**. Xh MALDI-TOF spectrum (ES+): Heptamaloxyloglucan (DP7, XFGol) MS (ES+): m/z = 1101 $[M+Na]^+$, DP8 (LFGol) MS (ES+): m/z = 1263 $[M+Na]^+$, DP9 (GLFGol) m/z = 1425 $[M+Na]^+$. **D**. ^{1}H-NMR spectrum of Xh. ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O). 5.31 (d, 1H, H-1Fuc), 5.15 (d, 1H, H-1Xyl'), 4.98 (d, 1H, H-1Xyl''), 4.68 (dd, 2H, H-1Glc',H-1Glc''), 4.58 (d, 1H, H-1Gal), 4.5 (d, 1H, H-5Fuc), 2.42 (m, 4H, internal standard : ISTD), 1.30 (d, 3H, 3.05, Fucose methyl). **E**. Deduced structure of the main purified xyloglucan (heptamaloxyloglucan or Xh DP7) presented according to the oligosaccharide nomenclature described by Fry et al. (1993). Structures of the minor components are presented in supplemental information (Fig.S6).

by the identification of the Wall-Associated Kinase (WAK) family. First, both WAK1 and WAK2 ectodomains have been shown to bind pectin *in vitro* (Kohorn et al., 2009), then WAK1 has been hypothesized to act as a receptor of OG (Decreux and Messiaen, 2005; Cabrera et al., 2008). WAK1 is composed of an extracellular domain containing epidermal growth factor motifs, a transmembrane domain and an intracellular Ser/Thr kinase domain (Ferrari et al., 2013). Finally, a chimeric receptor approach revealed that WAK1 acts *in vivo* as a receptor of OG (Brutus et al., 2010).

Besides OG, other plant cell wall compounds, such as the cellulose-derived oligomers of cellobiose and cellodextrins, act as DAMP and trigger defense-like responses in Arabidopsis and grapevine, respectively (Aziz et al., 2007; Souza et al., 2017). Results indicate that cellobiose triggers a signaling cascade that shares some similar responses with OG. Thus, cellobiose treatment leads to the activation of MAPKs, an early and transient calcium variation and the expression of the defense-related gene *WRKY30* (Souza et al., 2017). Global Arabidopsis transcriptome profiles are very similar after cellobiose or OG treatment. However, cellobiose does not stimulate reactive oxygen species (ROS) production or callose deposition (Souza et al., 2017). At the opposite, cellodextrins (linear β-1,4 glucans) elicit ROS production and the expression of grapevine defense-related genes leading to induced resistance against *B. cinerea* (Aziz et al., 2007).

Xyloglucan oligosaccharides (Xh) are the major components of hemicellulose contained in the cell wall of (dicotyledonous) plants. Previous studies indicated that Xh may play a role in the regulation of plant growth and development in different plant species (Fry et al., 1993; Vargas-Rechia et al., 1998). Indeed, treatment with Xh of tobacco cell cultures and whole plants results in accelerated cell elongation and division, changes in primary root growth and up-regulation of defense-related gene expression (González-Pérez et al., 2014). Moreover, Xh can increase plant resistance to abiotic stress, in particular cold or water stress, when used at low concentrations (Salvador and Lasserre, 2010). The aim of this study was to evaluate the efficacy of Xh to trigger the grapevine (*Vitis vinifera*) immunity and to decipher its mode of action in the model plant *Arabidopsis thaliana*. First, eliciting properties of Xh were investigated in grapevine cells by analyzing some immune responses and efficacy of Xh to induce resistance was evaluated in the grapevine/*B. cinerea* interaction. Then, Arabidopsis plants were used to characterize some signaling components involved in the Xh-induced immunity. In this study, OG were used as a positive control.

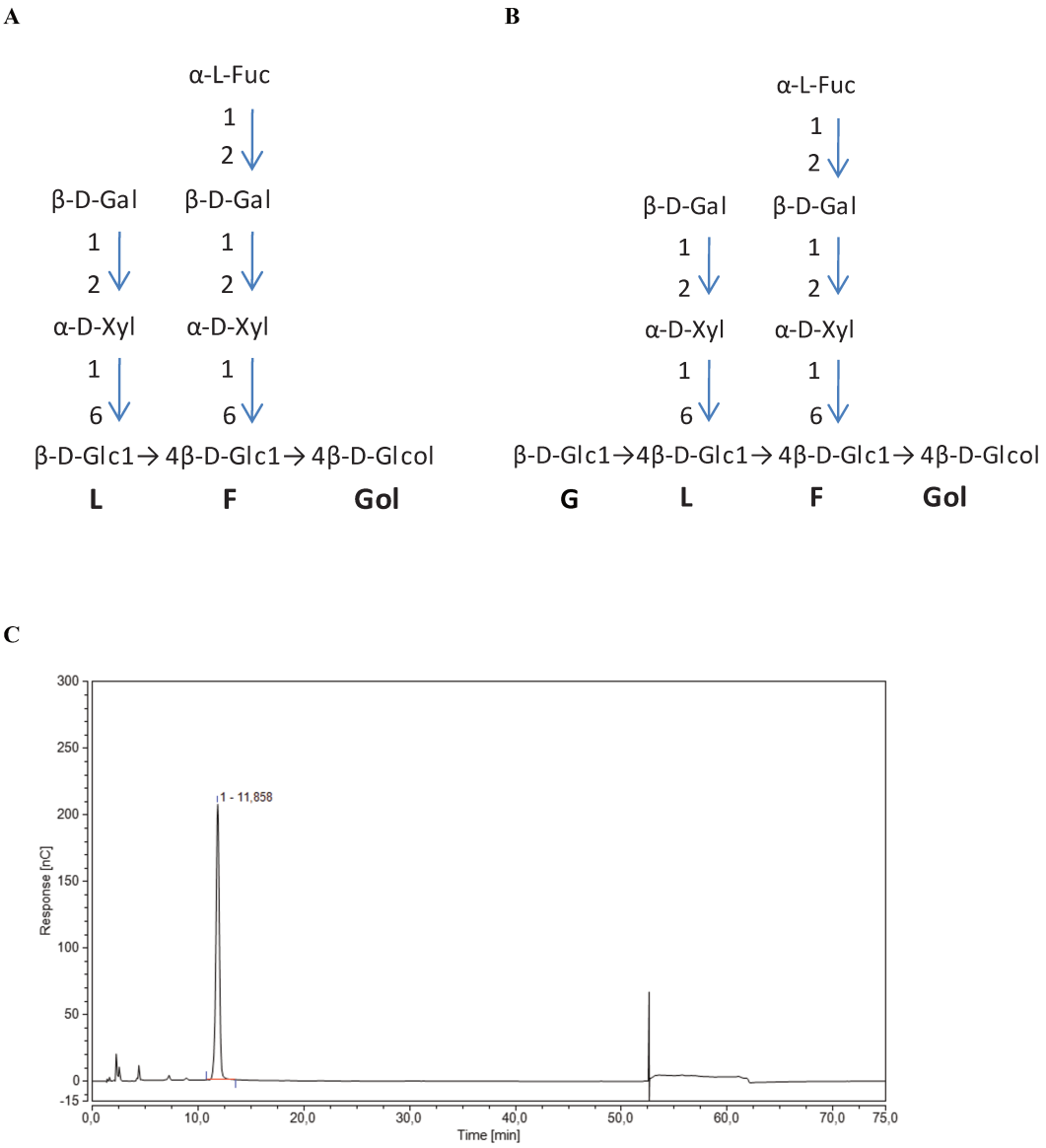


Figure S6: Structures of the minor components of the purified xyloglucan.
A. Structure of the purified xyloglucan DP8 (LFGol; retention time: 33.9 min, 8.0% AUC) according to the oligosaccharide nomenclature described by Fry *et al.* (1993). **B.** Structure of the purified xyloglucan DP9 (GLFGol; retention time 34.5 min, 3.6% AUC) according to the oligosaccharide nomenclature described by Fry *et al.* (1993). **C**. HPAEC-PAD PA100 chromatogram of a cellobiose standard showing a retention time of 11,86 min. Injection has been performed at 50 mg/L.

Results

Quality control of the purified xyloglucans

The Xh used in this study are highly purified xyloglucan oligomers obtained by enzymatic extraction and purification from apple pomace. To perform a detailed characterization of Xh, three complementary analytical methods have been used: high pressure anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometry detection (HPAEC-PAD), matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H-NMR). Because the separation of the α- and β-anomers of reducing oligosaccharides leads to complicated chromatograms and difficult interpretations in ^{1}H-NMR analysis, xyloglucans have been reduced by $NaBH_4$ at the first step of the process. This explains the existence of glucitol (sorbitol) in the chromatogram realized after the acid hydrolysis of the Xh by trichlorofluoroacetic acid (Fig. 35A). Thus, determination of monosaccharide composition performed by HPAEC-PAD on PA1 column showed that the extract composition is based on glucitol (14.2% of dry weight (DW)), fucose (12.6% DW), arabinose (2.3% DW), galactose (15.1% DW), glucose (23.6% DW) and xylose (18.0% DW) monosaccharides (Fig. 35A). The different monosaccharides obtained are corresponding to the previously described apple xyloglucan composition (Watt et al., 1999), except that traces of arabinose have been more described for arabinose-containing xyloglucans in sycamore (Kiefer et al., 1990) or different monocotyledons (Hsieh and Harris, 2009). The separation of the purified Xh oligomers realized by HPAEC-PAD PA100 revealed that the main peak on the chromatogram (31.9 min, 75.9% of the Area Under the Curve (AUC), Fig. 35B) was associated with the main compound detected by mass spectrometry (*m/z* = 1101 [M+Na^+], Fig. 35C). This mass is consistent with a xyloglucan oligomer structure with a degree of polymerization of 7 (DP 7). The other two minor peaks (at 33.9 min, 8.0% AUC and 34.5 min, 3.6% AUC; Fig. 35B) were associated to the two compounds detected by mass spectrometry with *m/z* = 1263 and 1425 (Fig. 35C), which correspond to xyloglucan oligomers of DP8 and DP9, respectively. This characterization was supported by the complementary analysis of the ^{1}H-NMR spectrum (Fig. 35D) that enabled the identification of heptamaloxyloglucan or XFGol (according to xyloglucan nomenclature described by Fry et al. (1993)), as the main component of the extract. Heptamaloxyloglucan (Xh DP7) has a backbone of three ß1,4-linked glucose residues. Glucoses Glc' and Glc'' are substituted with α1,6-linked xylose sidechains and the xylose' is capped by a galactose residue followed by a fucose residue (Fig. 35D, E). Moreover

	Expected quantities (mol)	(%DW)	Observed quantities (%DW)
Fucose	1	13.5	12.6
Galactose	1	15.0	15.1
Glucose	2	30.1	23.6
Xylose	2	24.5	18.0
Glucitol	1	16.9	14.2
Arabinose	0	0.0	2.3

Table S4 : Expected and observed relative amounts of each monosaccharide after acid hydrolysis of Xh.

Percentages of observed dry weight (DW) have been determined based on the analysis of the HPAEC-PAD PA1 chromatogram presented in Fig. 35A. The expected quantities are based on the theoretical relative amount of each monosaccharide in the heptamaloxyloglucan (Xh DP7) described in Fig. 35E.

,the relative amount of each monosaccharide determined by HPAEC-PAD on PA1 column (Fig. 35A) is consistent with the expected ratio in the Heptamaloxyloglucan (Table S4).The two other minor components have been identified as xyloglucan oligomers LFGol (DP8) and GLFGol (DP9; Fig. S6). The ^{1}H-NMR signal for arabinose was too low to determine precisely its location in a putative alternative oligomer that might be present at very low level in Xh. Of importance, the absence of galacturonic acid detected by these different analytical approaches supports that Xh are free of OG. Similarly, the HPAEC-PAD PA100 realized in the same conditions confirmed that a cellobiose standard possesses a different retention time (11.86 min) than Xh oligomers (Fig. S6C). So these analyses excluded a putative contamination of the purified Xh by OG or cellobiose.

Xyloglucan-triggered immune responses in grapevine

As MAPKs play a key role in innate immune signaling, their immunodetection in grapevine cells treated with Xh was analyzed using an antibody raised against a conserved phosphorylated peptide contained in the human active MAPKs. Xh treatment induced a dose-dependent MAPK phosphorylation in grapevine cell suspensions, with a stronger signal at 1 mg/ml (Fig. S7A). The xyloglucan concentration of 1 mg/ml was then used to study the defense-related events in grapevine. The time course of activation revealed a rapid and transient phosphorylation of two MAPKs with relative molecular masses of 49 and 45 kDa, respectively (Fig. 36A). Their activation was detected within 5 min of treatment, peaked at 10 min and then decreased after 15 min.

Another early defense response is the generation of reactive oxygen species (ROS). Using a luminol-peroxidase based assay to quantify hydrogen peroxide, we investigated whether grapevine cells were able to produce H_2O_2 in response to Xh treatment. As previously shown by Aziz *et al*. (2004), the OG-mediated oxidative burst was strongly induced compared to control treatment (Fig.36B). Conversely, no H_2O_2 production was detected in Xh-treated grapevine cell suspensions (Fig. 36B).

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) is a key enzyme of the phenylpropanoid pathway. Downstream to PAL, stilbene synthase (STS) is responsible for the last step of resveratrol biosynthesis, the main phytoalexin produced in grapevine (Coutos-Thevenot et al., 2001). In OG-elicited cells, *PAL* and *STS* transcript accumulation was detected after 1 h of treatment (42 and 29-fold increase, respectively) before decreasing until the end of the experiment (Fig. 36C and D). In Xh-treated cells, *PAL* and *STS* transcripts were also detected

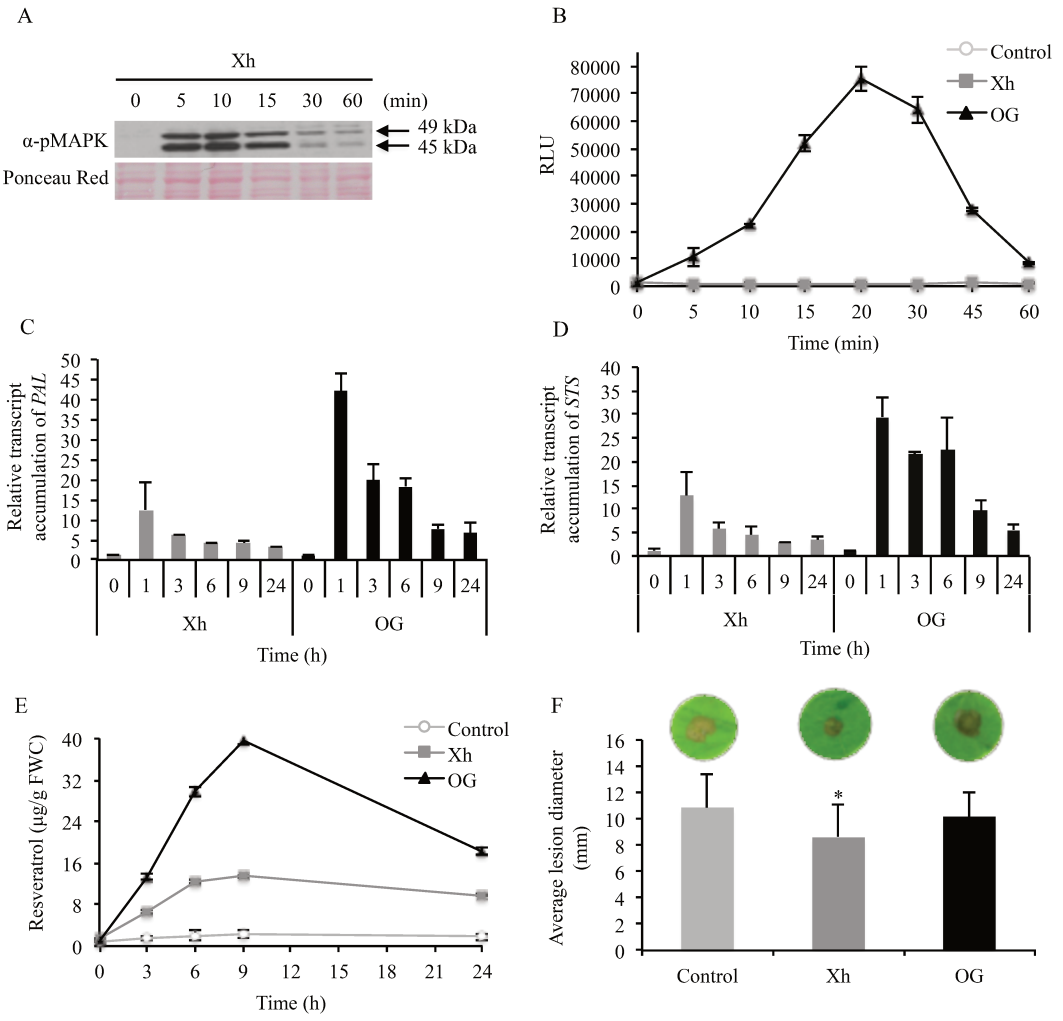


Figure 36: Immune responses triggered by Xh in grapevine (*Vitis vinifera*) cells and Xh-induced resistance in grapevine leaf disks.

A. Phosphorylation of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in grapevine cells treated by Xh (1 mg/ml) detected by immunoblotting with α-pERK1/2. Results are from one representative experiment out of three. **B.** H_2O_2 production in grapevine cells treated with Xh or OG (1 mg/ml) detected by chemiluminescence using a luminol-peroxidase based assay. Data represent the mean ± SD of one representative experiment out of three. **C. D.** Relative expression kinetics of two defense-related genes encoding for phenylalanine ammonia lyase (*PAL*; **C**) and stillbene synthase (*STS*; **D**) in grapevine cells treated with Xh or OG (1 mg/ml). Results represent the mean ± SD of three biological replicates and the normalized transcript levels were arbitrary set as 1 for time 0. **E.** Resveratrol quantification in the culture medium of grapevine cells treated with Xh or OG (1 mg/ml). Data represent the mean of three independent experiments ± SD. **F.** Xh-induced resistance against *Botrytis cinerea*. Leaf disks were incubated for 48 h on aqueous solutions containing Xh or OG (5 mg/ml) before inoculation with conidial suspension (6 µl-droplet at 5.10^4 conidia/ml) of *B. cinerea* (40 disks per condition). Disease assessment was determined measuring the average diameter of lesions formed 3 days post inoculation (dpi). Data represent the average diameter of lesions ± SD of 3 independent experiments. Asterisks indicate significantly different values between treated *vs* control treatments according to Student *t*-test ($P< 0.05$). A representative leaf disk for each treatment is shown.

after 1 h of treatment, reaching a 12- and 13-fold accumulation, respectively, before slowly declining (Fig. 36C and D). The resveratrol accumulated in the extracellular medium, peaked at 9 h after Xh and OG treatments (13 and 40µg/g Fresh Weight of Cells (FWC), respectively; Fig. 36E). The amount of resveratrol was constant and very low in control cells (≤ 2µg/g FWC).

To know if the immune responses triggered by Xh lead to resistance, the efficacy of Xh-induced resistance was also investigated. Grapevine leaf disks were treated with Xh or OG for 48 h prior to inoculation with the necrotrophic fungus *B. cinerea*. At 3 days post inoculation (dpi), Xh treatment triggered a significant induced resistance against *B. cinerea* as it reduced by about 20% the average lesion diameter compared to control plants (Fig. 36F). On the other hand, OG treatment did not induce a significant resistance against *B. cinerea* on grapevine leaf disks. Furthermore, Xh did not significantly modify the growth of *B. cinerea in vitro* (Fig. S8), excluding a putative direct toxic effect on the conidia germination or the mycelial growth. To confirm that the elicitor activity was linked to the oligomer structure of xyloglucans, an acid hydrolysis of Xh was performed then the induced resistance against *B. cinerea* was tested. Our results indicated that the hydrolyzed Xh (Xh_H) lost their resistance inducing activity confirming that their oligomer structures are necessary to trigger plant immunity (Fig. S9A).

Xh elicit MPK3 and MPK6 phosphorylation, immune gene expression and resistance against *B. cinerea* in Arabidopsis

To further investigate the mode of action of Xh, we performed a similar dose-dependent MAPK phosphorylation assay in *Arabidopsis thaliana* (Fig. S7B). Also in this case a strong phosphorylation signal was obtained for a Xh concentration between 0.5 and 1 mg/ml (Fig. S7B). The concentration of 1 mg/ml was thereafter used to study the defense-related events in Arabidopsis (Fig. 37). Phosphorylation of two MAPKs with relative molecular masses of 47 and 43 kDa, respectively, was visible at early time points, with a maximum at 10 min after Xh treatment (Fig. 37A, upper lane).

In order to identify the two MAPKs phosphorylated in response to Xh, we used *Arabidopsis mpk3* and *mpk6* mutants, respectively deleted in MPK3 or MPK6. Fig. 37A (lower lane) indicated that the two MAPKs phosphorylated in response to Xh are MPK3 and MPK6 as one immuno-detected band disappeared in each corresponding mutant *mpk3* or *mpk6*.

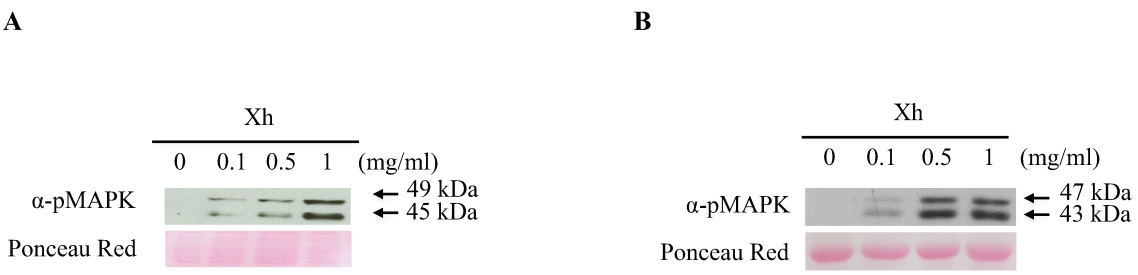


Figure S7: MAPKs phosphorylation induced by Xh in grapevine cells (A) and Arabidopsis plants (B).

A. Dose-dependent Xh–induced MAPK activation in grapevine (*V. vinifera*) cells at 10 min after treatment at different concentration (0.1, 0.5 and 1 mg/ml) detected by immunoblotting with α-pERK1/2. Equal protein loading was checked by Ponceau red staining. Results are from one representative experiment out of two. **B.** Dose-dependent Xh–induced MAPK activation in Arabidopsis plants at 10 min after treatment at different concentrations (0.1, 0.5 and 1 mg/ml) detected by immunoblotting with α-pERK1/2. Equal protein loading was checked by Ponceau red staining. Results are from one representative experiment out of two.

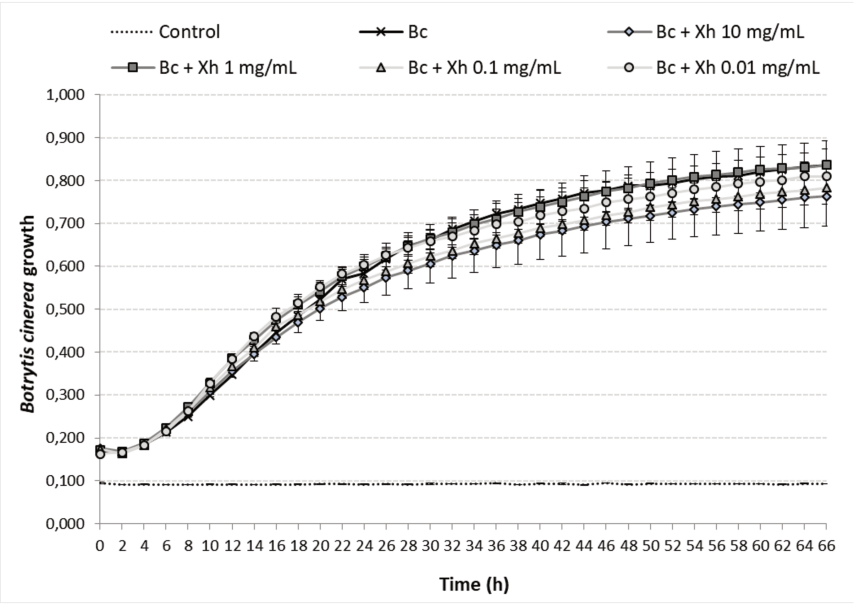


Figure S8: **Toxicity assay of Xh on the *B. cinerea* growth *in vitro*.**

B. cinerea conidia (2.10^5 conidia/ml) were untreated (Bc) or treated *in vitro* with Xh at 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml and mycelial growth was measured by optical density at 492 nm (microplate reader Bioscreener) during 66 h of treatment. Control corresponds to Xh at 10 mg/ml without *B. cinerea* conidia. Data represent the mean ± SD of triplicate assays. Results are representative of 3 independent experiments. No significant difference found between untreated *B. cinerea* vs *B. cinerea* treated with Xh according to Student's *t*-test ($P< 0.05$).

As previously observed in grapevine, no H_2O_2 signal was detected in response to Xh in Arabidopsis cell suspensions (Fig. 37B). Nevertheless, our results confirmed that OG induce an oxidative burst in Arabidopsis (Fig. 37B), as described previously (Galletti et al., 2008; Dubreuil-Maurizi et al., 2011; Rasul et al., 2012).

Elicited plants undergo transcriptional reprogramming leading to defense-related gene expression such as *Pathogenesis-Related protein 1* (*PR1*) and *Phytoalexin Deficient* 3 (*PAD3*), *PR1* being often considered as a SA marker gene (Maleck et al., 2000). *PAD3* encodes the cytochrome P450 CYP71B15 enzyme which catalyzes the last step of the biosynthesis of the Arabidopsis phytoalexin camalexin (Schuhegger et al., 2006). As shown in Fig. 37 (C, D), our data indicate that Xh treatment resulted in a high accumulation of *PR1* transcripts at 8 and 24 h post-treatment (hpt) whereas *PAD3* transcripts accumulated at 3 and 8 hpt.

To investigate the efficacy of Xh in preventing plant infection, protection assays against the necrotrophic fungus *B. cinerea* have been performed on Arabidopsis plants. As previously described by Ferrari et al. (2007), OG treatment decreased by ~40% the *B. cinerea* lesion diameter at 3 dpi (Fig. 37E). Interestingly, Xh treatment also strongly reduced the *B. cinerea* lesion diameter by ~50% at 3 dpi (Fig. 37E). As expected, the hydrolysed Xh (Xh_H) was also unable to trigger the induced resistance against *B. cinerea* in Arabidopsis (Fig. S9B).

Xh trigger a PMR4-dependent callose deposition in Arabidopsis and induce the over-expression of defense genes during *B. cinerea* infection

To determine if the Xh treatment triggers callose deposition, Arabidopsis plants were sprayed with Xh or OG two days before inoculation with *B. cinerea* and stained with aniline blue for callose visualization at 3 dpi. Compared to control, Xh- and OG-treated plants showed a significant increase of callose deposition 3 d after *B. cinerea* inoculation (Fig. 38A).

During plant pathogen response, *PMR4* (*Powdery Mildew Resistant 4*) encodes the callose synthase responsible for the deposition of callose in papillae (Nishimura et al., 2003). Compared to WT Col-0 plants, Xh treatment in the *pmr4* mutant resulted in a dramatic decrease of callose deposition indicating that Xh-triggered callose production is dependent on PMR4 (Fig. 38B).

As we demonstrated that Xh treatment directly elicits the expression of defense genes such as *PR1* and *PAD3* in Arabidopsis, we investigated if immune genes were also induced in Xh-treated plants challenged with *B. cinerea*. Compared to control infected plants, data

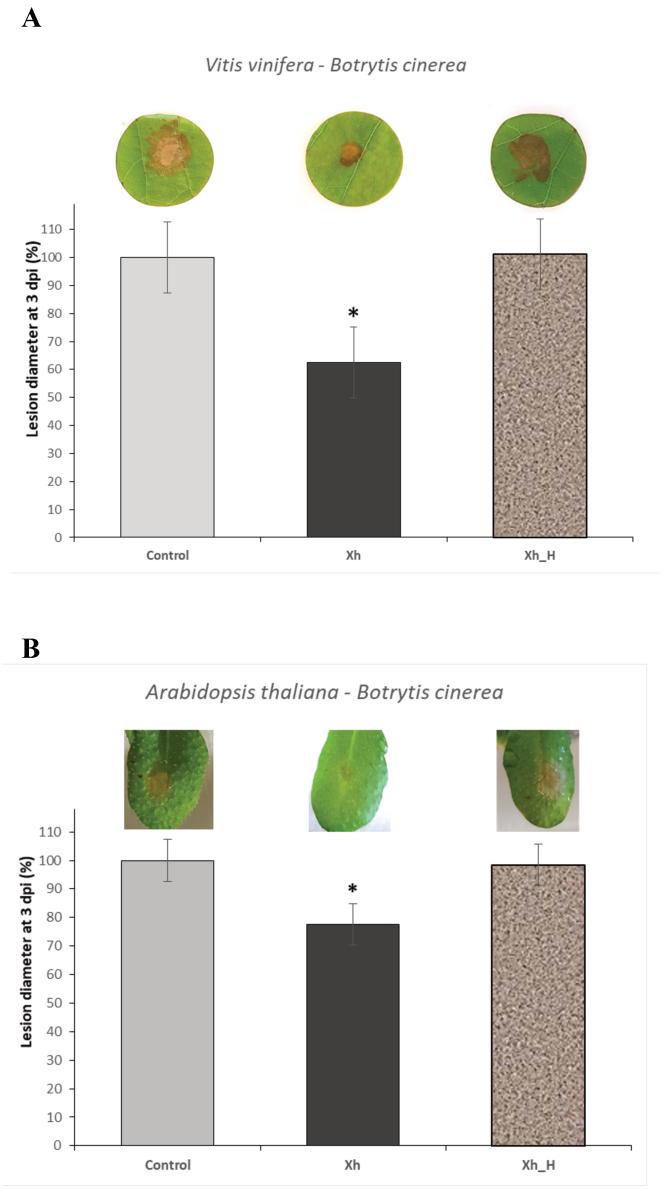


Figure S9: Loss of induced resistance in grapevine and Arabidopsis when the Xh undergo acid hydrolysis

Xh was submitted to an acid hydrolysis and induced resistance against *B. cinerea* was tested in grapevine (**A**) or Arabidopsis (**B**). **A.** *V. vinifera* leaf disks were incubated for 48 h on aqueous solutions containing water (control), Xh (5 mg/ml) or hydrolysed Xh (Xh_H, 5 mg/ml) before inoculation with a 6-µL droplet of a conidial suspension (5.10^4 conidia/ml) of *B. cinerea* (40 disks per condition). Disease assessment was determined measuring the average diameter of lesions formed 3 days post inoculation (dpi) and reported to the water control, set as 100%. **B.** Two days after treatment by spraying with water (control), Xh (2.5 mg/ml) or hydrolysed Xh (Xh_H, 2.5 mg/ml), *A. thaliana* Col-0 plants were inoculated with *B. cinerea* (6-µL droplet at 5.10^4 conidia ml^{-1}) and disease symptoms were measured at 3 dpi and reported to the water control, set as 100%. Data represent the average diameter of lesions ± SD (40 inoculation sites per condition). Similar results were obtained in at least two independent biological experiments for each plant species. Asterisks indicate significantly different values between treated vs control plants according to Student's *t*-test ($P< 0.05$). A representative image for each modality is shown.

showed a stronger accumulation of transcripts encoding *PR1*, *PAD3, PR2* and *plant defensin 1.2* (*PDF1.2*) mainly at 48 h post-inoculation (hpi; Fig. 38C, D).

Xh-induced resistance to *B. cinerea* infection is dependent on phytoalexin, SA, JA and ethylene pathways

To determine the different pathways involved in this Xh-induced resistance, we used Arabidopsis deficient mutants. The *cyp71A13* mutant is missing the CYP71A13 enzyme that catalyzes the conversion of indole acetaldoxime to indole-3-acetonitrile in the camalexin synthetic pathway (Nafisi et al., 2007). The *phytoalexin deficient 3* (*pad3*) mutant is unable to synthesize the cytochrome P450 catalyzing the final step in camalexin biosynthesis (Schuhegger et al., 2006). In these two mutants deficient in camalexin synthesis (*cyp71A13* and *pad3*), Xh was unable to induce resistance as this treatment did not significantly decrease the *B. cinerea* lesion size that is normally observed in WT plants (Fig. 39). We also used SA-disrupted mutants such as *sid2-1*, blocked in the isochorismate dependent-SA biosynthetic pathway (Nawrath and Métraux, 1999) and *npr1*, unable to bind SA (Wu et al., 2012). Our data showed that the Xh-induced resistance was not active in these two Arabidopsis deficient mutants of the SA-pathway (*sid2-1* and *npr1*; Fig. 39). The *dde-2* mutant is defective in the *Allene Oxide Synthase* (*AOS*) gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway (von Malek et al., 2002) whereas *coi1-40* is deficient in the JA co-receptor Coronatine-Insensitive 1 (COI1) required for the known responses to this hormone (Katsir et al., 2008). Xh pretreatment on infected JA-deficient mutants *dde-2* and *coi1-40* did not significantly reduce the *B. cinerea* lesion diameter (Fig. 39) demonstrating the essential role of the JA pathway in the Xh-triggered immunity against *B. cinerea*. We then investigated the role of the ethylene pathway in Xh-induced resistance against this pathogen. EIN2 is a key component in the ethylene signaling pathway, as demonstrated by completely ethylene-insensitive phenotypes of the *ein2* null mutants (Li et al., 2015). Xh treatment did not reduce the *B. cinerea* lesion size in this ethylene mutant (*ein2*; Fig. 39). All these results suggest that camalexin, salicylic acid, jasmonic acid and ethylene play a role in the Xh-induced resistance against *B. cinerea.* To further investigate the role of callose and ROS production in the Xh-triggered immune responses, we also performed protection assays in *pmr4* and in *rbohD*, a mutant impaired in the PAMP-triggered ROS production via the Respiratory burst oxidase homolog D (Morales et al., 2016). Both *pmr4* and *rbohD* mutants conserved the Xh-induced

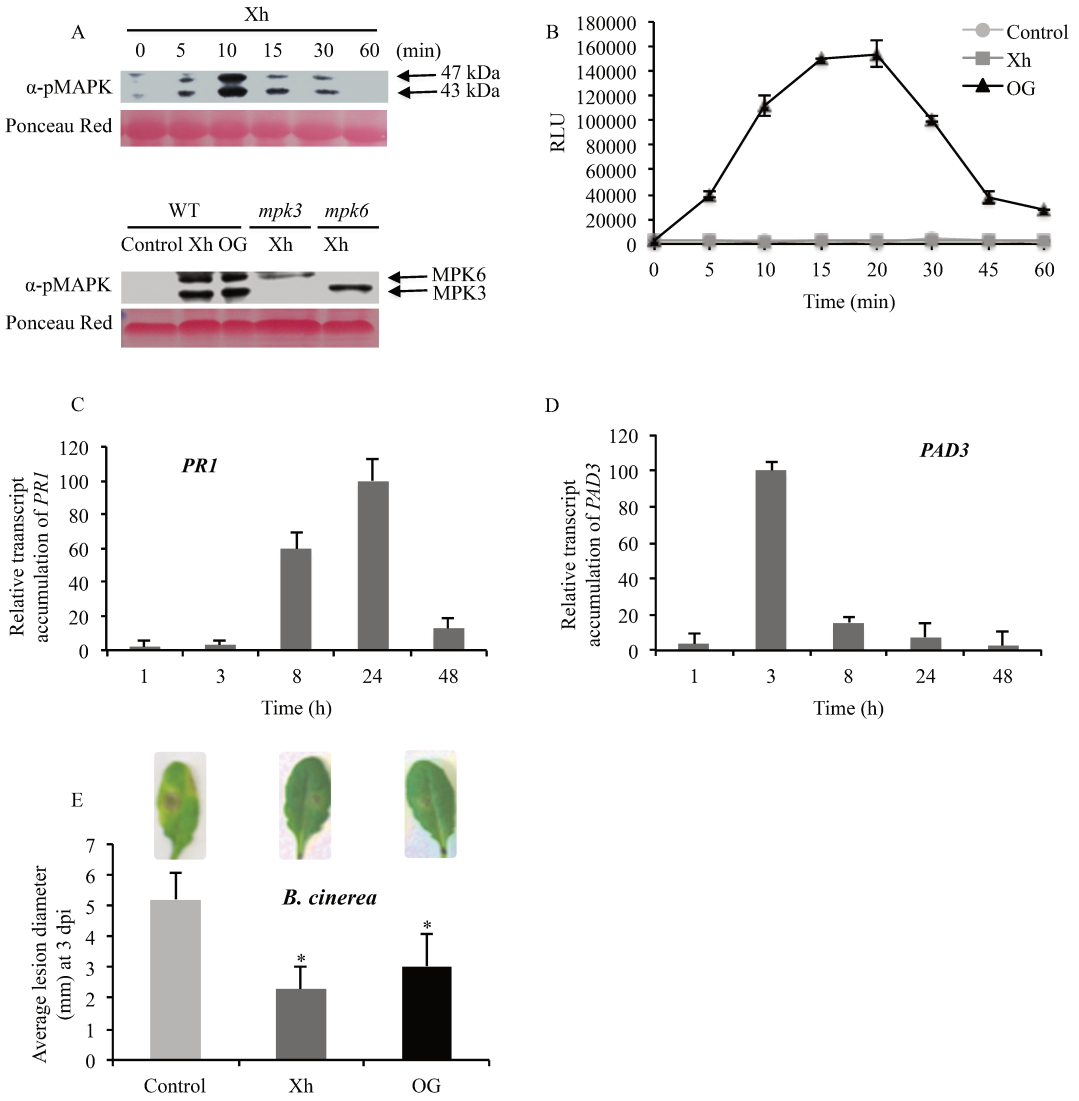


Figure 37: Immune responses and resistance against *B. cinerea* induced by Xh or OG in Arabidopsis.

A. Upper lane: Phosphorylation of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in Col-0 plants treated by Xh (1 mg/ml) detected by immunoblotting with α-pERK1/2. Lower lane: Phosphorylation of two mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in Col-0, *mpk3* and *mpk6* mutant plants treated by Xh (1 mg/ml) and detected at 10 min by immunoblotting with α-pERK1/2. Results are from one representative experiment out of three. **B.** H_2O_2 production in Arabidopsis cells treated with water (control), Xh or OG (1 mg/ml) detected by chemiluminescence using a luminol-peroxidase based assay. Data represent mean ± SD from one representative experiment out of three. **C. D.** Time course of relative expression of defense genes encoding pathogenesis-related protein 1 (*PR1*) and phytoalexin deficient 3 (*PAD3*) after Xh treatment (1 mg/ml) measured by qPCR. Results represent the mean ± SD of three biological replicates. Data were expressed as percentage of the Xh-treated Col-0, the strongest time point induction set as 100%. **E.** Xh-induced resistance against *B. cinerea* in Arabidopsis. Two days after treatment by spraying with water (control), Xh (2.5 mg/ml) or OG (2.5 mg/ml), Col-0 plants were inoculated with *B. cinerea* (6-µl droplet at 5.10^4 conidia ml^{-1}) and disease symptoms were measured at 3 dpi. Results represent the mean lesion diameter ± SD of four independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between control and elicitor-treated plants using a Student's *t*-test ($P<0.05$). A representative leaf for each treatment is shown.

resistance against *B. cinerea* (Fig. 39) indicating that PMR4- and RBOHD-dependent responses are not required for Xh-induced resistance against *B. cinerea*.

Discussion

The xyloglucans used in this study (Xh) are ß-1,4-glucan polymers associated with xylosyl, galactosyl, and fucosyl-type branching. A putative additional arabinosyl-type branching might exist in a minor structure of Xh as it has been previously described in sycamore (Kiefer et al., 1990) or different monocotyledons (Hsieh and Harris, 2009). Another possibility is that a putative 4-epimerase might transform a D-xylose in an L-Arabinose during the apple fruit maturation, leading to an alternative structure of an oligomer possessing the same molecular weight (xylose and arabinose are two aldopentoses with the same molecular weight of 150.13). If the structures of the three Xh oligomers of DP 7, 8 and 9 have been clearly identified as XFGol, LFGol and GLFGol, further H^1-NMR investigations would be needed to precisely define the location of Arabinose in a probable minor Xh component.

This study clearly demonstrates that Xh triggered a broad range of defense responses in grapevine and Arabidopsis (Fig. 36, 37). Xh induce MAPK activation but do not elicit ROS production on Arabidopsis like cellobiose, a β-1,4-diglucose derived from cellulose (Souza et al., 2017). At the opposite, cellodextrins, which are longer derivatives of cellulose composed of linear β-1,4-glucosides, elicit an oxidative burst with a maximal H_2O_2 production triggered by the DP7 oligomer (Aziz et al., 2007). Treatment with Xh also triggers an increased expression of defense genes in both species, including *PAL* and *STS* in grapevine and *PAD3* and *PR1* in Arabidopsis. Up-regulation of *STS* and *PAL* genes in grapevine and *PAD3* in Arabidopsis was also observed upon OG treatment with similar kinetics (Aziz et al., 2004; Denoux et al., 2008; Manzoor et al., 2013). By contrast, *PR1* expression revealed time point differences between Xh and OG treatments. In Arabidopsis, *PR1* transcripts accumulated within 1 h upon OG treatment before decreasing at 3 h (Manzoor et al., 2013) whereas Xh treatment induced an accumulation of *PR1* transcripts at 8 h, peaking at 24 h before declining at 48 h (Fig. 37C). Moreover, Xh treatment elicits an accumulation of resveratrol (Fig. 36E), the main phytoalexin produced by grapevine *via* the phenylpropanoid pathway in response to microbial attacks. These results are consistent with the induced *PAL* and *STS* gene expression (Fig. 36 C, D). Resveratrol is found to be involved in grapevine resistance against some pathogens including *B. cinerea* or *P. viticola* (Hasan and Bae, 2017). However, resveratrol

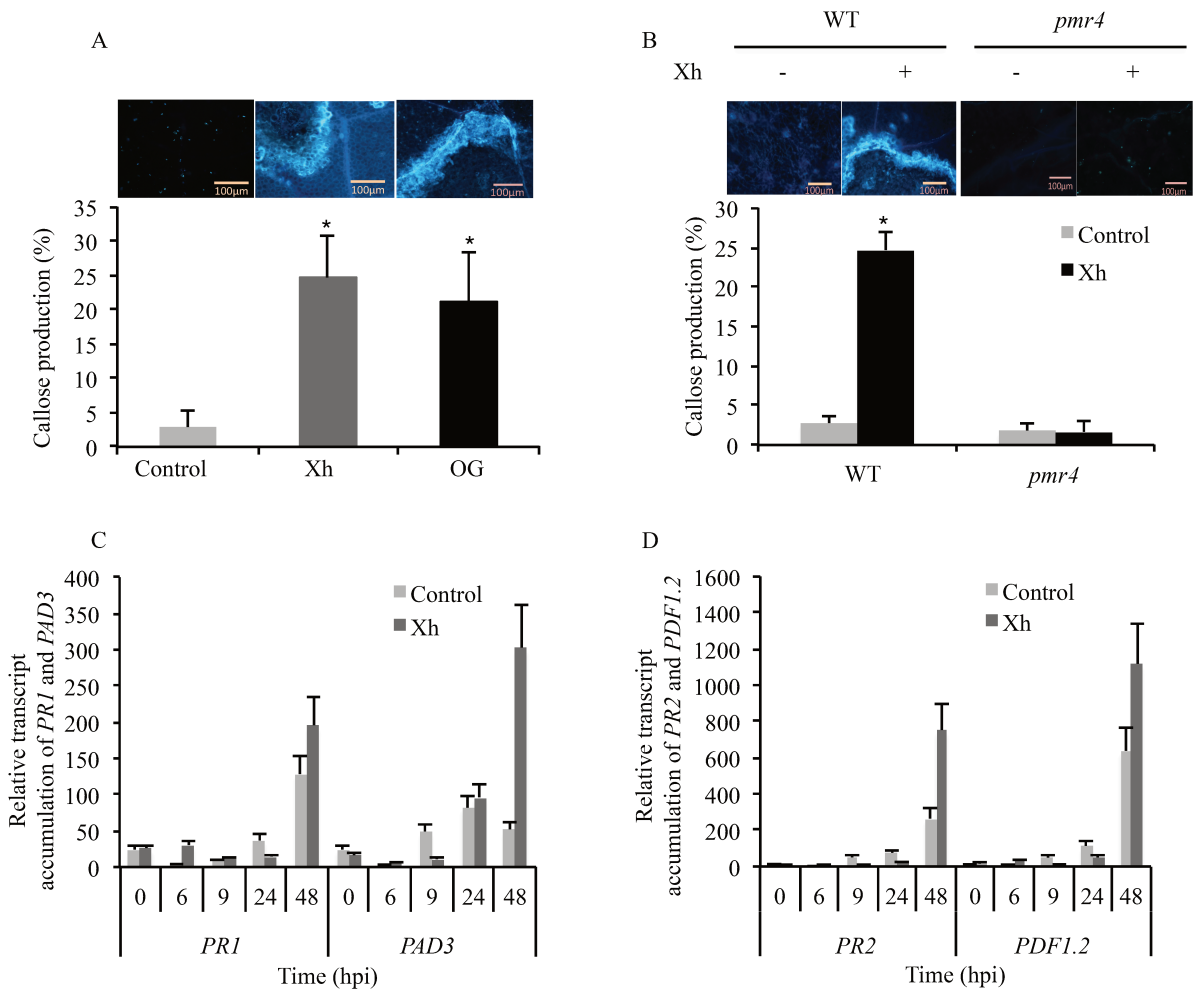


Figure 38: Xh trigger a PMR4-dependent callose deposition in Arabidopsis and the over-expression of defense genes during *B. cinerea* infection.

A. Callose quantification at 3 dpi detected by aniline blue staining in Arabidopsis Col-0 plants treated with water (control), Xh or OG (2.5 mg/ml). **B.** Callose quantification at 3 dpi detected by aniline blue staining in WT (Col-0) and *pmr4* mutant treated with water (-) or Xh (+; 2.5 mg/ml). Values represent means ± SD of at least 10 observed fields. A representative fluorescence microscopy imaging for each treatment is shown. Bar: 100 µm. Asterisks indicate statistically significant differences between control and elicitor-treated plants using a Student's *t*-test ($P<0.05$). **C. D.** Time course of relative expression of defense genes encoding pathogenesis-related protein 1 (*PR1*; **C**), phytoalexin deficient 3 (*PAD3*; **C**), pathogenesis-related protein 2 (*PR2*; **D**) and plant defensin 1.2 (*PDF1.2*; **D**) during Xh-induced resistance against *B. cinerea* measured by qPCR. Results represent the mean ± SD of three biological replicates after normalization by the housekeeping gene *At4g26410* (Czechowski et al., 2005). Hpi: hours post-inoculation.

accumulated in higher amounts in the medium of OG-treated cells compared to Xh-treated cells suggesting that Xh is an oligosaccharide possessing a lower elicitor activity. Indeed, even though the Xh are able to activate multiple defense related-pathways participating in PTI (Bigeard et al., 2015), they elicit more transient immune responses (MAPK activation, expression of defense genes, phytoalexin production) compared to other molecular patterns such as OG, laminarin or flg22, previously described as active elicitors in grapevine (Aziz et al., 2003; Poinssot et al., 2003; Trdá et al., 2014). Interestingly, the xyloglucan nonasaccharide XXFG, produced by enzymatic hydrolysis of natural xyloglucans, was also found to promote the accumulation of phytoalexins in soybean and to induce resistance of wheat kernels against *Fusarium culmorum* (Pavlova et al., 1996). The fact that cellobiose, cellodextrins and xyloglucans are able to trigger plant immune responses in different plant species suggest that a common β-1,4-glucan backbone is probably the basal structure of these DAMPs, even if specific DP and carbohydrate decorations might enhance their elicitor activity.

Previous studies have shown that the well-characterized OG protect Arabidopsis and grapevine against the necrotrophic fungus *B. cinerea* (Aziz et al., 2004; Ferrari et al., 2007). Surprisingly, our data show that OG did not induce a significant resistance in grapevine leaf disks against *B. cinerea* (Fig. 36F). However, this discrepancy might be explained by a different level of virulence depending on the *B. cinerea* isolate or the plant genotype used, but also on whether leaves were wounded or not before inoculation (Vallejo et al., 2003; Kliebenstein et al., 2005). Interestingly, we demonstrated that the Xh enhance resistance against *B. cinerea* on grapevine and Arabidopsis plants. We also showed an Xh-induced resistance against the biotrophic oomycete *H. arabidopsidis* in Arabidopsis (Fig. S10). Together, all these results suggest that the hemicellulose-derived Xh are new elicitors that trigger immune responses and enhance resistance against necrotrophic and biotrophic pathogens in different plant species. The fact that the Xh induce multiple immune responses and trigger protection against biotrophic and necrotrophic pathogens might lead to interesting applications to limit the use of chemicals to protect plants.

To further investigate the molecular components involved in xyloglucan signaling, we used Arabidopsis mutants. We confirmed that the two MAPKs phosphorylated upon Xh treatment were MPK3 and MPK6 (Fig. 37A). These two MAPKs are activated in response to pathogens and elicitors such as OG or flg22 (Galletti et al., 2011). Callose deposition is typically triggered by conserved PAMPs and DAMPs such as flg22, chitosan or OG (Luna et

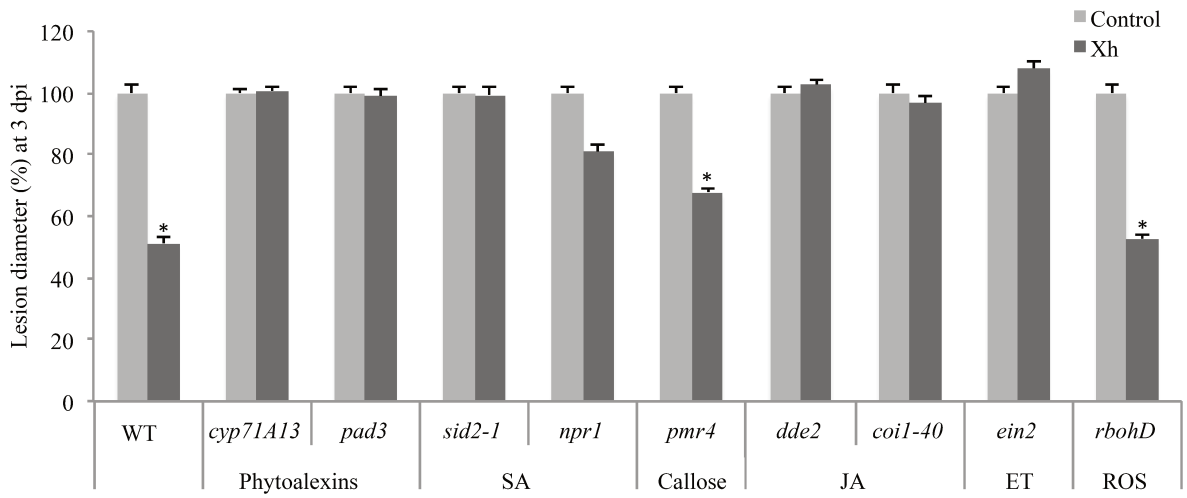


Figure 39: Characterization of defense pathways triggered during Xh-induced resistance against *B. cinerea* using Arabidopsis mutants.

Two days after treatment with Xh (2.5 mg/ml) or water (control), mutants disrupted in the production of phytoalexin (*cyp71A13*, *pad3*), salicylate (*sid2-1*, *npr1*), jasmonate (*dde2*, *coi1-40*), ethylene (*ein2*), callose (*pmr4*) or reactive oxygen species (*rbohD*) were inoculated with *B. cinerea* (5.10^4 conidia ml^{-1}) and disease symptoms were measured at 3 dpi. Histograms represent the mean lesion diameter ± SE of three independent experiments (n=60). Data are expressed as percentage of the water-treated control, set as 100%. Asterisks indicate statistically significant differences between control and elicitor-treated plants using a Student's *t*-test ($P<0.05$).

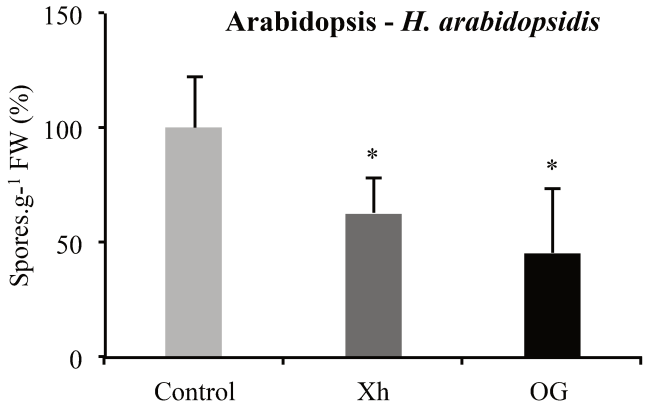


Figure S10: **Xh-induced resistance in Arabidopsis against *Hyaloperonospora arabidopsidis*.**

Two-week-old Col-0 plants were treated with water (control), Xh (2.5 mg/ml) or OG (2.5 mg/ml) then, 48 h later, plants were sprayed with *H. arabidopsidis* spores (5.10^4 spores.ml^{-1}). Data represent the percentage of spores in elicitor-treated plants compared to control-treated plants (set as 100%) at 7 dpi. The histogram indicates means ± SD of three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between control and elicitor-treated plants using a Student's *t*-test ($P<0.05$).

al., 2011; Ferrari et al., 2013). Here, we demonstrated that Xh trigger callose deposition after *B. cinerea* infection (Fig. 38A). Using the *pmr4* mutant, our results indicated that the Xh-induced callose production is dependent on PMR4 (Fig. 38B), the flg22-induced callose synthase (Luna et al., 2011). However, Xh-induced callose deposition is not an essential defense response upon *B. cinerea* infection in Arabidopsis since the *pmr4* mutant is still protected by Xh (Fig. 39). In the same way, Xh-induced activation of defense responses effective against *B. cinerea* does not require *AtrbohD,* as we did not detect significant differences in Xh-induced resistance between WT and *AtrbohD* plants (Fig. 39). Similarly, OG treatment of the *pmr4* and *AtrbohD* mutants resulted in a conserved protection against *B. cinerea*, indicating that callose and H_2O_2 does not play a major role in OG-induced resistance against this pathogen (Galletti et al., 2008). It is well established in the literature that the ethylene (ET) and jasmonic acid (JA) pathways take part in basal defense against necrotrophic pathogens and control the expression of some *PR* genes such as the plant defensin *PDF1.2* (Glazebrook, 2005). Mutations that block JA or ET signaling, including *coi1* and *ein2*, cause enhanced susceptibility against *B. cinerea* (Thomma et al., 1998; Thomma et al., 1999; Ferrari et al., 2003). We have shown that Xh-induced resistance against *B. cinerea* is dependent on the JA and ET pathway as *coi1*, *dde2* and *ein2* mutants did not show any more Xh-triggered immunity (Fig. 39). In Arabidopsis, resistance to *B. cinerea* was also found to involve the phytoalexin camalexin as *pad3* mutant showed higher susceptibility to the fungus and camalexin was found to have a toxic effect against *B. cinerea* (Ferrari et al., 2003; Kliebenstein et al., 2005). In this study, the Xh were unable to induce protection in *cyp71A13* and *pad3* Arabidopsis mutants, showing that camalexin plays a part in Xh-induced resistance against *B. cinerea* (Fig. 39). Last, our data indicate that Xh-induced resistance seems to be dependent on SA signaling as *sid2-1* and *npr1* did not show Xh-induced resistance (Fig. 39). This result might be surprising because SA-dependent responses are not predicted to play a major role in resistance against necrotrophic pathogens (Pieterse et al., 2012). However, plant hormone signaling pathways are interconnected in a complex network and there are some evidences that SA might contribute to resistance against *B. cinerea*. In particular, SA-mediated responses appear to be important in limiting the fungal spread at the site of infection in Arabidopsis (Govrin and Levine, 2002; Ferrari et al., 2003), tomato (Angulo et al., 2015) or grapevine (Kelloniemi et al., 2015). Strikingly, OG and flg22 were shown to induce resistance against *B. cinerea* independently of SA, JA and ET pathways (Ferrari et al., 2007), suggesting that the Xh act through a divergent signaling pathway to

rapidly counteract attack by pathogens. Spatio-temporal kinetics of hormone biosynthesis and signaling during the plant/pathogen interaction is important (Koornneef et al., 2008; Leon-Reyes et al., 2010). Our results suggest that Xh directly elicit the expression of *PAD3*, involved in the camalexin biosynthesis, and of the SA-marker gene *PR1* before triggering during *B. cinerea* infection callose deposition and the overexpression of *PDF1.2*, a marker gene of the JA/ET-dependent pathway.

The activation of Xh-triggered immune responses in grapevine and Arabidopsis suggests that these plant species perceive hemicellulose derived-xyloglucans and thus possess at least a cognate receptor. To further investigate how Xh are perceived, it would be therefore necessary to identify the PRRs involved in the recognition and signaling triggered by Xh. Recent studies have revealed that BAK1, CERK1 and SOBIR1 are frequently involved in signal transduction following the perception of different PAMPs including flg22, chito-oligosaccharides and the elongation factor EF-Tu (Heese et al., 2007; Miya et al., 2007; Wan et al., 2008; Brutus et al., 2010; Roux et al., 2011; Boutrot and Zipfel, 2017). Thus, it would be interesting to check if these co-receptors play a role in the Xh-triggered signaling.

More globally, we can conclude that cell-wall fragments of pectins (OG), cellulose (cellobiose and cellodextrins) and hemicellulose (xyloglucans) should be all considered as DAMPs which are able to trigger the plant immunity. They can be released by cell-wall degrading enzymes (CWDEs) produced by pathogens such as polygalacturonases, cellobiohydrolases, endoglucanases, xyloglucanases and often referred as carbohydrate-active enzymes (or CAZymes). For instance, the genome of the necrotrophic fungus *B. cinerea* contains 367 genes encoding putative CAZymes including some well-known CWDEs (Amselem et al., 2011). Nevertheless, addition of Xh in the culture medium did not increase its growth *in vitro* (Fig. S8) suggesting that CWDEs were already present to degrade carbohydrates of the potato dextrose broth medium. Once produced these active oligosaccharide fragments elicit plant immune responses and then need to be degraded. Recently, Benedetti et al. (2018) identified four Arabidopsis berberine bridge enzyme-like proteins which are OG oxidases that reduced the elicitor activity of OG with a DP > 4. Similarly, different glycoside hydrolases and glycosyltransferases from Arabidopsis and tomato have been found to modify the carbohydrate composition of the xyloglucans leading to their putative degradation and to the existence of an important structural biodiversity in these cell wall oligomers (Schultink et al., 2014). Thus, it would be interesting to study the

biological immune responses triggered by xyloglucans possessing different carbohydrate decorations to find the most active epitopes.

All the xyloglucans used in this study have been reduced by $NaBH_4$ to facilitate the purification process and the NMR analysis and thus possess a glucitol (sorbitol) instead of a glucose at the reducing end. It would be also interesting to compare the elicitor activity of the native and reduced xyloglucans. Indeed, chemical or enzymatic modifications of the reducing end in OG oligomers were shown to alter their biological activity (Spiro et al., 1998, Benedetti et al., 2018). Particularly the chemical reduction of OG DP13 by $NaBH_4$ or tyramination of its reducing end decreased its ability to elicit the extracellular pH alkalinization and the H_2O_2 production in tobacco cell suspensions (Spiro et al., 1998). This might explain why we should use a rather high concentration of Xh (at the mM range) to detect an elicitor activity in grapevine or Arabidopsis. Thus, further experiments will be needed to investigate the perception of the different xyloglucans and the mechanisms underlying the specificity of the Xh-triggered immune responses in different plant species.

Materials and Methods

Plant and cell culture materials

Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Marselan) herbaceous cuttings were grown in individual pots (10 x 10 x 7 cm) containing a mixture of blond peat and perlite (3/2, v/v) in a greenhouse (24 and 18°C, day and night respectively, relative humidity (RH) 50 ± 10% and a 16h light period), until they developed 6 leaves (ca 7 weeks later). Plants were watered with a fertilizer solution (NPK 10-10-10, Plantin, France). Grapevine cells (*V. vinifera* cv. Gamay) were cultivated and collected as described previously (Trdá et al., 2014).

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) seeds of the WT ecotype Columbia (Col-0) and mutants in the same background were obtained from the Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC). Plants were grown under a 10/14 h day/night cycle at 20/18°C respectively with a light intensity of 175 mmol m^{-2} s^{-1} provided by fluorescent tubes.

Arabidopsis (Col-0) cells were cultivated as described previously (Trdá et al., 2014). Cell suspensions were collected during the exponential growth phase and washed by filtration in a suspension buffer containing 175 mM mannitol, 0.5 mM K_2SO_4, 0.5 mM $CaCl_2$ and 2mM MES adjusted to pH 5.3. Cells were resuspended at 0.1 $g.ml^{-1}$ fresh weight (FW). After 1 h of equilibration (130 rpm, 25°C), cells were treated with elicitors and analyses were performed.

Elicitors

Purified xyloglucans (Xh) and oligogalacturonides (OG) were provided by Elicityl (Crolles, France; http://www.elicityl-oligotech.com/). The purified Xh possess a DP of 7-9 (product GLU1111) and OG have a mixed average DP of 10/15 (product GAT114). The elicitors were prepared in ultra-pure water and tested for their non-toxicity 24 h after treatment on *Arabidopsis* cell suspensions. Xh and OG were used at 1 mg/ml for all experiments, except for Arabidopsis gene expression, callose production and protection assays realized at 2.5 mg/ml and 5 mg/ml for grapevine protection assays. Acid hydrolysis of Xh was performed by treatment with 2 M trifluoroacetic acid during 4 hours at 100°C. The reaction was then stopped by neutralization with 2 M NaOH and the hydrolysed Xh (Xh_H) preparation was desalted by chromatography. Finally, neutral pH was checked and the solution was filtered through 0.2 µm before application on plants.

H_2O_2 detection

In Arabidopsis and grapevine cell suspensions, H_2O_2 production was detected using the chemiluminescence of luminol, as described in Dubreuil-Maurizi *et al.* (2011).

Immunodetection of phosphorylated MAPKs

Twenty µg of protein per sample were solubilised in Laemmli buffer (Laemmli, 1970), submitted to 12% SDS-PAGE before Western blotting. After transfer, the nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Biosciences, Munchen, Germany) was pre-incubated first during 1h at room temperature with TBST buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) and 2% BSA, then incubated for 1h with an anti-phospho Thr202/Tyr204 peptide of human ERK1/2 mouse antibody, (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), 1/20000 diluted in TBST buffer. After 3 washes with TBST buffer, probing and detection were performed by an ECL detection kit (Perkin Elmer, Little Chalfont, UK).

Protection assays

First, 3-week-old Arabidopsis plants were sprayed with elicitors (2.5 mg/ml). Two days after treatment, *Botrytis cinerea* infections were performed according to Manzoor *et al*. (2013). For *B. cinerea* infections on grapevine, leaf disks were incubated for 48 h on aqueous solutions containing Xh or OG (5 mg/ml), then inoculated with *B. cinerea* conidial suspension of 5.10^4 conidia/ml. Quantification of disease development in Arabidopsis and grapevine

leaves after inoculation was measured as average diameter of lesions formed during infection.

For *Hyaloperonospora arabidopsidis*, NOCO2 strain was spray-inoculated to saturation with freshly harvested spores (5.10^4 spores.ml^{-1}). Plants were kept in a growth chamber under high humidity. The 7th day, aerial parts of plants were harvested, pooled for each treatment and weighed. The liberated spores were counted under microscope and infection intensity was calculated as number of spores.g^{-1} of plant Fresh Weight (FW).

Gene expression analyses

For Arabidopsis, 3 leaves from 3 independent plants were collected and frozen in liquid nitrogen at the different time points. For grapevine, 2-ml aliquots of treated cells were collected at 0, 1, 3, 6, 9 and 24 hours post treatment and frozen. Total RNA was extracted using TRIzol reagent, following the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, USA). Five hundred ng of total RNA was reverse transcribed using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, Madison, USA) for Arabidopsis and 1 µg of total RNA using Superscript III reverse transcriptase kit (ThermoFisher, Waltham, USA) for grapevine. Real-time quantitative (q)PCR was performed using 5 ng/µl cDNA, qPCR SYBR green ROX mix (containing Taq polymerase, deoxyribonucleotide triphosphate and SYBR green dye; Thermo Scientific, Waltham, USA) and 200 nM primers (Table 1) in a 5-µl volume. Triplicate quantitative assays per biological experiment were performed by using the ViiA^{TM} detection system (Life Technologies, Carlsbad, USA). The activation factor of the relative gene expression was determined with the comparative cycle threshold (Ct) method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). The Arabidopsis housekeeping *OLI* gene (*At4g26410*) and the grapevine housekeeping gene *EF1α* (*XM_002284888.1*) were used as internal controls for normalization (Czechowski et al., 2005; Dubreuil-Maurizi et al., 2010).

Table I. Sequences of primers used for real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Names	Forward primers	Reverse primers
PAL	5'-AGTCTCCATGGACAACACCCG-3'	5'-TGCTCAGCACTTTCGACATGG-3'
STS	5'-TACGCCAAGAGATTATCACT-3'	5'-CTAAAGAGTCCAAAGCATCT-3'
PR1	5'-ACTACAACTACGCTGCGAACA-3'	5'-TGGCTTCTCGTTCACATAATTCCC-3'
PR2	5'-GGGACGGCTCTCGTGGCTACC-3'	5'-CGCGCGTTATCGAAACTCGCGG-3'
PAD3	5'-GGGTACCATACTTGTTGAGATGG-3'	5'-TTGATGATCTCTTTGGCTTCC-3'
PDF1.2	5'-CACCCTTATCTTCGCTGCTCTTG-3'	5'- CACTTGTGTGCTGGGAAGACATAG-3'
OLI	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGA-3'	5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'
EF1α	5'-GAACTGGGTGCTTGATAGGC-3'	5'-AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA-3'

Resveratrol quantification in *Vitis vinifera*

At different times after treatment, cell suspension aliquots (2 ml) were collected and filtered on GF/A filters to quantify the resveratrol in the culture medium, as previously described (Lachhab et al., 2014). Filtrates were directly analysed by ultra HPLC (Waters, Milford, MA, USA) following the method described by Boutegrabet et al. (2011). Each sample (10 µl) was loaded onto a BEH C-18 column (Waters, Eschborn, Germany) equilibrated with water-acetronitrile-formic acid (100:10:0.1) and acetonitrile. Resveratrol was eluted with a linear gradient from 0 to 42% acetonitrile at a flow rate of 0.65 ml/min. Quantification of resveratrol was performed with standard calibration curves, using peak areas of different amounts of pure molecules, fluorometrically detected (λex = 330 nm, λem = 400 nm) and the chromatographic characteristics were calculated using Waters Empower software.

Callose deposition detection

Callose deposition was revealed by aniline blue staining as described by Gauthier et al. (2014). Briefly, clarified leaves were stained in 0.05% aniline blue (in 0.1M Na_2HPO_4 phosphate buffer, pH 8) overnight and then mounted on microscope slides in the same solution. Callose deposition was observed in blue by epifluorescence microscopy under UV (λex = 340 nm; λem = 380 nm, stop filter LP 430 nm, Leica). Relative callose deposition was quantified as the number of fluorescent callose-corresponding pixels relative to the total number of pixels covering plant material, using "Shanbhag" automatic thresholding of the

ImageJ software. Average callose measurement was quantified at 3 dpi on five images per infection site from six leaves coming from three independent plants per modality.

Test of xyloglucan toxicity on *Botrytis cinerea* growth

B. cinerea conidia (2.10^5/ml) were prepared in Potato Dextrose Broth (6 g/l, Difco, USA). The suspension of *B. cinerea* was mixed with Xh solution, beforehand sterilized with Millex 0.22 µm sterile filter. Triplicates of 300 µl (54.10^3 conidia/well) of this mixture were dispatched in a 100-well microplate. *B. cinerea* mycelial growth was estimated by automatic optical density measurements at 492 nm and 25°C by a microplate reader (Bioscreener) every 2 h and until 66 h.

Acknowledgements

We thank Agnès Klinguer, Lucile Jacquens and Camille Lesquir for excellent technical assistance. We also want to thank Olivier Lamotte, Freddy Boutrot, Pablo Tornero and Frederic Brunner for the gift of some homozygous lines of Arabidopsis mutants used in this study. This work has benefited of the expertise of the regional Microscopy/DImaCell platform (Dijon, France).

Funding

This work has been financially supported by ANR (PATRIC project, grant ANR-13-KBBE-0001), the Regional Council of Bourgogne Franche-Comté (PARI grant 2016-9201AAO050S01636 and FEDER grant BG0005888) and INRA for the funding of Justine Claverie's PhD (grants 2015-9201AAO048502578 and 29000907).

Literature cited

Amselem J, Cuomo CA, van Kan JA, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S, Fournier E, Gout L, Hahn M, Kohn L, Lapalu N, Plummer KM, Pradier JM, Quévillon E, Sharon A, Simon A, ten Have A, Tudzynski B, Tudzynski P, Wincker P, Andrew M, Anthouard V, Beever RE, Beffa R, Benoit I, Bouzid O, Brault B, Chen Z, Choquer M, Collémare J, Cotton P, Danchin EG, Da Silva C, Gautier A, Giraud C, Giraud T, Gonzalez C, Grossetete S, Güldener U, Henrissat B, Howlett BJ, Kodira C, Kretschmer M, Lappartient A, Leroch M, Levis C, Mauceli E, Neuvéglise C, Oeser B, Pearson M, Poulain J, Poussereau N, Quesneville H, Rascle C, Schumacher J, Ségurens B, Sexton A, Silva E, Sirven C, Soanes DM, Talbot NJ, Templeton M, Yandava C, Yarden O, Zeng Q, Rollins JA, Lebrun MH, Dickman M (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens Sclerotinia sclerotiorum and Botrytis cinerea. PLoS Genet 7: e1002230

Angulo C, de la O Leyva M, Finiti I, López-Cruz J, Fernández-Crespo E, García-Agustín P, González-Bosch C (2015) Role of dioxygenase α-DOX2 and SA in basal response and in hexanoic acid-induced resistance of tomato (Solanum lycopersicum) plants against Botrytis cinerea. J Plant Physiol 175: 163-173

Aziz A, Gauthier A, Bezler A, Poinssot B, Joubert JM, Pugin A, Heyraud A, Baillieul F (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. Journal of Experimental Botany 58: 1463-1472

Aziz A, Heyraud A, Lambert B (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against Botrytis cinerea. Planta 218: 767-774

Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bezier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola. Molecular Plant-Microbe Interactions 16: 1118-1128

Benedetti M, Pontiggia D, Raggi S, Cheng Z, Scaloni F, Ferrari S, Ausubel FM, Cervone F, De Lorenzo G (2015) Plant immunity triggered by engineered in vivo release of oligogalacturonides, damage-associated molecular patterns. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 5533-5538

Benedetti M, Verrascina I, Pontiggia D, Locci F, Mattei B, De Lorenzo G, Cervone F (2018) Four Arabidopsis berberine bridge enzyme-like proteins are specific oxidases that inactivate the elicitor-active oligogalacturonides. Plant J 94: 260-273

Bigeard J, Colcombet J, Hirt H (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). Mol Plant 8: 521-539

Boutegrabet L, Fekete A, Hertkorn N, Papastamoulis Y, Waffo-Téguo P, Mérillon JM, Jeandet P, Gougeon RD, Schmitt-Kopplin P (2011) Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography. Anal Bioanal Chem 401: 1513-1521

Boutrot F, Zipfel C (2017) Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. Annu Rev Phytopathol 55: 257-286

Brulé D, Villano C, Davies LJ, Trdá L, Claverie J, Héloir MC, Chiltz A, Adrian M, Darblade B, Tornero P, Stransfeld L, Boutrot F, Zipfel C, Dry IB, Poinssot B (2018) The grapevine (Vitis vinifera) LysM receptor kinases VvLYK1-1 and VvLYK1-2 mediate chitooligosaccharide-triggered immunity. Plant Biotechnol J. doi: 10.1111/pbi.13017

Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 9452-9457

Cabrera JC, Boland A, Messiaen J, Cambier P, Van Cutsem P (2008) Egg box conformation of oligogalacturonides: the time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. Glycobiology 18: 473-482

Coutos-Thevenot P, Poinssot B, Bonomelli A, Yean H, Breda C, Buffard D, Esnault R, Hain R, Boulay M (2001) In vitro tolerance to Botrytis cinerea of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. Journal of Experimental Botany 52: 901-910

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiol 139: 5-17

Davidsson PR, Kariola T, Niemi O, Palva ET (2013) Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. Front Plant Sci 4: 191

Decreux A, Messiaen J (2005) Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. Plant Cell Physiol 46: 268-278

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel F, Dewdney J (2008) Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. Molecular Plant 1: 423-445

Dubreuil-Maurizi C, Trouvelot S, Frettinger P, Pugin A, Wendehenne D, Poinssot B (2010) beta-Aminobutyric Acid Primes an NADPH Oxidase-Dependent Reactive Oxygen Species Production During Grapevine-Triggered Immunity. Molecular Plant-Microbe Interactions 23: 1012-1021

Dubreuil-Maurizi C, Vitecek J, Marty L, Branciard L, Frettinger P, Wendehenne D, Meyer A, Mauch F, Poinssot B (2011) Glutathione Deficiency of the Arabidopsis Mutant pad2-1 Affects Oxidative Stress-Related Events, Defense Gene Expression, and the Hypersensitive Response. Plant Physiology 157: 2000-2012

Ferrari S, Galletti R, Denoux C, De Lorenzo G, Ausubel FM, Dewdney J (2007) Resistance to Botrytis cinerea induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. Plant Physiology 144: 367-379

Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM (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

Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, Lorenzo GD (2013) Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. Front Plant Sci 4: 49

Fry SC, Aldington S, Hetherington PR, Aitken J (1993) Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. Plant Physiol 103: 1-5

Galletti R, Denoux C, Gambetta S, Dewdney J, Ausubel FM, De Lorenzo G, Ferrari S (2008) The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in Arabidopsis Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against Botrytis cinerea. Plant Physiology 148: 1695-1706

Galletti R, Ferrari S, De Lorenzo G (2011) Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against Botrytis cinerea. Plant Physiol 157: 804-814

Gauthier A, Trouvelot S, Kelloniemi J, Frettinger P, Wendehenne D, Daire X, Joubert JM, Ferrarini A, Delledonne M, Flors V, Poinssot B (2014) The sulfated laminarin triggers a stress transcriptome before priming the SA- and ROS-dependent defenses during grapevine's induced resistance against Plasmopara viticola. PLoS One 9: e88145

Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu Rev Phytopathol 43: 205-227

González-Pérez L, Perrotta L, Acosta A, Orellana E, Spadafora N, Bruno L, Bitonti BM, Albani D, Cabrera JC, Francis D, Rogers HJ (2014) In tobacco BY-2 cells xyloglucan oligosaccharides alter the expression of genes involved in cell wall metabolism, signalling, stress responses, cell division and transcriptional control. Mol Biol Rep 41: 6803-6816

Govrin EM, Levine A (2002) Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, Botrytis cinerea, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). Plant Mol Biol 48: 267-276

Hasan M, Bae H (2017) An Overview of Stress-Induced Resveratrol Synthesis in Grapes: Perspectives for Resveratrol-Enriched Grape Products. Molecules 22

Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 12217-12222

Heil M, Land WG (2014) Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life. Front Plant Sci 5: 578

Hsieh YS, Harris PJ (2009) Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. Mol Plant 2: 943-965

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444: 323-329

Katsir L, Schilmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 7100-7105

Kelloniemi J, Trouvelot S, Héloir MC, Simon A, Dalmais B, Frettinger P, Cimerman A, Fermaud M, Roudet J, Baulande S, Bruel C, Choquer M, Couvelard L, Duthieuw M, Ferrarini A, Flors V, Le Pêcheur P, Loisel E, Morgant G, Poussereau N, Pradier JM, Rascle C, Tdra L, Poinssot B, Viaud M (2015) Analysis of the molecular dialogue between gray mold (Botrytis cinerea) and grapevine (Vitis vinifera) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. Mol Plant Microbe Interact

Kiefer LL, York WS, Albersheim P, Darvill AG (1990) Structural characterization of an arabinose-containing heptadecasaccharide enzymically isolated from sycamore extracellular xyloglucan. Carbohydrate Research 197: 139 - 158

Kliebenstein DJ, Rowe HC, Denby KJ (2005) Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. Plant J 44: 25-36

Kohorn BD, Johansen S, Shishido A, Todorova T, Martinez R, Defeo E, Obregon P (2009) Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. Plant J 60: 974-982

Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. Plant Physiology 147: 1358-1368

Lachhab N, Sanzani SM, Adrian M, Chiltz A, Balacey S, Boselli M, Ippolito A, Poinssot B (2014) Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against Plasmopara viticola. Front Plant Sci 5: 716

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Leon-Reyes A, Van der Does D, De Lange ES, Delker C, Wasternack C, Van Wees SC, Ritsema T, Pieterse CM (2010) Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. Planta 232: 1423-1432

Li W, Ma M, Feng Y, Li H, Wang Y, Ma Y, Li M, An F, Guo H (2015) EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in Arabidopsis. Cell 163: 670-683

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. Methods 25: 402-408

Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. Mol Plant Microbe Interact 24: 183-193

Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA (2000) The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. Nature Genetics 26: 403-410

Manzoor H, Kelloniemi J, Chiltz A, Wendehenne D, Pugin A, Poinssot B, Garcia-Brugger A (2013) Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to Hyaloperonospora arabidopsidis. Plant J 76: 466-480

Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 19613-19618

Morales J, Kadota Y, Zipfel C, Molina A, Torres MA (2016) The Arabidopsis NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. J Exp Bot 67: 1663-1676

Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, Glawischnig E, Olsen CE, Halkier BA, Glazebrook J (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. Plant Cell 19: 2039-2052

Nawrath C, Métraux JP (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. Plant Cell 11: 1393-1404

Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. Front Plant Sci 4: 139

Nishimura MT, Stein M, Hou BH, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. Science 301: 969-972

Pavlova ZN, N.A. L, V.A. V, Muromtsev GS, Usov AI, Shibaev VN (1996) Xyloglucan oligosaccharins as elicitors of plant defense responses. Russian Journal of Plant Physiology 43: 242-246

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. Annu Rev Cell Dev Biol 28: 489-521

Poinssot B, Vandelle E, Bentéjac M, Adrian M, Levis C, Brygoo Y, Garin J, Sicilia F, Coutos-Thévenot P, Pugin A (2003) The endopolygalacturonase 1 from Botrytis cinerea activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. Mol Plant Microbe Interact 16: 553-564

Randoux B, Renard-Merlier D, Duyme F, Sanssené J, Courtois J, Durand R, Reignault P (2009) Oligogalacturonides induce resistance in wheat against powdery mildew. Commun Agric Appl Biol Sci 74: 681-685

Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D, Jeandroz S (2012) Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana. Plant Cell and Environment 35: 1483-1499

Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tör M, de Vries S, Zipfel C (2011) The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. Plant Cell 23: 2440-2455

Salvador P, Lasserre T (2010) Process for increasing plants resistance to an abiotic stress. *In* USPAU 20100304975, ed, United States Patent Application US 20100304975 Ed A01N 43/16 20060101 A01N043/16; A01P 21/00 20060101 A01P021/00. ELICITYL, Crolle, FR, pp 1-8

Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatos A, Halkier BA, Glawischnig E (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. Plant Physiol 141: 1248-1254

Schultink A, Liu L, Zhu L, Pauly M (2014) Structural Diversity and Function of Xyloglucan Sidechain Substituents. Plants (Basel) 3: 526-542

Souza CA, Li S, Lin AZ, Boutrot F, Grossmann G, Zipfel C, Somerville SC (2017) Cellulose-Derived Oligomers Act as Damage-Associated Molecular Patterns and Trigger Defense-Like Responses. Plant Physiol 173: 2383-2398

Spiro MD, Ridley BL, Eberhard S, Kates KA, Mathieu Y, O'Neill MA, Mohnen D, Guern J, Darvill A, Albersheim P (1998) Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. Plant Physiol 116: 1289-1298

Thomma B, Eggermont K, Penninckx I, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue B, Broekaert W (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 95: 15107-15111

Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF, Broekaert WF (1999) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by Botrytis cinerea. Plant Physiol 121: 1093-1102

Trdá L, Boutrot F, Claverie J, Brulé D, Dorey S, Poinssot B (2015) Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. Front Plant Sci 6: 219

Trdá L, Fernandez O, Boutrot F, Héloir MC, Kelloniemi J, Daire X, Adrian M, Clément C, Zipfel C, Dorey S, Poinssot B (2014) The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium Burkholderia phytofirmans and plant pathogenic bacteria. New Phytol 201: 1371-1384

Vallejo I, Carbú M, Rebordinos L, Cantoral JM (2003) Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in south-western Spain. *In*, Vol 58, Biologia, pp 1067–1074

Vargas-Rechia C, Reicher F, Rita Sierakowski M, Heyraud A, Driguez H, Linart Y (1998) Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of hymenaea courbaril acts as a signaling molecule. Plant Physiol 116: 1013-1021

von Malek B, van der Graaff E, Schneitz K, Keller B (2002) The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. Planta 216: 187-192

Wan J, Zhang X, Neece D, Ramonell K, Clough S, Kim S, Stacey M, Stacey G (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. Plant Cell 20: 471-481

Watt DK, Brasch DJ, Larsen DS, Melton LD (1999) Isolation, characterisation, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinised and non-depectinised apple pomace. Carbohydrate Polymers 39: 165 - 180

Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C (2012) The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. Cell Rep 1: 639-647

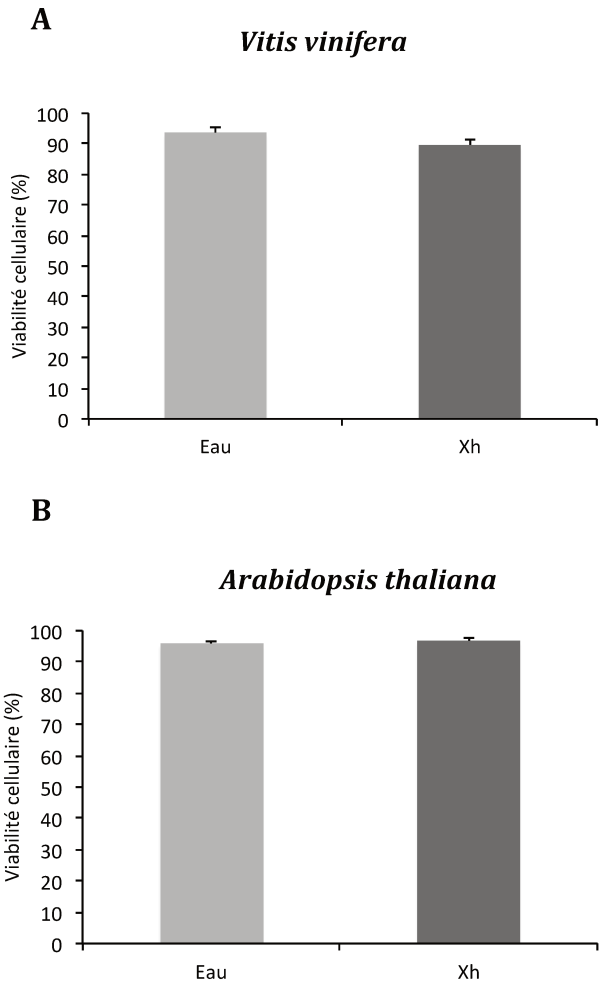


Figure 40: Mesure de la viabilité cellulaire chez la vigne (A) et Arabidopsis (B) après un traitement par les Xh.

La viabilité cellulaire est observée après coloration au Di-Acétate de Fluorescéine (DAF) après 24 h de traitement par les Xh (1 mg/ml). La viabilité cellulaire est évaluée par observation microscopique de 1000 cellules par condition et exprimée en pourcentage de cellules vivantes.

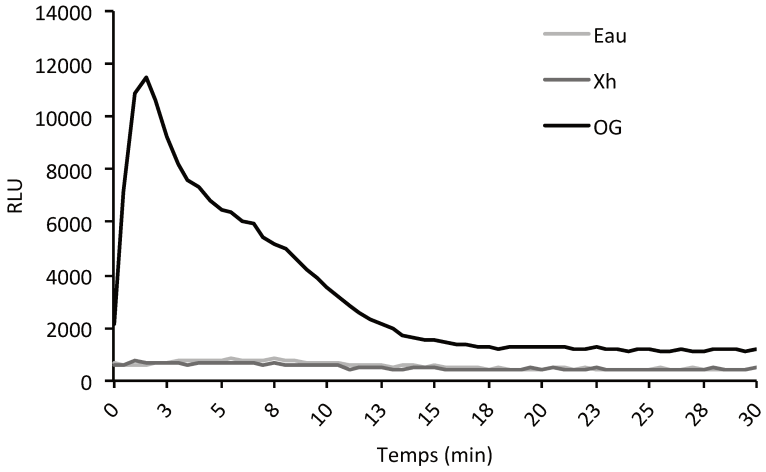


Figure 41: Mesure de la production d'H_2O_2 sur disques foliaires d'Arabidopsis.

La production d'H_2O_2 sur disques foliaires est mesurée par chimiluminescence du luminol en réponse aux Xh ou OG (1 mg/ml). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

3. Résultats complémentaires

En plus des résultats présentés sous forme d'article dans le paragraphe 2 du chapitre IV, plusieurs expériences complémentaires ont été réalisées afin de mieux caractériser les effets des Xh chez la vigne et Arabidopsis.

3.1. Mesure de la viabilité cellulaire

Sachant que certains éliciteurs comme la cryptogéine induisent une mort cellulaire (Wendehenne et al., 2002), nous avons quantifié le pourcentage de cellules de vigne et d'Arabidopsis vivantes après 24 h de traitement par les Xh (1 mg/ml). Une coloration au Di-Acétate de Fluorescéine révèle que le pourcentage de cellules vivantes après un traitement par les Xh est le même qu'après un traitement à l'eau (Figure 40). A cette concentration, les Xh n'ont donc aucun effet cytotoxique sur les cellules de vigne et d'Arabidopsis après 24 h de traitement.

3.2. Mesure de la production d'H_2O_2 sur disques foliaires d'Arabidopsis

D'après les résultats précédents, aucune production d'H_2O_2 n'a été détectée en réponse aux Xh sur suspensions cellulaires de vigne et d'Arabidopsis (§2 du chapitre IV). En complément, la mesure de la production d'H_2O_2 par chimiluminescence du luminol a également été réalisée sur disques foliaires d'Arabidopsis (Figure 41). Le traitement par les OG (1 mg/ml) s'accompagne d'une augmentation rapide de la production d'H_2O_2, maximale après 2 min de traitement, puis diminuant jusqu'à atteindre un niveau faible mais constant après 15 min. Les disques foliaires traités par les Xh (1 mg/ml) présentent un niveau basal de la production d'H_2O_2 similaire à celui du traitement eau (Figure 41). Ainsi, quel que soit le modèle utilisé, les Xh n'induisent pas de production d'H_2O_2 au cours du temps.

3.3. Dosage de métabolites chez Arabidopsis

Le dosage des métabolites chez Arabidopsis a été réalisé lors de la résistance induite par les Xh contre *B. cinerea* (Figure 37 de l'article présenté au §2). En se basant sur la moyenne de deux expériences biologiques indépendantes, il semble que les Xh induisent rapidement une diminution des taux de camalexine, SA et SA glucosylé (SAG)

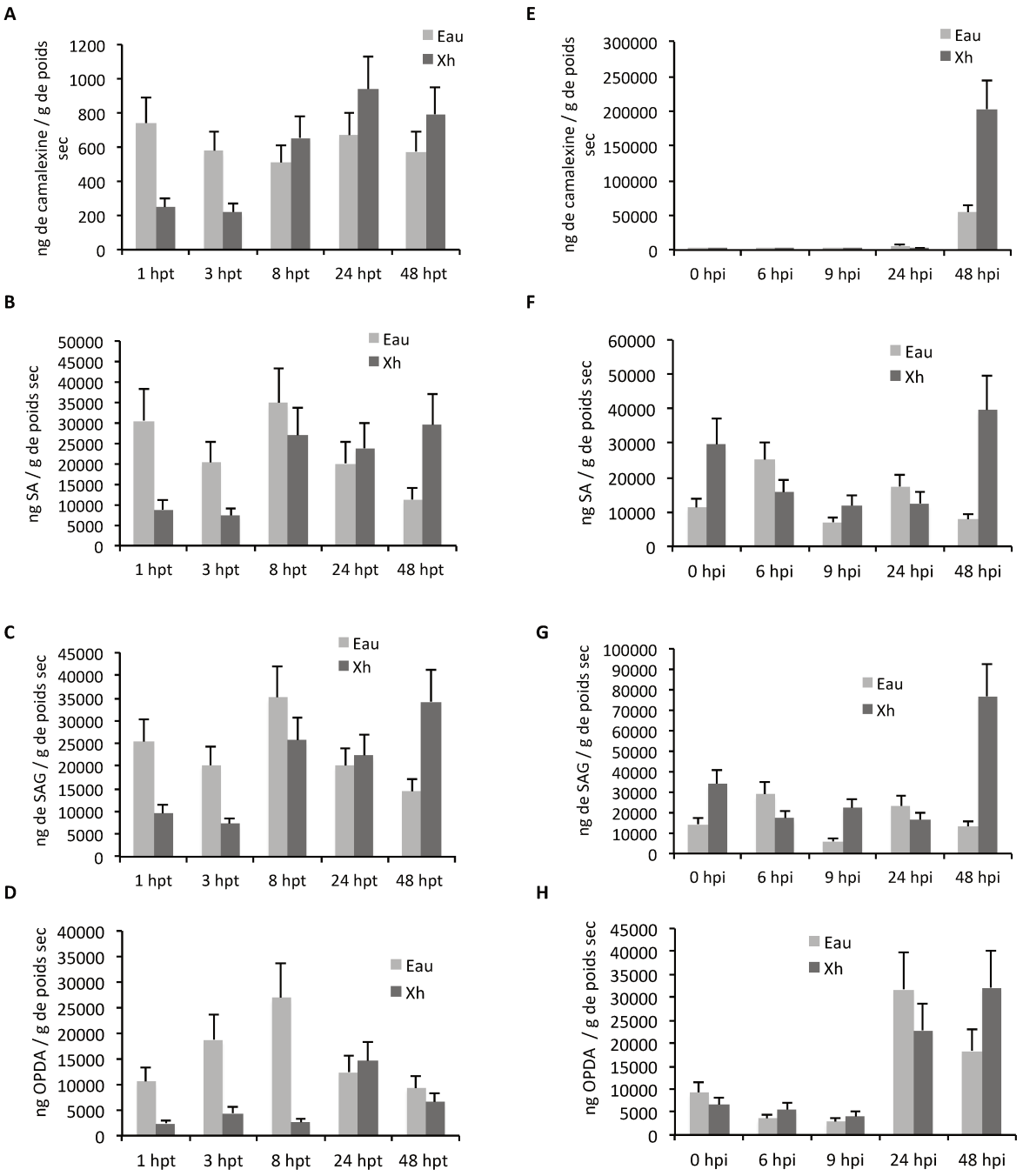


Figure 42: Dosage de métabolites chez Arabidopsis lors de la résistance induite par les Xh contre *Botrytis cinerea*.

Le dosage de la camalexine (A, E), de l'acide salicylique (SA ; B, F), de l'acide salicylique glucosylé (SAG ; C, G) et de l'OPDA (*12-oxo-phytodienoic acid* ; D, H) ont été réalisés à différentes h post-inoculation (hpi) par *B. cinerea* (5.10^4 conidies/ml), elle-même réalisée 48 h post-traitement (hpt) par les Xh (2,5 mg/ml). Les résultats représentent la moyenne et les écart types de deux expériences indépendantes.

normalement produits dans les témoins eau entre 1 et 3 h post-traitement (hpt, Figure 42 A, B, C). De la même façon la production d'OPDA (un précurseur du JA) induite lors du traitement eau semble réprimée lors d'un traitement par Xh entre 1 et 8 hpt (Figure 42 D). Dans un deuxième temps, en comparant les traitements Xh et eau, nous observons une augmentation de la teneur en camalexine (794 ng/g de poids sec), SA (29531 ng/g de poids sec) et SAG (34233 ng/g de poids sec) essentiellement à 48 hpt, soit au temps 0 d'inoculation (0 hpi ; Figure 42 A, B, C). Après inoculation de *B. cinerea*, les Xh induisent à 48 hpi une accumulation de camalexine (203261 ng/g de poids sec), de SA (39688 ng/g poids sec) et de SAG (76806 ng/g de poids sec) supérieure à celle observée dans les témoins respectifs (Figure 42, E, F, G). Concernant l'OPDA, peu de différences sont visibles entre les modalités Xh et eau pendant l'infection par *B. cinerea* (Figure 42, H).

3.4. Immunodétection des MAPK phosphorylées à différents stades de développement d'Arabidopsis

Au cours de nos travaux, nous avons observé une certaine variabilité de nos résultats, notamment au niveau des réponses induites par les Xh. Nous avons émis l'hypothèse que la réponse aux Xh pouvait varier en fonction du stade physiologique des plantes. Nous avons donc réalisé une expérience de phosphorylation des MAPK comparant les intensités de réponse aux Xh et OG à différents stade de développement de la plante (2, 4 ou 6 semaines après germination) ou dans deux méthodes de culture différentes (*in vitro* ou en terre). Ces résultats montrent que l'activation de la phosphorylation des MAPK en réponse aux Xh et aux OG semble optimale chez la plante adulte cultivée en terre depuis 4 à 6 semaines (Figure 43).

3.5. Comparaison de différents lots de xyloglucanes : effet de l'arabinose

Nous avons également observé au cours de nos travaux des différences de réponse en fonction des lots de Xh. A notre demande, la société Elicityl a donc analysé plus finement la composition de trois lots : ANN0213, ANN0304 et ANM0313 (Tableau 8). De façon inattendue, il ressort de cette analyse que certains lots peuvent comporter de l'Arabinose dans des concentrations plus ou moins importantes (0,2 % pour ANN0304 jusqu'à 6,5 % pour ANM0313). Nous suspectons l'arabinose d'être à l'origine de certaines des différences de réponses biologiques observées. Nous avons donc décidé de comparer l'activation de la phosphorylation des MAPK en réponse aux trois lots, le

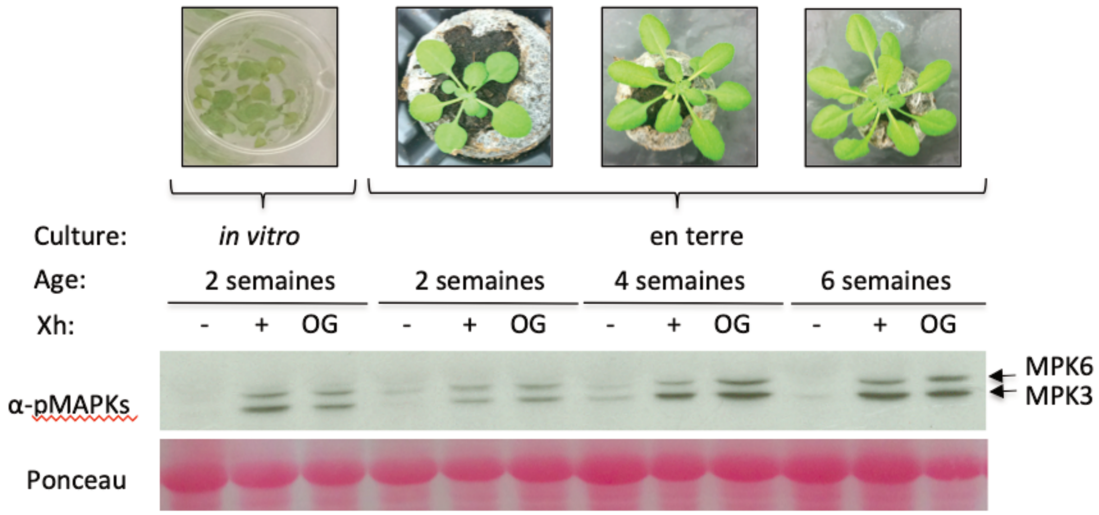


Figure 43: Phosphorylation des MAPK en réponse aux Xh et OG (1 mg/ml) à différents stades de développement d'Arabidopsis.

La phosphorylation des MAPK a été analysée 10 min après traitement par les éliciteurs par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines ERK1/2 humaines phosphorylées.

- : traitement eau ; + : traitement Xh. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

premier (ANN0213) ayant une teneur en arabinose élevée (5,3%), le second (ANN0304) ayant une teneur quasi nulle (0,2%) et le dernier (ANM0313) ayant la teneur la plus élevée (6.5%). Conformément à notre hypothèse, la phosphorylation des MAPK est plus forte en réponse aux lots ANN0213 et ANM0313, lots pour lesquels l'intensité de la phosphorylation des MAPK est équivalente à celle observée en réponse au traitement OG (Figure 44). En revanche, la phosphorylation des MAPK est faiblement détectable en réponse au lot ANN0304 contenant une faible teneur en arabinose (Figure 44). Ces résultats préliminaires tendent à confirmer l'hypothèse selon laquelle la teneur en arabinose pourrait jouer un rôle dans l'intensité de l'activation des MAPK en réponse aux Xh.

4. Discussion

4.1. Les Xh n'induisent pas de mort cellulaire ni de FAO sur disques foliaires d'Arabidopsis

Nos résultats ont montré que les Xh (1 mg/ml) n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire chez la vigne et Arabidopsis. De plus, les Xh n'ont pas modifié de manière significative la croissance de *B. cinerea in vitro*, excluant un potentiel effet toxique direct sur la germination des conidies ou la croissance mycélienne. De manière intéressante, le chitosan possède, en plus de son activité élicitrice (Aziz et al., 2006; Brulé et al., 2018), des propriétés antimicrobienne (Trotel-Aziz et al., 2006) et peut induire une mort cellulaire de type réponse hypersensible chez le tabac et le soja (Iriti et al., 2006; Wang et al., 2008; Zuppini et al., 2004). Il est donc souvent difficile d'établir si l'effet protecteur observé repose sur les propriétés élicitrices ou antimicrobiennes, ou les deux. Ainsi, pour les Xh, il est clair que la protection contre *B. cinerea* observée chez la vigne et Arabidopsis requiert l'établissement des mécanismes de défense de la plante.

Aucune production d'H_2O_2 n'a été observée sur suspensions cellulaires de vigne et d'Arabidopsis en réponse aux Xh, ni sur disques foliaires d'Arabidopsis. L'activation des défenses chez Arabidopsis par différents éliciteurs est généralement associée à l'induction d'un burst oxydatif *via* la NADPH oxydase AtRbohD (Ferrari, 2013). Par exemple, la production de FAO *via* l'activation d'AtRbohD a déjà été observée en réponse aux OG longs (Denoux et al., 2008; Ferrari et al., 2007; Moscatiello et al., 2006). Etonnamment, les OG de DP courts (DP 3) n'induisent pas de production de FAO sur disques foliaires d'Arabidopsis, quelle que soit la concentration, bien qu'ils induisent la

	% de monosaccharides					
	ANN0213	**ANN0304**	**ANM0313**	Rapport théorique XFGol	Contribution au PM du XFGol	Contribution au PM du XFGol (%)
Fucose	13,4	15,2	13,4	1	146,2	13,3
Galactose	19,8	19,0	16,7	1	162,2	14,8
Glucose	31,4	33,4	27,7	2	342,3	31,2
Xylose	30,0	32,2	21,1	2	282,3	25,7
Glucitol				1	164,2	15
Total xyloglucan (sans Glucitol)	**94,7**	**99,8**	**93,5**	**7**	**1097**	**100%**
Arabinose	5,3	0.2	6,5	0		
Total (%)	**100**	**100**	**100**			

Tableau 8: Analyse de la composition en monosaccharides de trois lots de Xh par HPLC-PAD PA1 après hydrolyse acide des oligomères (Elicityl).

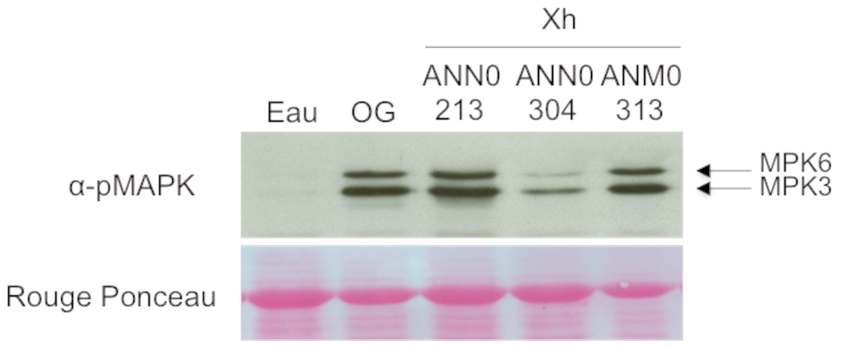


Figure 44: Phosphorylation des MAPK en réponse à différents lots de Xh.
La phosphorylation des MAPK a été analysée après 10 min de traitement (Xh ou OG, 1 mg/ml) par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines pERK1/2 reconnaissant les MAPK phosphorylées MPK3/6 d'Arabidopsis. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. La coloration au Rouge Ponceau permet de vérifier le chargement identique de toutes les pistes.

phosphorylation des MAPK et une résistance contre la bactérie *Pectobacterium carotovorum* (Davidsson et al., 2017). Cependant, le burst oxydatif produit par AtRbohD en réponse aux OG longs n'est pas requis pour l'expression de plusieurs gènes typiquement considérés comme dépendants des OG, ni pour la résistance induite contre *B. cinerea* (Galletti et al., 2008). De la même manière, les cellobioses, des oligomères dérivés de cellulose, activent une cascade de signalisation similaire aux OG mais n'induisent pas de production de FAO chez Arabidopsis (Souza et al., 2017). Ainsi, bien que les Xh n'induisent pas de burst oxydatif détectable chez les plantes, ils sont capables d'induire d'autres réactions de défense conduisant à une résistance induite contre des pathogènes nécrotrophes (*B. cinerea*) ou biotrophes (*H. arabidopsidis*).

Le monoxyde d'azote, NO, est également impliquée dans de nombreux processus physiologiques, aussi bien chez les animaux que chez les plantes et joue un rôle important de second messager dans les voies de signalisation activées par les éliciteurs et les agents pathogènes (Besson-Bard et al., 2008). Les OG induisent une production de NO qui joue un rôle déterminant dans la résistance induite contre *B. cinerea* chez Arabidopsis (Rasul et al., 2012). Il serait donc intéressant de vérifier si les Xh sont capables d'induire une production de NO chez la vigne et Arabidopsis puis d'étudier l'implication éventuelle de ce second messager dans la résistance induite par les xyloglucanes.

4.2. Une production de métabolites secondaires est observée chez Arabidopsis en réponse aux Xh et lors de la résistance induite contre *B. cinerea*

Nos résultats montrent que les Xh induisent après traitement l'expression de gènes de défense impliqués dans les voies de défense de la camalexine (*PAD3*) et du SA (*PR1*), et l'expression de gènes marqueurs des voies du JA/ET (*PDF1.2*), du SA (*PR1, PR2*) et de la camalexine (*PAD3*) lors de la résistance induite contre *B. cinerea*. Néanmoins, nous observons un décalage entre l'expression des gènes *PAD3* et *PR1* maximale respectivement à 3 et 24 hpt (Figure 37 de la publication, §2), et une augmentation plus tardive de la quantité de camalexine et de SA, observable essentiellement à 48 hpt (Figure 42). Ce décalage et l'inhibition de la production basale de camalexine, SA, SAG et OPDA observée pendant les 3 premières heures post-traitement pourraient s'expliquer par la synthèse rapide d'une autre hormone. En effet, au sein du consortium PATRIC, des résultats complémentaires obtenus par Andrea Gust

de l'Université de Tübingen ont montré que les Xh sont également capables d'induire une production rapide d'éthylène (ET) chez Arabidopsis, essentiellement pendant la première hpt (données personnelles). Cette production rapide d'ET pourrait donc d'abord bloquer la production basale de SAG, SA, OPDA et camalexine par un effet antagoniste avant que l'ET diminue et que les voies SA et camalexine soient réactivées entre 24 et 48 hpt conduisant à une accumulation accrue de SA, SAG et camalexine à 0 hpi. Après l'inoculation par *B. cinerea*, une nette augmentation de la teneur en camalexine, SAG et SA est observable à 48 hpi (Figure 42) qui est corrélée à l'accumulation accrue des transcrits *PAD3, PR1* et *PR2* à ce même temps (Figure 38 de la publication, §2). L'accumulation d'OPDA, un précurseur de JA, qui semble légèrement surproduit en réponse aux Xh à 48 hpi est aussi corrélée à l'expression de *PDF1.2*, un gène marqueur de la voie JA/ET (Figure 38 de la publication, §2). De plus, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors des expériences de résistance induite contre *B. cinerea* utilisant les mutants de signalisation des différentes voies de défense (Figure 39 de la publication, §2) qui suggèrent l'implication des voies dépendant du SA, de l'ET, du JA et de la camalexine pour mener à la résistance induite contre *B. cinerea*. Globalement, ces résultats indiquent que les Xh semblent agir à deux niveaux. Tout d'abord, ils sont capables d'activer une cascade de signalisation précoce élicitant les voies dépendantes de l'ET puis du SA et conduisant notamment à l'activation de la voie de biosynthèse des phytoalexines comme la camalexine chez Arabidopsis ou le resvératrol chez la vigne. Puis, lors d'une infection par un pathogène, plusieurs hormones semblent surproduites (SA, OPDA) à partir de 48 hpi pour permettre une activation plus importante de différentes voies de défense (phytoalexines, callose, gènes codant des protéines PR) qui mènent à une résistance induite contre différents types de pathogènes (*B. cinerea* et *H. arabidopsidis*). Il semble donc que les Xh possèdent d'abord une activité élicitrice lors du traitement puis une activité potentialisatrice révélée à partir de 48 h post-inoculation. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer cet effet potentialisateur sur d'autres expériences et à des temps plus tardifs après l'inoculation. Il serait également intéressant de compléter cette étude par des tests de résistance induite contre d'autres types d'agresseurs (virus, bactéries, insectes…).

4.3. Effet de l'âge des plantes et de la composition des Xh sur leur activité élicitrice

Dans notre étude, nous avons émis l'hypothèse que les réponses biologiques pouvaient différer en fonction du stade physiologique des plantes. Les plantes adultes cultivées en terre semblent être la condition optimale pour étudier l'activation de la phosphorylation des MAPK en réponse aux Xh. Une étude a déjà montré que les conditions de croissance des plantes impactaient les réponses de défense. Ainsi, l'augmentation de la concentration de saccharose dans le milieu de culture de plantules d'Arabidopsis a un effet suppressif sur le dépôt de callose en réponse à flg22 et au chitosan (Luna et al., 2011). La présence de saccharose dans des cultures *in vitro* peut également diminuer les réponses immunitaires comme l'activation de MAPK en réponse aux OG ou aux Xh (Figure 43). Néanmoins la plus faible activation des MAPK semble être celle observée dans des jeunes plantules en croissance âgées de 2 semaines. Cette phase de croissance s'accompagne de phénomène d'élongation des parois qui implique la synthèse et la restructuration des chaînes de pectine et d'hémicellulose. Il pourrait dans ce cas exister des Xh et OG endogènes qui conduisent à une désensibilisation de la perception de ces DAMP (internalisation ou dégradation du récepteur, silencing des gènes de PRR ?) pour ne pas activer en permanence l'immunité de la plante, ce qui aurait un cout énergétique qui serait antagoniste à celui nécessaire à sa croissance.

Puisque nous avons observé des différences de réponses en fonction des lots de Xh, nous avons suspecté l'Arabinose, présent en différentes quantités selon les lots, d'être à l'origine de ces différences. L'intensité de phosphorylation des MAPK diffère d'un lot à l'autre. La phosphorylation des MAPK est plus forte en réponse aux lots ayant une teneur élevée en Arabinose tandis qu'elle est difficilement détectable en réponse au lot en contenant une faible teneur. L'Arabinose semble donc jouer un rôle dans l'activité élicitrice des Xh chez Arabidopsis. Il serait intéressant de tester si ces réponses sont également observées chez la vigne. L'analyse d'autres évènements de défense tels que l'expression de gènes ou la résistance induite contre *B. cinerea* en réponse à ces différents lots permettra de confirmer ou non la contribution de l'Arabinose dans l'intensité de réponse des Xh. Si de l'Arabinose a déjà été retrouvé à plusieurs reprises dans des oligomères de Xh (Kiefer et al., 1990; Vierhuis et al., 2001), sa présence reste rare chez les plantes supérieures (Schultink et al., 2014a). De plus, c'est un monosaccharide de la série L, ce qui pourrait lui conférer une activité biologique

différente des autres qui sont généralement de la série D. Toutes les structures actuellement décrites montrent que l'Arabinose a tendance à remplacer un Galactose lié en 2 à un Xylose (motifs D, E, M, N, S ; Pauly and Keegstra, 2016) d'une chaine de Xh ou à se lier en 2 à un Glucose de la chaine de Xyloglucane (motif A ; Pauly et Keegstra, 2016). Des purifications et des analyses supplémentaires de H^1-RMN seront donc nécessaires afin d'identifier précisément la localisation de l'Arabinose dans la structure d'un des oligomères de Xh puis d'étudier son rôle exact dans l'élicitation de l'immunité des plantes.

Les Xh sont des polymères de ß-1,4-glucanes ramifiés par des chaînes latérales de différentes natures (Figure 34). Le type et l'ordre de ces résidus dépendent en partie de l'espèce végétale, du type de tissu, du type cellulaire et du stade de développement de la cellule (Pauly and Keegstra, 2016). Contrairement aux motifs X, L ou F que l'on retrouve chez la majorité des clades de la phylogénie des plantes terrestres, la présence de certaines chaînes latérales semblent limitées à un ou quelques clades. Par exemple, les chaînes latérales P et Q n'ont été retrouvées jusqu'à présent que chez les mousses et les hépatiques (Peña et al., 2008). Il a également été rapporté que certains tissus spécialisés possédaient des structures de Xh différentes de la forme la plus répandue chez l'espèce. La chaîne latérale Y, contenant un acide Galacturonique chargé, a été identifiée à partir de tissus racinaires d'Arabidopsis et ne semble être présente que dans les poils absorbants (Peña et al., 2012). Dans notre étude, nous avons étudié l'activité élicitrice de molécules de Xh issues de parois cellulaires de pomme chez la vigne et Arabidopsis. Il serait donc intéressant de comparer les réponses induites par des Xh provenant d'autres espèces végétales, et notamment d'étudier les réponses de défense induites par des Xh intrinsèques à la vigne et à Arabidopsis.

L'activité biologique des oligosaccharides dépend fortement de leur degré de polymérisation (DP). Les ß-1,3-glucanes à faible DP (2 à 10) induisent des réponses plus rapides que la laminarine à DP élevé (25 à 40) chez les cellules de tabac (Fu et al., 2011). En revanche, l'inverse a été observé pour la résistance induite, les ß-1,3-glucanes à DP élevé étant plus actifs que ceux à faible DP pour protéger les plantes contre le virus de la mosaïque du tabac (Fu et al., 2011). Certaines études ont démontré que les plantes ont développé la capacité de répondre à des ß-1,3-glucanes de structures différentes. Le soja et le riz ne reconnaissent que les ß-1,3-glucanes ramifiés tandis que le tabac reconnaît les ß-1,3-glucanes linéaires (Cheong and Hahn, 1991; Yamaguchi et al., 2000). Ainsi, le β-

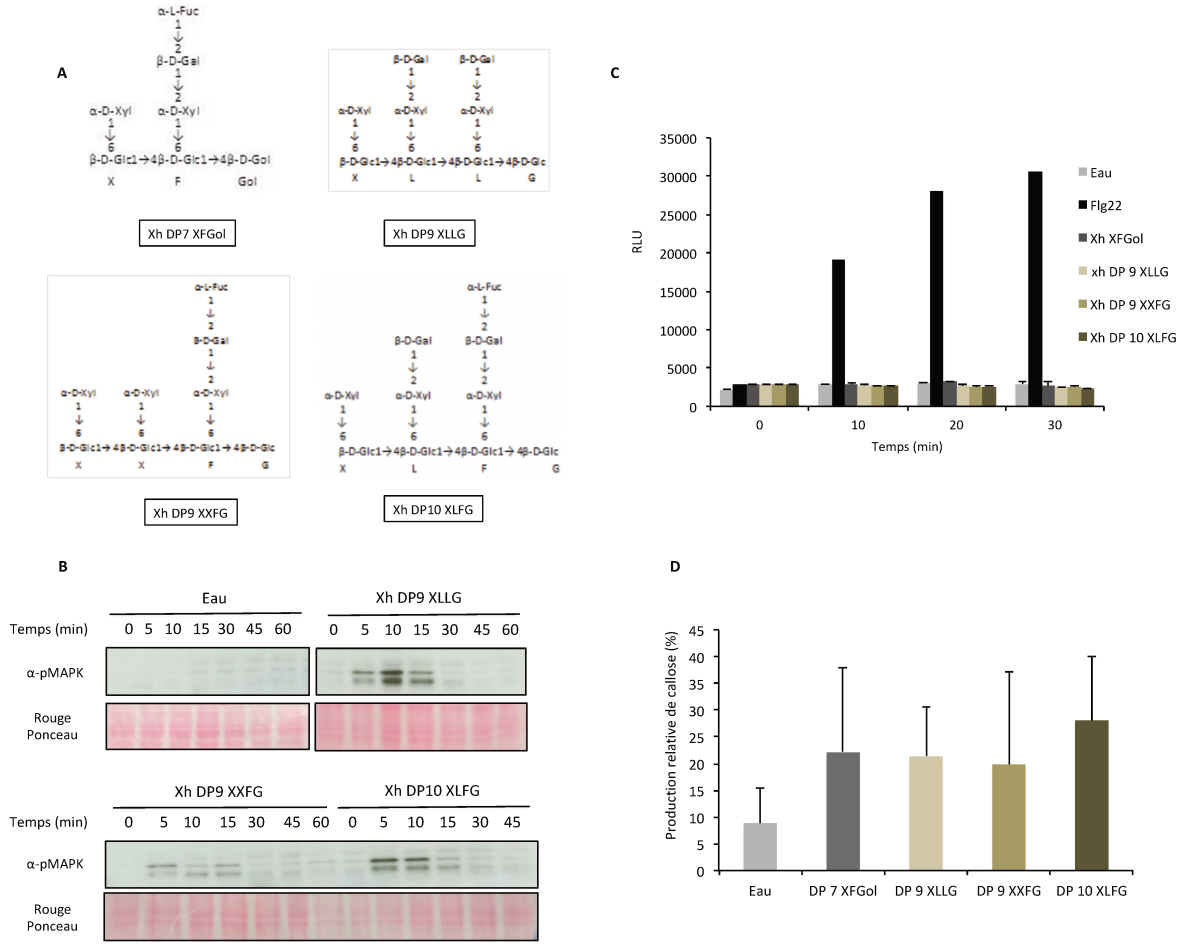


Figure 45: Structure de différents Xh et leurs réponses de défense chez Arabidopsis.

A. Structure de différents Xh.

B. Phosphorylation des MAPK en réponse à différents Xh. La phosphorylation des MAPK a été analysée après 10 min de traitement (Xh 1 mg/ml) par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines pERK1/2 reconnaissant les MAPK phosphorylées MPK3/6 d'Arabidopsis. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. La coloration au Rouge Ponceau permet de vérifier le chargement identique de toutes les pistes.

C. Mesure de la production d'H_2O_2 sur suspensions cellulaires d'Arabidopsis. La production d'H_2O_2 sur est mesurée par chimiluminescence du luminol en réponse aux Xh (1 mg/ml).

D. Quantification de la production de callose à 3 dpi détectée par coloration au bleu aniline chez des plantes d'Arabidopsis Col-0 traitées avec de l'eau (contrôle) ou des Xh (2,5 mg/ml).

Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience.

1,6-β-1,3-heptaglucoside provoque une accumulation de phytoalexines chez le soja (Sharp et al., 1984) mais est inactif chez le tabac (Klarzynski et al., 2000). Pour le chitosan, les oligomères dont le DP est compris entre 7 et 10 sont généralement les plus actifs, le minimum d'activité nécessitant un DP 6 (Gubaeva et al., 2018; Hadwiger, 2013). Des réponses biologiques différentes selon la taille ont également été rapportées pour les OG. Les DP entre 10 et 16 sont considérés de taille optimale pour induire des réponses de défense (Denoux et al., 2008; Vorhölter et al., 2012). Néanmoins, les OG plus courts peuvent déclencher des évènements de signalisation, par exemple les OG DP 3 peuvent induire la phosphorylation des MAPK et une résistance contre *Pectobacterium carotovorum* chez Arabidopsis (Davidsson et al., 2017). Chez la vigne, des résultats similaires ont été trouvé avec les cellodextrines (CD), oligomères linéaires de β-1,4 glucanes présents dans la cellulose. En effet, seules les CD de DP>7 sont capables d'induire une production forte d'H_2O_2, une surexpression de gènes de défense associée à une augmentation des activités chitinase et glucanase, tout ceci conduisant à une résistance induite contre *B. cinerea* (Aziz et al., 2007).

Dans ce contexte, nous avons commencé une étude structure/fonction des Xh pour comprendre quels sont les longueurs et motifs saccharidiques nécessaires pour activer les réponses immunitaires d'Arabidopsis. Nous avons testé l'activation de la phosphorylation des MAPK, la production d'H_2O_2 ainsi que la production de callose en réponse à un traitement aux Xh DP 9 XLLG, DP 9 XXFG et DP 10 XLFG (Figure 45A). L'immuno-détection révèle deux MAPK phosphorylées en réponse aux différents traitements éliciteurs (Figure 45B). Néanmoins, la phosphorylation n'est quasiment pas détectable en réponse au Xh DP 9 XXFG alors qu'elle est plus intense lors des traitements aux DP9 XLLG et DP10 XLFG. Après un traitement avec les différents Xh, aucune production d'H_2O_2 n'a été détectée pendant les 30 min de l'expérience (Figure 45C). Comparés au contrôle eau, les Xh DP7 XFGol, DP9 XLLG, DP9XXFG et DP10 XLFG induisent une production de callose plus importante dans des feuilles d'Arabidopsis 3 jours post infection par *B. cinerea.* Le fait que la phosphorylation des MAPKs soit plus intense lors d'un traitement aux Xh DP9 XLLG et DP10 XLFG suggère que les réponses induites par les Xh pourraient être plus fortes en présence du motif L (β-Gal-(1→2)-α-Xyl-(1→6)-β-Glc). Néanmoins, ces résultats demandent à être confirmés par des répétitions biologiques avec des produits très purifiés afin de mieux comprendre cette relation structure/fonction des xyloglucanes.

CHAPITRE V : RECHERCHE D'UN RECEPTEUR AUX XYLOGLUCANES

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, les Xh sont capables d'activer de nombreuses réponses immunitaires chez la vigne et chez Arabidopsis, suggérant que ces espèces végétales perçoivent les Xh et possèdent au moins un récepteur associé. L'objectif de ce chapitre était de rechercher un (ou des) récepteur(s) impliqué(s) dans la perception et la signalisation déclenchées par les Xh. Deux approches ont été utilisées : la première est basée sur la littérature afin de choisir des PRR candidats connus pour jouer un rôle dans la perception de PAMP. La seconde est basée sur l'analyse de données microarrays permettant de sélectionner des gènes candidats potentiellement impliqués dans la signalisation des Xh. Toutes les expériences ont été menées chez Arabidopsis, véritable outil génétique dont la communauté scientifique possède un très grand nombre de mutants disponibles et qui partage les données d'analyses microarrays *via* des bases de données publiques.

1. Approche avec à priori basée sur la littérature

De récentes études ont révélé que BAK1, CERK1 et SOBIR1 (*Suppressor of BIR1*) sont fréquemment impliqués dans la transduction du signal suite à la perception de différents PAMP, dont flg22, les chito-oligosaccharides et le facteur d'élongation EF-Tu (Boutrot and Zipfel, 2017; Heese et al., 2007; Miya et al., 2007; Roux et al., 2011; Wan et al., 2008). L'implication de WAK1 dans la reconnaissance des OG a également été démontrée (Brutus et al., 2010). Il nous a donc paru intéressant de vérifier si ces co-récepteurs jouaient également un rôle dans la signalisation induite par les Xh. Pour cela, nous avons d'abord analysé l'activation des MAPK chez les mutants *bak1-5*, *cerk1-2*, *sobir1* et *wak1* en réponse aux Xh (1 mg/ml). L'immunodétection révèle que la phosphorylation des MAPK est conservée chez tous ces mutants (Figure 46). Nos travaux précédents ont montré que les Xh étaient capables d'induire une résistance contre *B. cinerea.* Nous avons donc mesuré le diamètre des nécroses induites par ce champignon chez les mutants précédemment cités après un traitement à l'eau ou aux Xh (Figure 47). Parmi ceux-ci, seuls les mutants *wak1* et *sobir1* semblent avoir perdu la résistance induite par les Xh contre *B. cinerea* à partir des résultats obtenus sur deux expériences biologiques indépendantes.

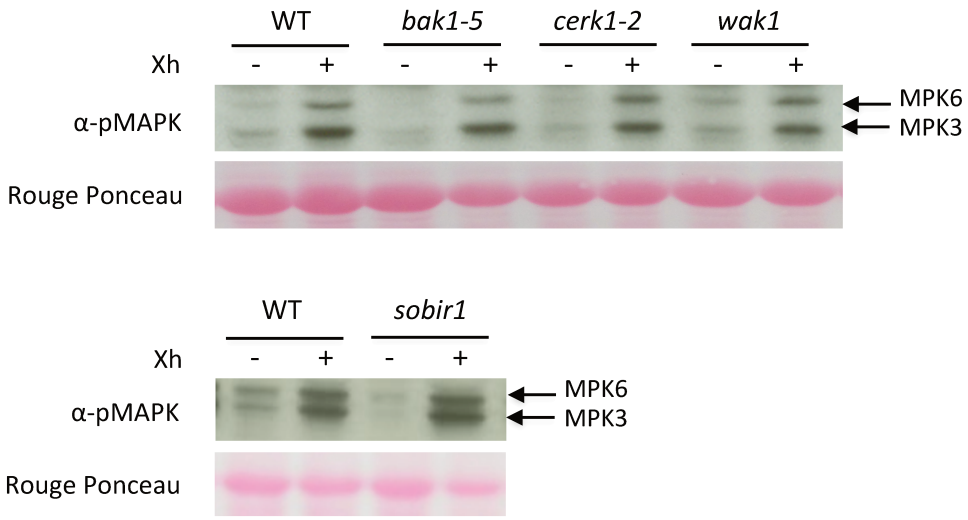


Figure 46: Phosphorylation des MAPK en réponse aux Xh chez les mutants *bak1-5*, *cerk1-2*, *wak1* et *sobir1*.

Phosphorylation des MAPK à 10 min analysée par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines pERK1/2 reconnaissant les MAPK phosphorylées MPK3/6 d'Arabidopsis. La coloration au Rouge Ponceau permet de vérifier le chargement identique de toutes les pistes. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. - : eau ; + : Xh (1 mg/ml).

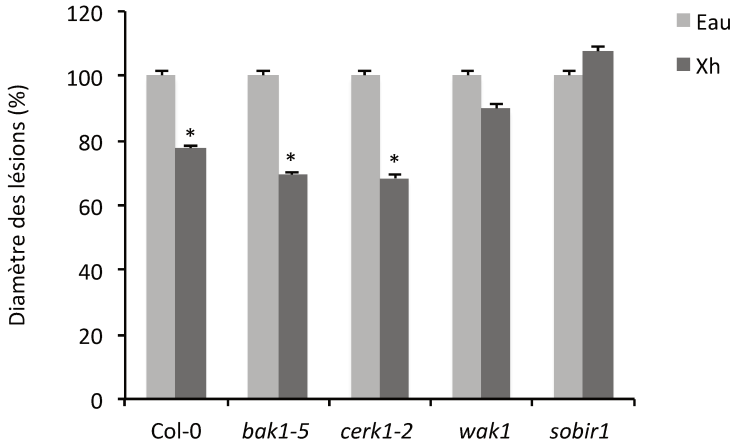


Figure 47: Résistance induite en réponse aux Xh contre *B. cinerea* chez les mutants *bak1-5*, *cerk1-2*, *wak1* et *sobir1*.

Deux jours après un traitement à l'eau ou aux Xh (2,5 mg/ml), les plantes sauvages et les mutants *bak1-5*, *cerk1-2*, *wak1* et *sobir1* sont inoculés avec *B. cinerea* (5.10^4 conidies/ml) et les lésions sont mesurées 3 jours post inoculation (jpi). Les résultats représentent la moyenne du diamètre des lésions exprimée en pourcentage de 2 expériences indépendantes (n=60), le traitement eau correspond à une taille de lésion de 100% et les barres correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Les astérisques indiquent une différence significative entre le traitement eau et le traitement Xh (test t de Student : *, $P<0,05$).

2. Approche sans à priori à partir d'analyse de données microarrays

L'analyse de résultats de microarrays réalisées au laboratoire ou présents dans les bases de données publiques (www.genevestigator.com) nous a permis de sélectionner des récepteurs candidats chez Arabidopsis dont les gènes sont sur-exprimés 24 h après un traitement aux Xh (2,5 mg/ml) et éventuellement lors d'interactions avec des agents pathogènes (Tableau 9). Les gènes candidats codent des récepteurs qui appartiennent aux familles des Wall-associated kinases like (WAKL), Arabidopsis receptor kinases (ARK), Cysteine-rich receptor-like protein kinases (CRK) et LysM containing receptor-like kinases (LysM-RLK ou LYK). L'analyse phylogénétique de ces gènes candidats met en évidence qu'ils font souvent partie de familles multigéniques (Figure 48).

2.1. Analyse du phénotype de mutants T-DNA des gènes candidats sélectionnés

Les lignées de mutants T-DNA ont été génotypées afin de confirmer leur homozygotie. Un exemple de résultat de génotypage sur plante sauvage (Col-0) ou mutée (*ark1*) est donné à titre indicatif en Figure 49. Comme attendu, les amorces LP/RP ont d'abord permis d'amplifier l'allèle sauvage (1225 pb) uniquement dans le génotype sauvage (Col-0), lors de la PCR 1 (Figure 49). Dans un deuxième temps, les amorces LB2/RP ont permis d'amplifier un produit de PCR de 800 pb (allèle muté) uniquement dans la plante mutée *ark1*, lors de la PCR 2. Aucune amplification n'est observée dans le génotype Col-0 ni dans le contrôle négatif avec ces dernières amorces (Figure 49). Ces résultats indiquent que la plante *ark1* est homozygote pour l'allèle muté. Toutes les lignées mutantes décrites dans le Tableau 5 (Chapitre II) ont été génotypées avec cette méthode.

Pour vérifier si l'un de ces récepteurs intervient dans la signalisation induite par les Xh, nous avons, dans un premier temps, analysé la phosphorylation des MAPK en réponse aux Xh (1 mg/ml) chez les mutants homozygotes sélectionnés. Globalement, la phosphorylation des MAPK est conservée chez tous les mutants de PRR candidats testés (Figure 50). Néanmoins, les mutants *ark1-1*, *ark1-2*, *ark2, wakl3*, *wakl7* et *wakl14-1* semblent posséder une phosphorylation un peu plus faible de MPK6 en réponse aux Xh. Le mutant *lyk4* semble également posséder une phosphorylation plus faible de MPK3 ;

Gènes	Identifiant (TAIR[1])	Traitement		
		Xh	*Botrytis cinerea*	*Hyaloperonospora arabidopsidis*
WAKL3	At1g16140	+	ND	ND
WAKL4	At1g16150	+	0	+
WAKL7	At1g16090	+	+	0
WAKL14	At2g23450	+	++	+
WAKL22	At1g79670	+	0	+
ARK1	At1g65790	++	0	+
ARK2	At1g65800	+	++	+
CRK5	At4g23130	+	ND	ND
CRK6	At4g23140	++	ND	ND
CRK7	At4g23050	+	ND	ND
CRK10	At4g23080	+	ND	ND
LYK3	At1g51940	+	0	+

[1] www.arabidopsis.org; ND: non déterminé ; 0: non induit ; +: induit ; ++: fortement induit.

Tableau 9: Sélection dans les données microarrays du laboratoire de gènes candidats codant des PRR induits 24 h après traitement par les Xh (2,5 mg/ml) et leur expression dans la base de données Genevestigator en réponse à *B. cinerea* ou *H. arabidopsidis*.

[1] www.arabidopsis.org; www.genevestigator.com ; ND: non déterminé ; 0: non induit ; +: induit ; ++: fortement induit.

néanmoins, on peut observer qu'il y a moins de protéines totales sur la coloration au Rouge Ponceau, et ce résultat n'a pas été reproduit dans les 2 autres expériences.

Afin de compléter ces premiers résultats, des tests de résistance induite contre *B. cinerea* ont été réalisés chez les mutants des récepteurs candidats. Les résultats de la Figure 51 montrent que les mutants *ark1-1*, *ark1-2*, *wak3*, *crk5*, *crk6*, *crk10-1*, *lyk1*, *lyk2*, *lyk3*, *lyk4*, *lyk5*, *wakl3*, *wakl7* et *wakl14-1* ont perdu la résistance induite par les Xh (2,5 mg/ml) contre *B. cinerea*.

Ces résultats nous permettent d'isoler cinq récepteurs potentiellement impliqués dans la signalisation des Xh. En effet, *ark1-1*, *ark1-2*, *wakl3*, *wakl7* et *wakl14-1* sont les seuls mutants dont la phosphorylation de MPK6 est affaiblie et dont la résistance induite contre *B. cinerea* est perdue en réponse aux Xh. Nous nous sommes focalisés sur ARK1 et ARK2, deux récepteurs transmembranaires possédant un domaine lectine extracellulaire connu pour lier des oligosaccharides (TAIR). Les transcrits d'*ARK1* et *ARK2* sont fortement induits lors d'un traitement aux Xh (2,5 mg/ml, données du laboratoire). Il est donc possible qu'ARK2 compense fonctionnellement la perte de perception d'ARK1 chez le mutant correspondant. L'obtention d'un double mutant *ark1/ark2* permettrait de vérifier l'hypothèse selon laquelle ces deux récepteurs pourraient participer à la perception des Xh. Malheureusement, ce double mutant est très difficile à obtenir par croisement génétique à cause de la localisation contigüe des 2 gènes *ARK1* et *ARK2* sur le chromosome 1 d'Arabidopsis. Néanmoins, une approche utilisant l'outil CRISPR-Cas9 pourrait permettre d'obtenir l'inactivation des deux gènes *ARK1* et *ARK2* par édition génomique.

2.2 Stratégie d'édition génomique par CRISPR-Cas9 de *ARK1/ARK2*

2.2.1. Design et hybridation des oligonucléotides guides

L'alignement des séquences des deux gènes *ARK1* et *ARK2* met en évidence qu'ils possèdent plus de 90% d'identité (Blast, NCBI). Nous avons donc choisi de créer les mutations dans une région identique aux deux gènes. La sélection des ARN guides (ARNg) a été réalisée à l'aide de logiciels de prédiction et d'analyse d'ARNg tels que SSC (Sequence Scan for Crispr ; http://cistrome.org/SSC/), ge-CRISPR (http://dharmacon.gelifesciences.com/gene-editing/crispr-cas9/#all), CRISPR-P (http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/) et Cas-Designer (http://www.rgenome.net/cas-

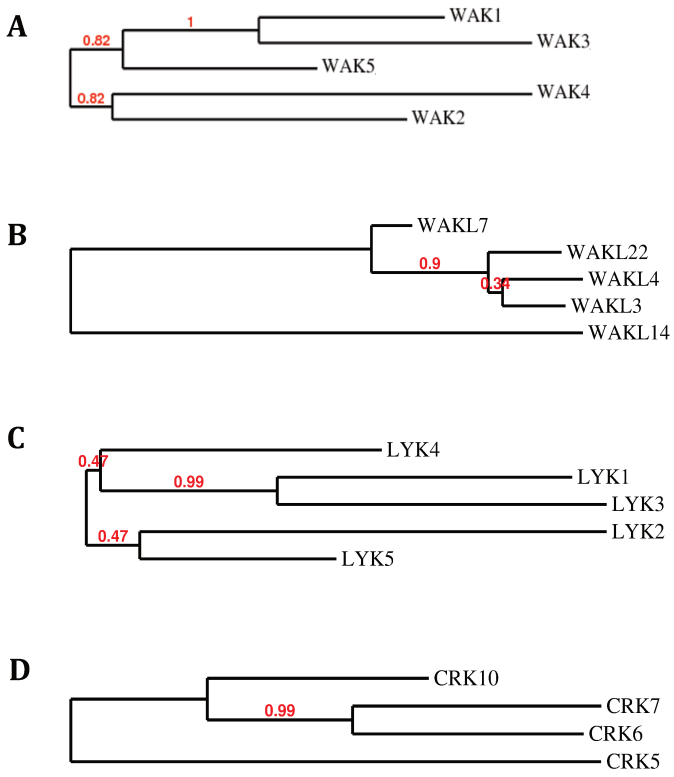


Figure 48: Phylogénies des PRR induits par les Xh dans les données microarrays.
Les phylogénies réalisées à partir de séquences peptidiques des PRR de certains membres des familles WAK, WAKL, LYK et CRK d'*Arabidopsis thaliana* ont été obtenues à l'aide des logiciels d'analyse phylogénétique présents sur le site www.phylogeny.fr.

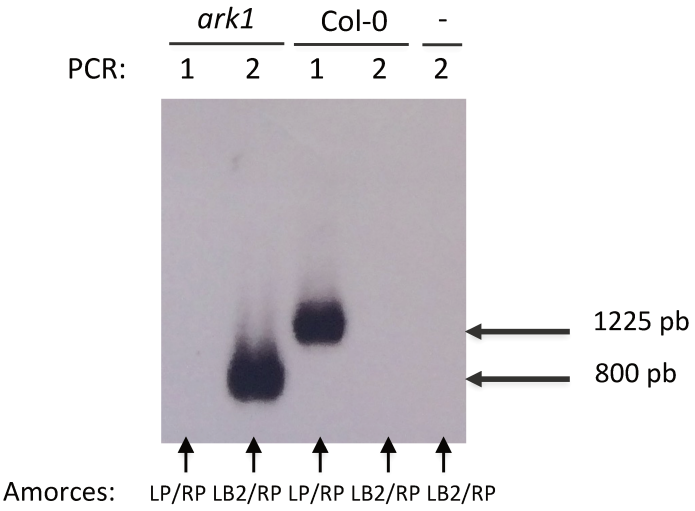


Figure 49: Génotypage d'une lignée mutante (*ark1*). 1 : Amplification PCR 1 sur ADN génomique avec les deux amorces génomiques (*Left Primer* (LP) et *Right Primer* (RP)). Amplification PCR 2 avec les amorces *Left Border 2* (LB2)/RP pour confirmer l'insertion d'un ADN-T au sein du gène cible. - : Témoin négatif (eau).

designer/). Nous avons comparé les scores issus des différents logiciels afin de sélectionner les deux ARNg indépendants qui possédaient la meilleure balance efficacité/spécificité (Tableau 10). « Crispr-P on » donne les scores d'efficacité des ARNg et « Crispr-P off » donne les scores des effets hors cibles. Nous avons ainsi choisi les séquences nommées G43 et T22- que nous nommerons par la suite ARK1/2-337 (violet, Figure 52) et ARK1/2-326 (rouge, Figure 52) qui ciblent les gènes *ARK1* et *ARK2* dans leur premier exon respectif.

2.2.2. Chargement des ARNg dans les vecteurs de destination

Le vecteur de destination choisi est le vecteur pDGE63 (pDGE Dicot Genome Editing Kit, Addgene ; Ordon et al., 2017). Ce plasmide de 14952 pb, dont la construction a été vérifiée par digestion enzymatique (Figure 53) contient un gène de résistance à la spectinomycine *SmR*, la séquence codante de l'endonucléase Cas9 et une séquence *BlpR* conférant une résistance au glufosinate aux plantes transformées. Ce vecteur comporte une cassette de clonage *ccdb-CmR* bornée des séquences *BpiI* nécessaires à la recombinaison de type Golden Gate, pendant laquelle le domaine *ccdb* (Control of Cell Death) et le gène de résistance au chloramphénicol *CmR* seront remplacés par les séquences des ARNg (Figure 24 du Matériels et Méthodes).

Après recombinaison avec les ARNg, les vecteurs obtenus sont nommés pDGE63-326 pour les plasmides ayant intégré les oligonucléotides ARK1/2-326 et pDGE63-337 pour les plasmides ayant intégré les oligonucléotides ARK1/2-337. Le plasmide « vide » est appelé plasmide natif.

2.2.3. Criblage de transformants d'*E. coli* pour vérifier l'intégration des plasmides recombinants

Après transformation d'*E. coli* avec les plasmides recombinants obtenus précédemment et sélection des bactéries positives sur spectinomycine, l'ADN plasmidique est extrait de 3 colonies indépendantes puis une carte de restriction est réalisée en utilisant l'enzyme *PvuII*. Les profils de digestion des 3 plasmides par *PvuII* (Figure 54) correspondent aux profils de digestion attendus, bien que la bande à 1446 pb paraisse peu intense (Figure 54).

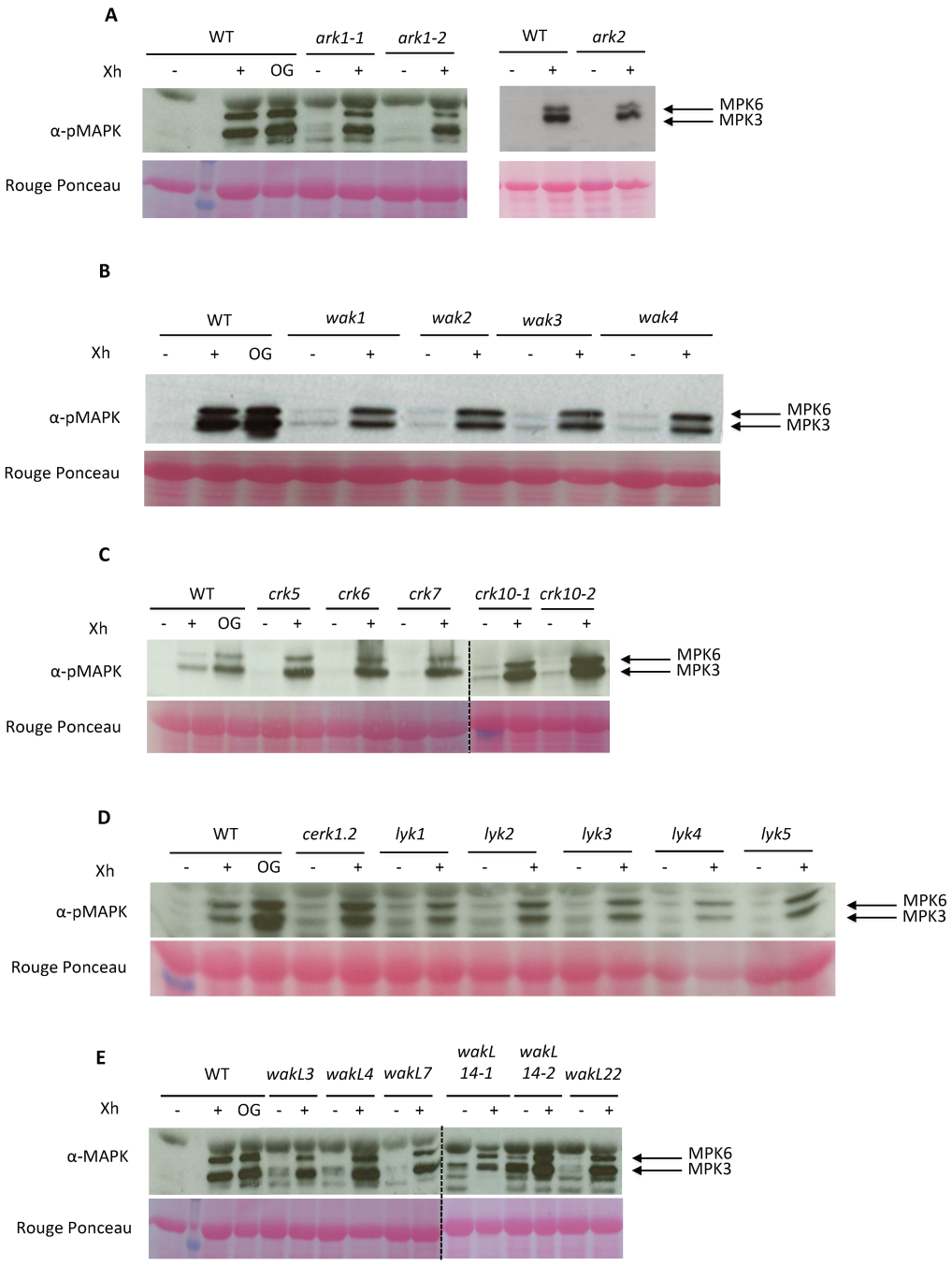


Figure 50: Phosphorylation des MAPK en réponse aux Xh chez les mutants des familles ARK (A), WAK (B), CRK (C), LYK (D) et WAKL (E).

La phosphorylation des MAPK à 10 min analysée par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les protéines pERK1/2 reconnaissant les MAPK phosphorylées MPK3/6 d'Arabidopsis. La coloration au Rouge Ponceau permet de vérifier le chargement identique de toutes les pistes. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. - : eau ; + : Xh (1 mg/ml).

2.2.4. Séquençage des constructions plasmidiques obtenues

Le séquençage des insertions d'ARNg a été réalisé chez ATCG Biotech à l'aide de l'amorce pPMR (Tableau 7) complémentaire à la séquence plasmidique en aval de la séquence gRNA scaffold (Figure 55). Nous avons aligné sur Blastn (NCBI) les résultats des séquençages avec les séquences théoriques des plasmides contenant les ARN guides insérés. Nous avons obtenus 100% d'identité entre la séquence des ARNg et la séquence théorique (Figures 56 et 57). Nos constructions ont donc été validées et les transformations entreprises.

2.2.5. PCR de vérification après transformation d'Agrobactéries compétentes

Nous avons par la suite transformé des *Agrobacterium tumefaciens* (souche GV3101) compétentes avec nos trois plasmides (natif, pDGE63-326 et pDGE63-337) et choisi 4 colonies par construction. Une PCR de vérification sur ces colonies a été réalisée à l'aide des couples d'amorces pPMR/p326 et pPMR/p337 (Tableau 7 et Figure 58). Les insertions ARK1/2-326 et ARK1/2-337 ont bien été amplifiées dans les vecteurs pDGE63-326 et pDGE63-337 respectivement. Comme attendu, aucune amplification n'a été détectée dans le plasmide natif pDGE63 (Figure 58).

2.2.6. Obtention de transformants d'Arabidopsis

Les agrobactéries précédemment obtenues ont permis de transformer des fleurs d'Arabidopsis sauvages (Col-0) afin d'en obtenir des graines (Clough and Bent, 1998). Sur environ 3000 graines semées pour chaque transformation sur un milieu contenant du glufosinate, seulement 3 graines ont donné des plantules vertes : 1 graine provenant de la transformation de la plante 1 avec le plasmide pDGE63-337 et 2 graines provenant de la transformation de la plante 2 également avec le plasmide pDGE63-337 (Figure 59). L'ADN génomique de ces 3 plantes (nommées A, B et C) a été extrait et séquencé à l'aide des amorces pARK1 et pARK2 (Tableau 7). Malheureusement, aucune mutation n'a été détectée dans les 3 plantes à proximité du site théorique de coupure de la Cas9 dans les gènes *ARK1* et *ARK2* (Figures 60, 61 et 62).

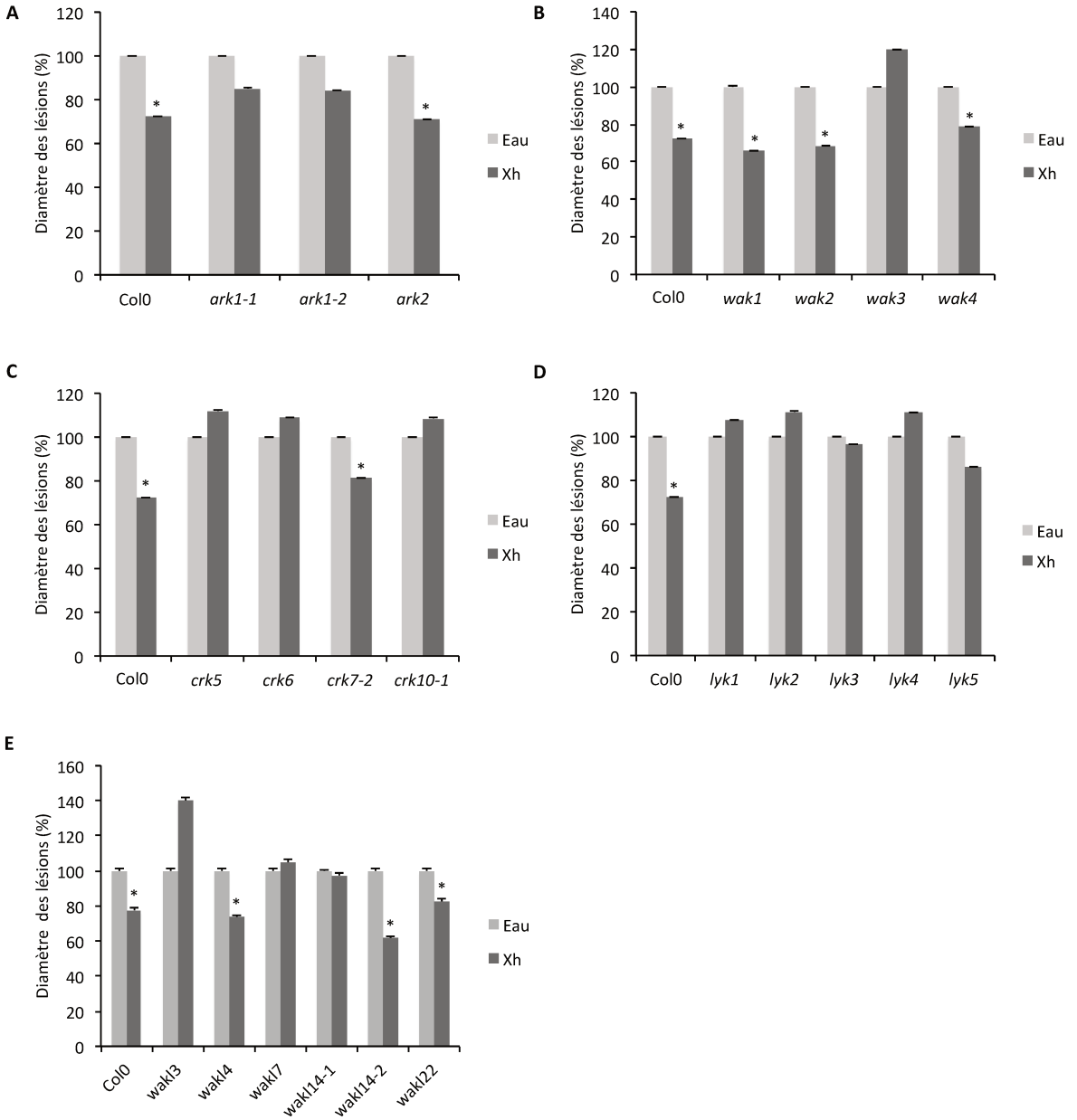


Figure 51: Résistance induite en réponse aux Xh contre *B. cinerea* chez les mutants de récepteurs candidats.

Deux jours après un traitement à l'eau ou aux Xh (2,5 mg/ml), les plantes de lignées T-DNA homozygotes des familles des ARK (A), WAK (B), CRK (C), LYK (D) et WAKL (E) sont inoculées avec *B. cinerea* (gouttes de 6 µl à 5.10^4 conidies/ml) et les lésions sont mesurées 3 jours post inoculation (jpi). Les résultats représentent la moyenne du diamètre des lésions exprimée en pourcentage de 3 expériences indépendantes (n=80), excepté pour les mutants *lyk* avec seulement 2 répétitions biologiques. Le traitement eau correspond à une taille de lésion de 100% et les barres correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Les astérisques indiquent une différence significative entre le traitement eau et le traitement Xh (test t de Student :*, $P<0,05$).

3. Discussion

3.1. Identification du problème rencontré lors de la stratégie d'édition génomique

Afin d'obtenir un double mutant *ark1/ark2*, nous avons utilisé la technique CRISPR-Cas9 et nous avons obtenu 3 plantes suite au criblage sur herbicide. Nous avons recherché des évènements mutationnels dans ces 3 plantes issues de la génération T1, sans succès. Ce résultat n'est pas étonnant étant donné que les mécanismes d'édition du système Cas9 fonctionnent indépendamment dans chaque cellule végétale, les plantes de la génération T1 sont généralement des chimères avec des génotypes distincts. Par conséquent (et en raison du nombre limité de plantes disponibles dans la génération T1), les approches de criblage pour la détection de mutations devraient être appliquées aux générations T2 ou suivantes (Hahn et al., 2017). Il est d'ailleurs recommandé de sélectionner les descendants de trois à quatre lignées transformées indépendantes, car l'efficacité des mutations peut varier d'une lignée à l'autre en raison du site d'intégration de la cassette d'ADN-T (Hahn et al., 2017). Récemment, il a été démontré qu'un stress thermique pouvait améliorer la fréquence de mutations induite par le système CRISPR-Cas9 (LeBlanc et al., 2018).

Un autre point étonnant est le faible nombre de plantes positives obtenus lors du criblage sur herbicide alors que nous avons réalisé en tout 3 transformations indépendantes et semé plusieurs milliers de graines issues de ces transformations. En effet, aucun transformant n'a été isolé à la suite des deux premières transformations. Nous avons tout d'abord suspecté un problème lors du protocole de transformation par la méthode « floral dip ». Cependant, des transformations réalisées en parallèle avec le vecteur pB2GW7 pour un clonage Gateway contenant également une résistance *BlpR* ont obtenues un taux de transformation de 1‰ (Cécile Blanchard, données personnelles), suggérant plutôt un problème sur notre plasmide pDGE63. En analysant de nouveaux nos données, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle un problème de résistance au glufosinate conduirait au faible taux de transformants. Sur la Figure 54, les profils de digestion du plasmide par l'enzyme de restriction *PvuII* laissent apparaître une bande peu intense à 1446 pb, contenant la séquence *BlpR*. Nous avons donc utilisé des amorces

		Logiciel de prédiction et d'analyse d'ARNg				
Spacer	**Séquence**	**SSC**	**GE**	**Crispr-P on**	**Crispr-P off**	**Cas-designer**
G31	GTTTGGTCGACGAATATAAC	-0.1145	19.33	0.50	0.128/0.017 (inter/exon)	78
G43	**TGGTCGACGAATATAACCGG**	**1.3759**	**39.24**	**0.40**	**0.177 (exon)**	**81**
G8	AGGAGATGTGAGATCACCAG	0.8469	54.11	0.72	0.471/0.333 (inter/exon)	57.4
T25-	CCGAGCTCGAAGATTTGACT	0.0042	8.13	0.13	0.271/0.039 (inter/exon)	82.6
T20-	CGGACTGATCGAAAATGACG	0.7232	45.18	0.54	0.250 (exon)	51.7
T26+	ATCAGTCCGATAGGCCTGTT	-1.2305	4.26	0.08	0.378 (CDS)	66.7
T22-	**CGTCGACCAAACAGGCCTAT**	**-0.3277**	**14.88**	**0.46**	**0.015 (exon)**	**72.9**

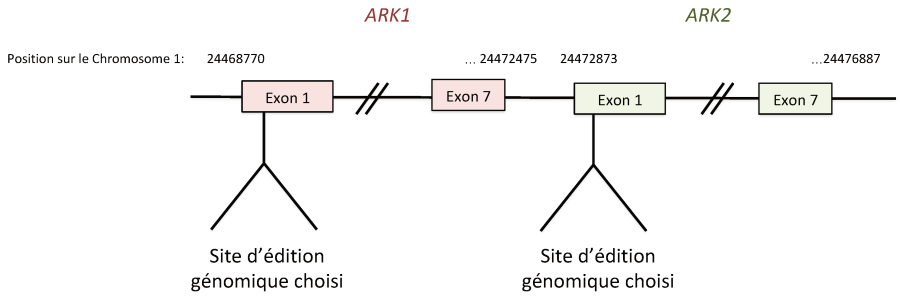
Tableau 10: Comparaison des scores des sites ARNg issus des logiciels de prédiction et d'analyse d'édition du génome.

En vert, score élevé dans une séquence cible. En rouge, score faible dans une séquence cible ou score élevé dans une séquence hors cible. En gras, les deux ARNg sélectionnés.

bordant la séquence *BlpR* afin de l'amplifier par PCR dans le plasmide natif. Etonnamment, nous n'avons pas réussi à amplifier cette portion du plasmide. Le séquençage de la cassette *BlpR* dans le plasmide natif a donc été réalisé à l'aide d'une amorce créée dans la séquence du promoteur NOS située en amont de la séquence *BlpR* (Figure 63). De manière surprenante, l'alignement entre la séquence obtenue et la séquence théorique *BlpR* n'a donné aucun résultat. Nous avons donc utilisé l'outil d'alignement BLAST afin d'interroger la banque de données de séquences nucléotidiques. Notre séquence possède 99% d'identités avec des séquences *Pnos*, codant un gène de résistance à la kanamycine (Figure 64). Notre vecteur ne contient donc pas de résistance au glufosinate, ce qui expliquerait le très faible taux de transformants obtenus. Ceux-ci sont vraisemblablement des faux positifs puisque ces plantes ne possèdent pas le gène de résistance à l'herbicide utilisé. Néanmoins, nous avons prévu de semer les graines restantes issues des différentes transformations sur du milieu MS/2 supplémenté en kanamycine afin de sélectionner des plantes ayant réellement intégré l'ADN-T. De plus, il serait intéressant de vérifier le stock de plasmide. En effet, il est possible qu'il y ait eu une erreur de la part du fournisseur et que le plasmide pDGE63 contienne un gène de résistance à la kanamycine à la place du glufosinate. Les auteurs de la publication dont sont issus les vecteurs (Ordon et al., 2017) ont d'ailleurs observé que les plasmides pDGE144-165 contenaient des marqueurs Hygromycine et Basta non fonctionnels (Johannes Stuttmann, communication personnelle). Enfin, il se peut qu'au laboratoire nous ayons échangé les plasmides et pris malencontreusement le vecteur pDGE62 (15579 pb, également présent au laboratoire) qui contient les mêmes caractéristiques que le vecteur pDGE63 (14952 pb) à l'exception de la résistance à l'herbicide (Tableau 11).

Si nous parvenons à isoler des plantes résistantes à la kanamycine, ces plantes T1 seront génotypées (PCR et/ou digestion par enzyme de restriction) puis auto-fécondées et la génération T2 subira également une sélection sur antibiotique afin d'éliminer les plantes sauvages. Les plantes T2 résistantes seront alors séquencées afin d'identifier des plantes hétérozygotes ou *ark1/ark2* homozygotes. L'analyse des réponses biologiques aux Xh de ce double mutant permettra de confirmer ou d'invalider l'hypothèse d'une compensation entre les deux récepteurs ARK1 et ARK2 et de mieux comprendre leur participation à la perception des Xh. Dans un premier temps, la résistance basale du double mutant *ark1/ark2* pourra être testée contre plusieurs pathogènes, dont *B.*

A



B

C

Figure 52: Schéma des gènes *ARK1* et *ARK2* (A) et localisation des ARNg sur les séquences des gènes *ARK1* (B) et *ARK2* (C).

Les 400 et 550 premiers nucléotides des séquences des gènes *ARK1* et *ARK2* respectivement, sont représentés à l'aide du logiciel Snapgene (www.snapgene.com). En rouge sont représentées les séquences de l'ARNg ARK1/2-326, du site PAM (*Point Accepted Mutation*) et du site de coupure par la Cas9 associée. En violet sont représentées les séquences de l'ARNg ARK1/2-337, du site PAM et du site de coupure par la Cas9 associée.

cinerea. Par la suite, des évènements de signalisation pourront être analysés en réponse aux Xh tels que la phosphorylation des MAPK, l'expression de gènes de défense ou encore la production de callose. Enfin, nous pourrons réaliser des biotests de résistance induite par les Xh contre *B. cinerea* et *H. arabidopsidis* chez le double mutant *ark1/ark2*.

3.2. Autres perspectives

Mis à part ARK1 et ARK2, d'autres PRR semblent être des candidats potentiellement intéressants dans la perception des Xh. Tout d'abord, la résistance induite par les Xh est perdue chez le mutant *sobir1.* Chez plusieurs espèces végétales, une accumulation des transcrits de *SOBIR1* a été observée en réponse à une infection par des agents pathogènes ou lors d'un traitement avec le SA ou des éliciteurs (Liebrand et al., 2014; Peng et al., 2015). De plus chez la tomate et Arabidopsis, SlSOBIR1 et AtSOBIR1 se sont avérés nécessaires pour résister à plusieurs agents pathogènes, notamment aux champignons et aux oomycètes *H. arabidopsidis* et *Phytophthora parasitica* (Liebrand et al., 2014; Peng et al., 2015; Zhang et al., 2014). Il a d'ailleurs été proposé que SOBIR1 joue un rôle dans les réponses immunitaires *via* son interaction avec de nombreux RLP. Les complexes RLP-SOBIR1 seraient ainsi des équivalents fonctionnels aux RLK, SOBIR1 fournissant son domaine kinase manquant aux RLP (Bi et al., 2016; Gust and Felix, 2014; Liebrand et al., 2014). Il est donc tout à fait possible que SOBIR1 participe à la perception des Xh au sein d'un complexe moléculaire avec d'autres RLP et RLK.

Une autre famille de récepteurs pouvant jouer un rôle dans la perception des Xh est la famille des WAKL. Chez Arabidopsis, 22 membres ont été identifiés et les WAKL possèdent des similarités de séquences avec les WAK (Verica and He, 2002). La fonction précise de chacun des membres des WAKL est encore inconnue. Exceptés les cinq gènes *WAKL7*, *WAKL8*, *WAKL12*, *WAKL16*, et *WAKL19* prédits pour coder des protéines tronquées et probablement sécrétées, les protéines WAKL et WAK possèdent des structures similaires, contenant un domaine kinase hautement conservé, un domaine transmembranaire et une région extracellulaire comprenant un domaine EGF_CA (*calcium-binding EGF-like domain*) et/ou un domaine EGF-like et/ou un domaine EGF (Liu et al., 2006; Verica and He, 2002). Contrairement aux gènes *WAK*, qui sont principalement exprimés dans les tissus verts, les gènes *WAKL* sont fortement exprimés dans les racines et les fleurs (Verica et al., 2003). D'après nos résultats, *wakl3*, *wakl7* et

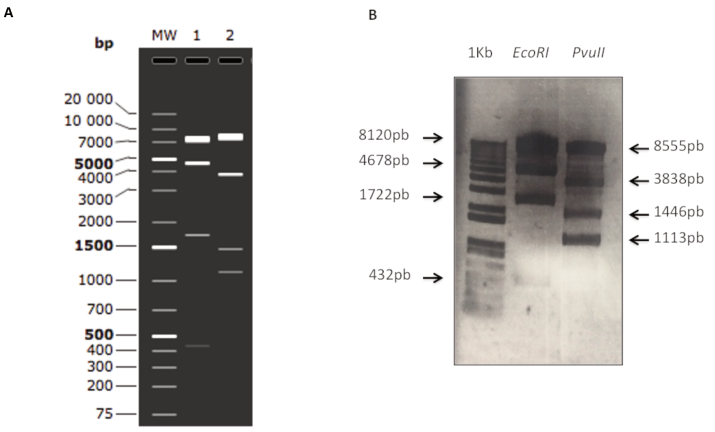


Figure 53: Cartes de restriction théorique et réelle du plasmide pDGE63.

A. Digestion théorique par les enzymes *EcoRI* et *PvuII* (pistes 1 et 2 respectivement) du plasmide pDGE63 à l'aide du logiciel Snapgene.

B. Digestion par les enzymes *EcoRI* (Invitrogen) et *PvuII* (Biolabs) d'un µg de plasmide pDGE63. Dépôt sur gel d'agarose 1%.

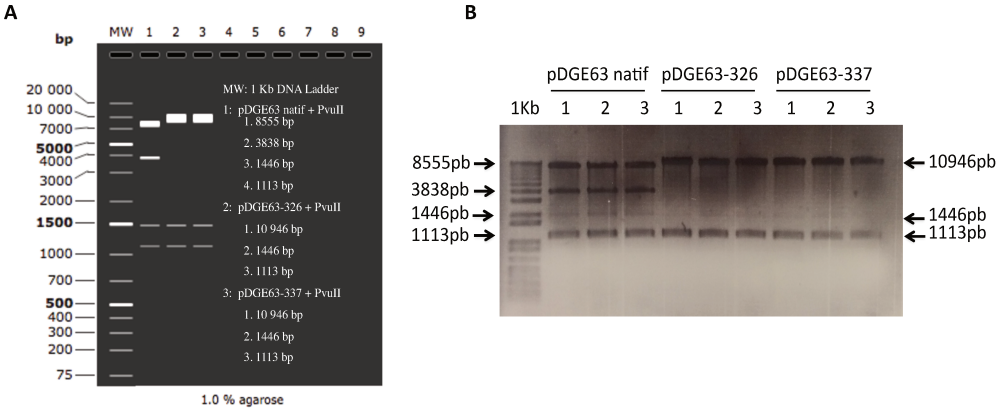


Figure 54: Cartes de restriction théorique et réelle des plasmides issus des clonages pDGE63-326 et pDGE63- 337.

A. Digestion théorique par l'enzyme *PvuII* du plasmide natif pDGE63 (piste 1) et des constructions pDGE63-326 (piste 2) et pDGE63-337 (piste 3) à l'aide du logiciel Snapgene.

B. Digestion par l'enzyme *PvuII* du plasmide natif pDGE63 et des constructions pDGE63-326 et pDGE63-337 (3 colonies testées pour chaque construction). Dépôt sur gel d'agarose 1%.

Figure 55: Localisation de l'amorce pPMR sur le plasmide pDGE63.

L'amorce pPMR utilisée pour le séquençage est située en aval de la séquence gRNA scaffold et visualisée à l'aide du logiciel Snapgene.

wakl14-1 possèdent une phosphorylation de MPK6 un peu plus faible et une perte de résistance induite contre *B. cinerea* en réponse aux Xh. Tout comme WAK1 qui peut fixer les OG *in vitro*, il est possible que les WAKL puissent lier les Xh, des fragments également pariétaux, *via* leur domaine extracellulaire. De plus, la localisation contigüe des gènes *WAKL1* à *WAKL8* sur le chromosome 1 d'Arabidopsis laisse imaginer des rôles redondants pour ces protéines. De manière intéressante, l'expression de *WAKL7* peut être induite à la suite d'une blessure (Verica et al., 2003), faisant de WAKL7 un candidat de choix pour la perception des Xh libérés de la paroi par les enzymes hydrolytiques libérées lors d'une attaque par un agent pathogène. L'obtention du triple mutant *wakl3*/*wakl7*/*wakl14*, par mutagenèse insertionnelle ou par le système CRISPR-Cas9, permettrait d'évaluer une éventuelle redondance fonctionnelle de ces 3 récepteurs dans la perception des Xh.

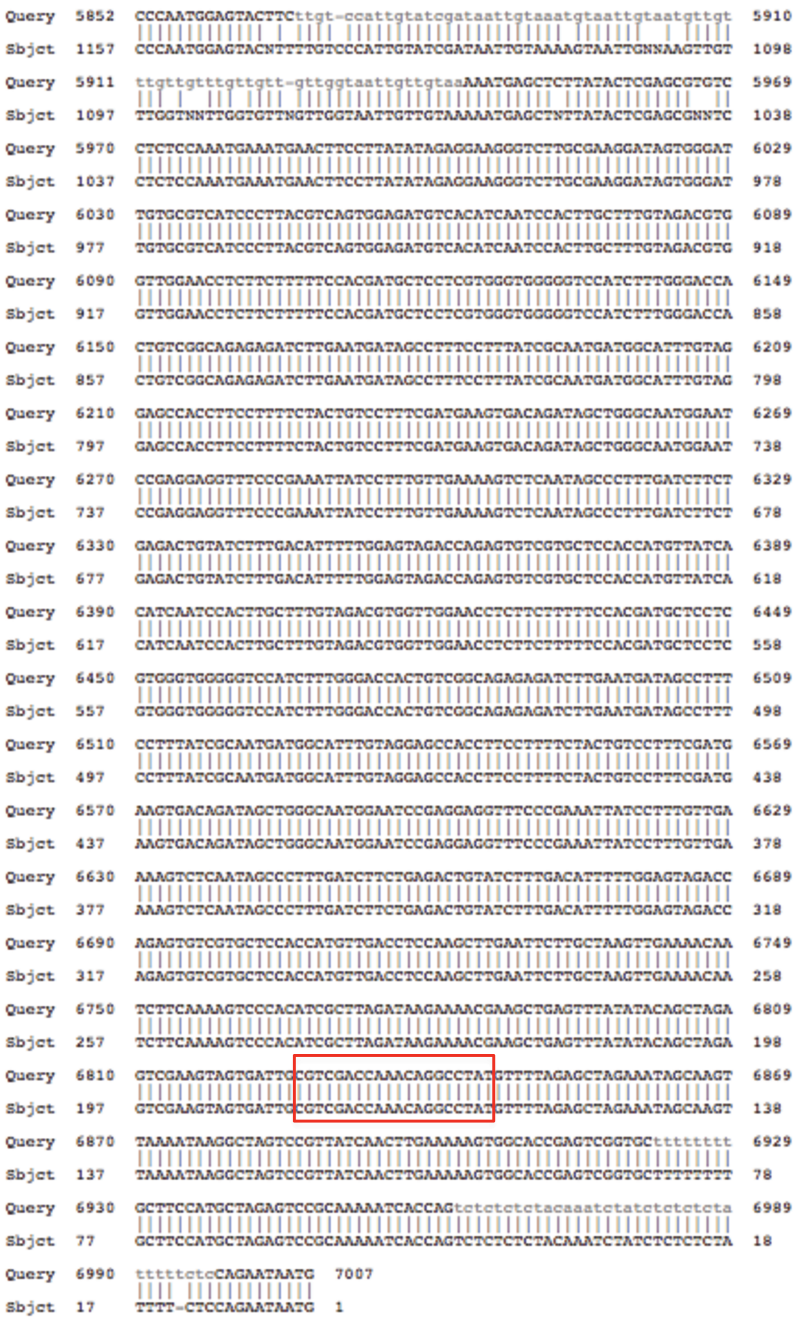


Figure 56: Alignement du résultat de séquençage de la construction pDGE63-326 avec la séquence théorique du plasmide pDGE63-326.

L'alignement des deux séquences est réalisé à l'aide du logiciel Blastn du site https://blast.ncbi.nlm.nih.gov. La séquence de l'ARNg est encadrée en rouge. Query : séquençage pDGE63-326 ; Sbjct : séquence théorique pDGE63-326.

CHAPITRE VI. DISCUSSION GENERALE

1. Les Xh : de nouveaux produits stimulateurs de défense des plantes ?

Les Xh testés induisent des réponses de défense classiquement activées par d'autres PAMP et DAMP mais ils confèrent surtout une résistance contre *B. cinerea* chez la vigne et Arabidopsis. Il serait intéressant de vérifier si les Xh sont également capables d'induire une protection au vignoble, bien qu'ils induisent des réponses de défense transitoires et plus faibles comparés à certains éliciteurs comme les OG ou la laminarine (Aziz et al., 2003; Poinssot et al., 2003). Des essais au laboratoire ont montré que la laminarine réduisait les symptômes du mildiou et de la pourriture grise (Aziz et al., 2003). Malheureusement, les essais au vignoble n'ont pas donné de résultats reproductibles. Il serait donc judicieux de tester la résistance induite chez d'autres plantes d'intérêt agronomique sensibles à ce champignon telles que la tomate et la fraise. Ainsi, plusieurs traitements à la laminarine sur des cultures de fraises ont permis de réduire l'infection par le mildiou jusqu'à 70% et de 50% pour la pourriture grise (Meszka & Bielenin, 2011).

Les Xh semblent posséder un double rôle dépendant de leur concentration. En effet, à faible dose, les Xh semblent jouer un rôle dans la croissance et le développement, notamment en induisant une accélération de l'élongation et de la division cellulaire chez le tabac et dans la résistance aux stress abiotiques (Fry et al., 1993; González-Pérez et al., 2014). A plus forte dose, nos travaux ont montré que les Xh sont des stimulateurs de défense capable d'induire une protection. Il n'est d'ailleurs pas étonnant d'utiliser de fortes doses d'oligosaccharides, notamment en application par pulvérisation. En effet, lors des essais de protection de la vigne contre l'agent du mildiou avec la laminarine sulfatée (PS3), le taux de réduction maximal de la maladie a atteint 85% avec une concentration de 5 g/l, alors qu'il n'était plus que de 57% lorsque la dose a été réduite à 1,25 g/l (Trouvelot et al., 2008). Cet effet dose-dépendant a également été observé lors d'essais au vignoble avec cet oligosaccharide contre l'oïdium (X. Daire, communication personnelle).

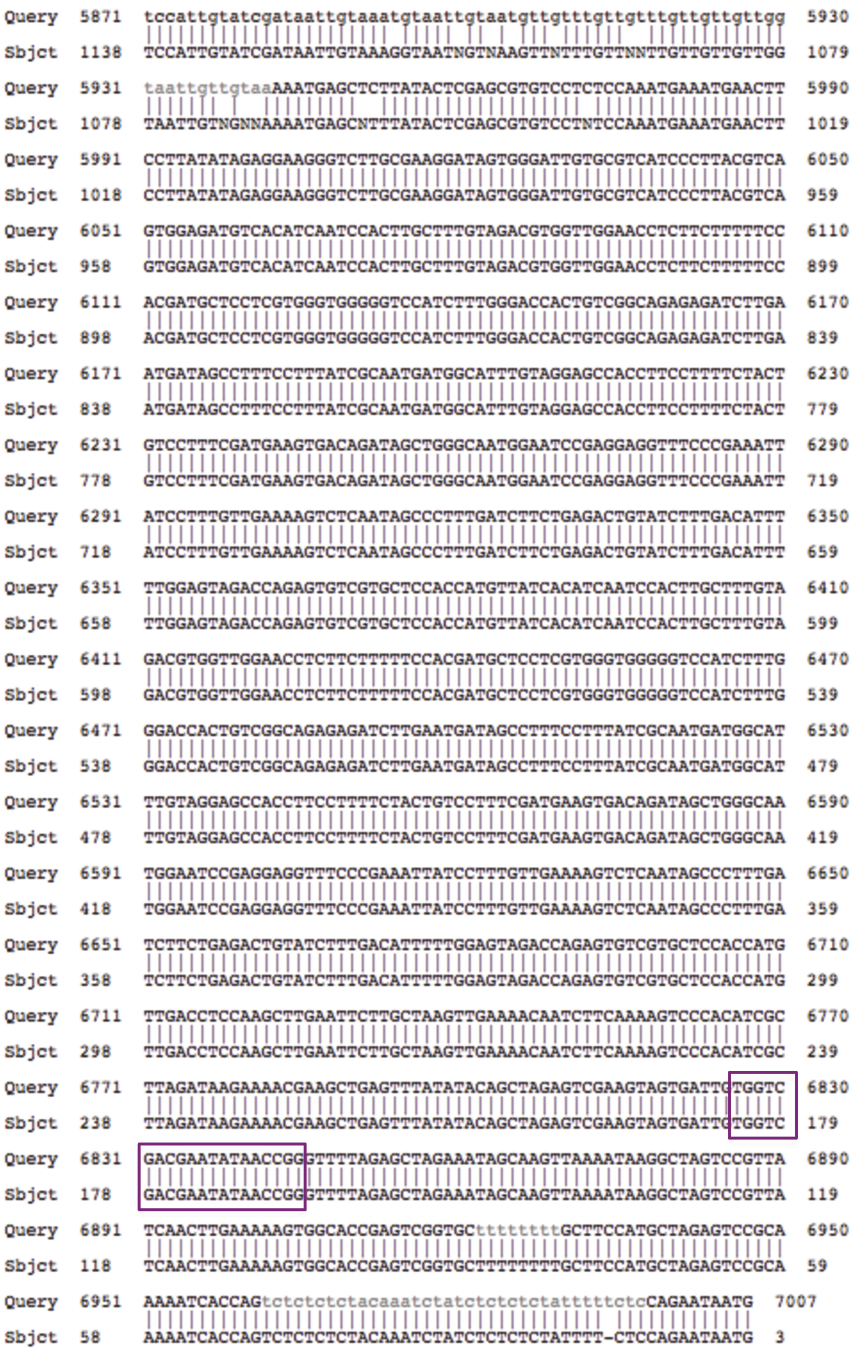


Figure 57: Alignement du résultat de séquençage de la construction pDGE63-337 avec la séquence théorique du plasmide pDGE63-337.

L'alignement des deux séquences est réalisé à l'aide du logiciel Blastn du site https://blast.ncbi.nlm.nih.gov. La séquence de l'ARNg est encadrée en violet. Query : séquençage pDGE63-337; Sbjct : séquence théorique pDGE63-337.

L'efficacité des éliciteurs dépend aussi de leur biodisponibilité. Une fois pulvérisés, les oligosaccharides, composés hydrophiles, doivent traverser la barrière hydrophobe formée par la cuticule avant d'atteindre la paroi cellulaire et la membrane plasmique afin d'être perçus. Paris et al. (2015) ont montré qu'un tensio-actif utilisé comme adjuvant améliore nettement la pénétration des oligosaccharides et l'efficacité de la laminarine sulfatée contre *P. viticola*. Dans notre étude, nous n'avons pas utilisé d'adjuvant lors des traitements avec les Xh car ces produits stressent les plantes, ce qui complique l'étude des effets propres de l'éliciteur sur les réactions de défense. Il apparaît néanmoins important d'étudier l'effet d'adjuvants sur l'efficacité des Xh. Les microorganismes de la phyllosphère pourraient également jouer un rôle dans la biodisponibilité des Xh. Une hypothèse peut être émise selon laquelle les Xh pourraient être altérés et hydrolysés par diverses enzymes telles que des endoglucanases, xylanases… sécrétées par les microbes de la phyllosphère, diminuant la quantité de fragments éliciteurs disponibles ou les rendant inactifs. Il serait donc intéressant d'étudier également la biodégradation de ces oligosaccharides lorsqu'ils sont utilisés au vignoble.

2. Les PRR utilisables en amélioration variétale ?

A l'heure actuelle, une des problématiques majeures à laquelle doit faire face l'humanité est d'assurer la sécurité alimentaire à une population en croissance constante. En 2050, la population mondiale devrait atteindre 9,8 milliards d'individus et la production alimentaire devra progresser d'au moins 70% (www.fao.org, 2017). D'autres facteurs importants menacent l'agriculture et la production alimentaire, tels que les conditions météorologiques extrêmes, les stress biotiques et abiotiques croissants ou encore la disponibilité réduite des terres agricoles. Le développement de technologies pouvant contribuer à l'amélioration des cultures peut aider à augmenter la production et la résistance contre les agents pathogènes. Durant ces dernières années, de grands progrès ont été réalisés sur la compréhension de la perception des PAMP ainsi que l'identification de PRR. Chez Arabidopsis, le criblage de vastes collections de mutants et d'écotypes naturels ont abouti à l'identification de nouveaux PRR. Mais les recherches sont également portées sur des plantes d'intérêt agronomique. Notre équipe a ainsi identifié de nouveaux couples de PAMP/PRR chez la vigne, à savoir VvFLS2 qui

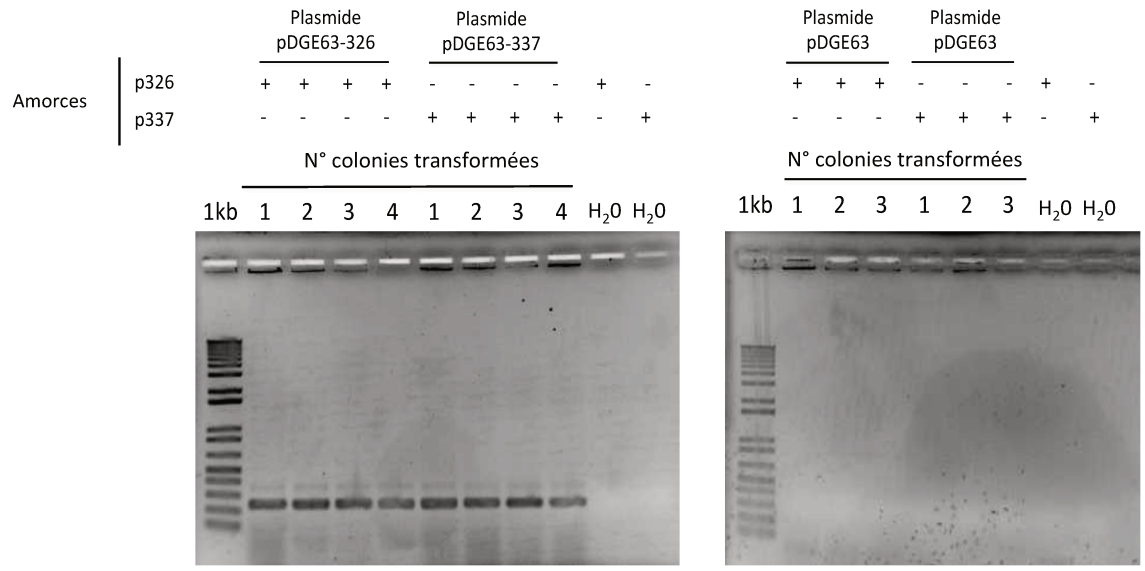


Figure 58: PCR sur colonies d'agrobactéries transformées avec les plasmides pDGE63-326, pDGE63-337 et pDGE63 natif.
Les insertions ARK1/2-326 et ARK1/2-337 ont bien été amplifiées dans leurs vecteurs pDGE63-326 et pDGE337 respectifs avec les amorces respectives. Comme attendu, aucune amplification n'a été détectée chez le plasmide natif pDGE63.

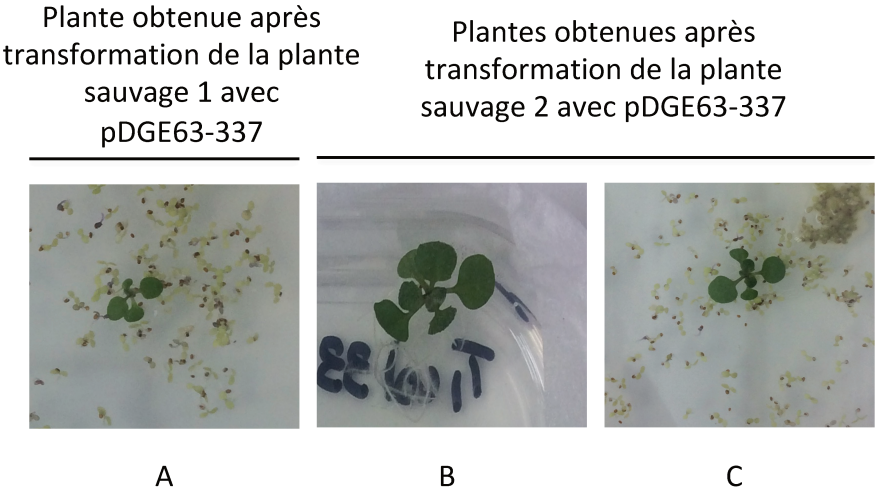


Figure 59: Sélection des plantes résistantes au glufosinate.
Trois graines issues de deux plantes Col-0 transformées par les plasmides pDGE63-337 ont germé sur milieu MS/2 contenant du glufosinate (50 µg/ml) pour donner naissance aux 3 plantes A, B et C.

perçoit flg22 et VvLYK1-1 et VvLYK1-2 impliqués dans la perception de la chitine et du chitosan. VvLYK1-1 joue un rôle important dans la résistance basale contre *E. necator.* Il serait intéressant d'exprimer constitutivement ce PRR dans tous les tissus afin d'accroître la résistance basale à l'agent de l'oïdium. Néanmoins, plusieurs études ont montré que la surexpression des PRR n'augmentait pas forcément la résistance à l'agent pathogène (Kishimoto et al., 2010; Takai et al., 2008).

Depuis la découverte révolutionnaire que l'introduction du récepteur EFR d'Arabidopsis chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) et chez le tabac (*Nicotiana benthamiana*) confère une résistance accrue à un large spectre d'agents pathogènes bactériens (Lacombe et al., 2010), il est devenu évident que le transfert de PRR offraient de belles perspectives en matière de sélection végétale et ceux-ci doivent maintenant être considérés comme une nouvelle source de résistance (Kourelis and van der Hoorn, 2018). De nombreux autres transferts ont réussi, notamment entre mono- et dicotylédones, conférant parfois une résistance limitée à un genre microbien ou à un groupe d'espèces (Rodriguez-Moreno et al., 2017). Actuellement, les transferts les plus réussis sont ceux impliquant des PRR de surface, probablement parce que ce type de récepteurs possède des kinases hautement conservées en aval des cascades de signalisation. Néanmoins, des transferts de PRR cytoplasmiques appelés *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat receptors* (NLRs) ont été rapportés. C'est le cas du NLR d'orge *Mildew Resistance Locus A* (MLA1) introduit chez Arabidopsis et qui confère à la plante une résistance contre l'oïdium de l'orge sécrétant l'effecteur AVRA1 (Maekawa et al., 2012).

Etant donné que la perception du ligand est principalement déterminée par le domaine extracellulaire, et que la signalisation induite est dépendante du domaine kinase, des protéines chimériques composées des domaines de différents récepteurs ont été créées. Le domaine kinase de XA21 s'associe aux composants intracellulaires d'EFR afin d'activer l'immunité d'Arabidopsis (Holton et al., 2015). De même, les transformants de riz exprimant les chimères EFR::XA21 répondent au PAMP elf18 de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* et *Escherichia coli* (Schwessinger et al., 2015). Les récepteurs chimériques ont l'avantage d'améliorer la réponse immunitaire, en augmentant l'affinité pour le PAMP et/ou en améliorant l'activité kinase.

En plus du criblage de collections naturelles d'écotypes, une évolution artificielle par mutagenèse aléatoire ou dirigée peut également être utilisée afin d'élargir le spectre

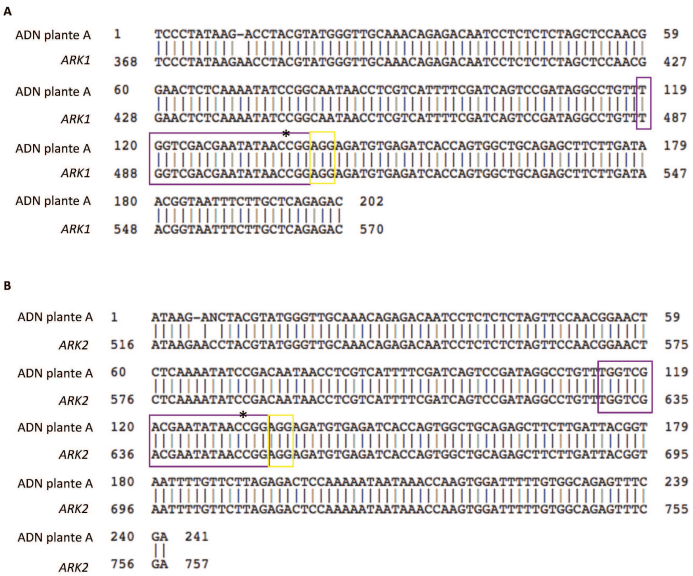


Figure 60: Alignement des résultats de séquençage de la plante A avec les séquences des gènes *ARK1* (A) et *ARK2* (B).

L'ADN de la plante A a été séquencé à l'aide des amorces pARK1 (A) et pARK2 (B). Les séquences ADN sont alignées avec Blastn. Les séquences des ARNg sont encadrées en violet et la séquence PAM en jaune. Les astérisques indiquent le site théorique de coupure de la Cas9.

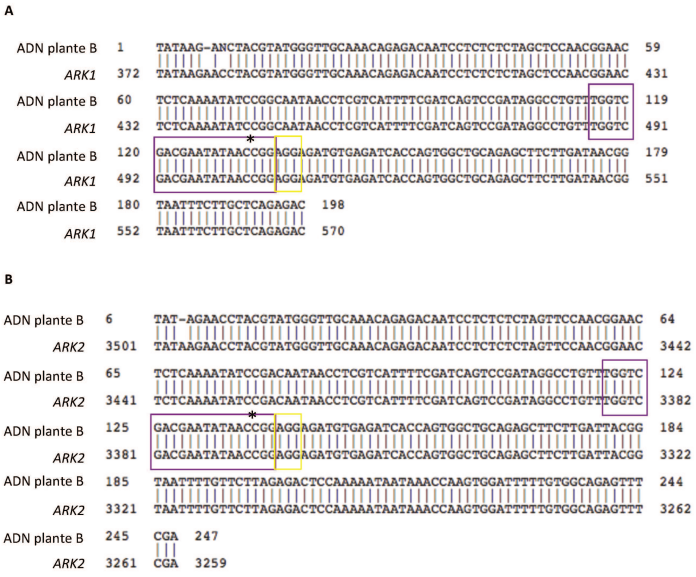


Figure 61: Alignement des résultats de séquençage de la plante B avec les séquences des gènes *ARK1* (A) et *ARK2* (B).

L'ADN de la plante B a été séquencé à l'aide des amorces pARK1 (A) et pARK2 (B). Les séquences ADN sont alignées avec Blastn. Les séquences des ARNg sont encadrées en violet et la séquence PAM en jaune. Les astérisques indiquent le site théorique de coupure de la Cas9.

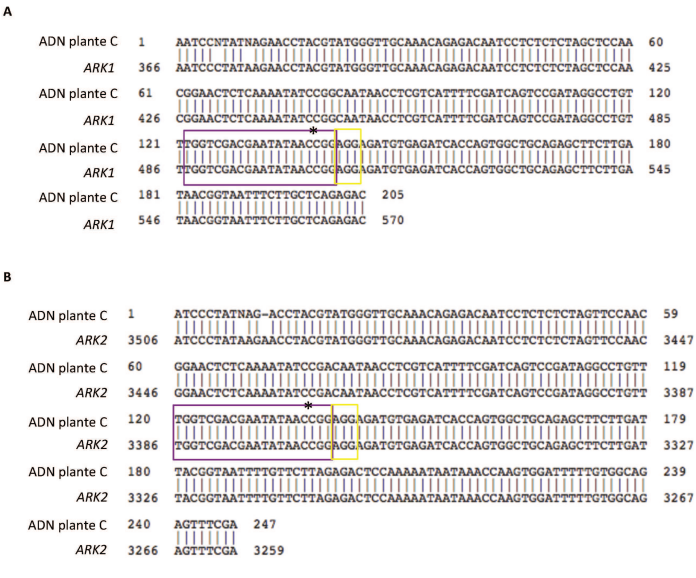


Figure 62: Alignement des résultats de séquençage de la plante C avec les séquences des gènes *ARK1* (A) et *ARK2* (B).

L'ADN de la plante C a été séquencé à l'aide des amorces pARK1 (A) et pARK2 (B). Les séquences ADN sont alignées avec Blastn. Les séquences des ARNg sont encadrées en violet et la séquence PAM en jaune. Les astérisques indiquent le site théorique de coupure de la Cas9.

de reconnaissance des PRR. Ainsi, le PRR Rx confère une résistance contre une seule souche du virus X de la pomme de terre (PVX) en reconnaissant les protéines de la capside (CP). Rx reconnaît les souches de PVX contenant une thréonine et une lysine en positions 121 et 127 respectivement (CP_{TK}), mais pas ceux contenant une lysine et une arginine aux mêmes positions (CP_{KR}). Basée sur une mutagenèse aléatoire du domaine extracellulaire LRR, des variants de Rx répondant également à CP_{KR} ont été générés (Farnham and Baulcombe, 2006).

La méthode d'édition génomique CRISPR-Cas9 a été adoptée à ce jour chez une vingtaine d'espèces végétales (Ricroch et al., 2017). Des utilisations en agriculture ont déjà été démontrées dans des plantes cultivées telles que le blé, le maïs, le riz ou la tomate, illustrant la rapidité avec laquelle cette technologie sort des laboratoires (Jaganathan et al., 2018; Langner et al., 2018). CRISPR-Cas9 a ainsi été utilisé chez le blé afin de fournir une résistance contre l'oïdium. Chez le maïs, l'utilisation de CRISPR-Cas9 sur le promoteur du gène *Argos8* a permis de conférer une expression constitutive du gène permettant d'améliorer le rendement du maïs en période de sécheresse (Yin et al., 2017). Ren et al. (2016) ont démontré que le système CRISPR-Cas9 est également un outil efficace et spécifique pour la modification du génome de la vigne. Cette équipe a réussi à effectuer une modification ciblée du gène de la L-idonate déshydrogénase (*IdnDH*) dans des cellules en suspension de Chardonnay et des plantules de vigne. De plus, dans une étude récente, le système CRISPR-Cas9 s 'est révélé efficace dès la première génération de vigne transformée et aucune mutation n'a été détectée dans les sites présumés hors cibles testés (Wang et al., 2018). Cette technologie a ainsi permis de réaliser dans un temps très court une édition génomique du gène *VvWRKY52* aboutissant à une résistance accrue à *B. cinerea* (Wang et al., 2018). Récemment, un nouvel outil de prédiction développé chez la souris a permis de supprimer le nombre d'éditions génomiques hors cibles *in vivo* (Akcakaya et al., 2018). Cette technique d'édition génomique est donc un outil de choix pour l'amélioration variétale de la vigne, notamment pour l'introduction de gènes de résistance.

La sélection variétale et le transfert de PRR, les récepteurs chimériques ou encore l'évolution artificielle sont des alternatives prometteuses aux méthodes classiques de lutte contre les maladies des cultures. Néanmoins, l'introduction de transgènes pose des problèmes d'acceptation sociétale particulièrement en Europe, notamment lorsqu'il s'agit de cultures comestibles.

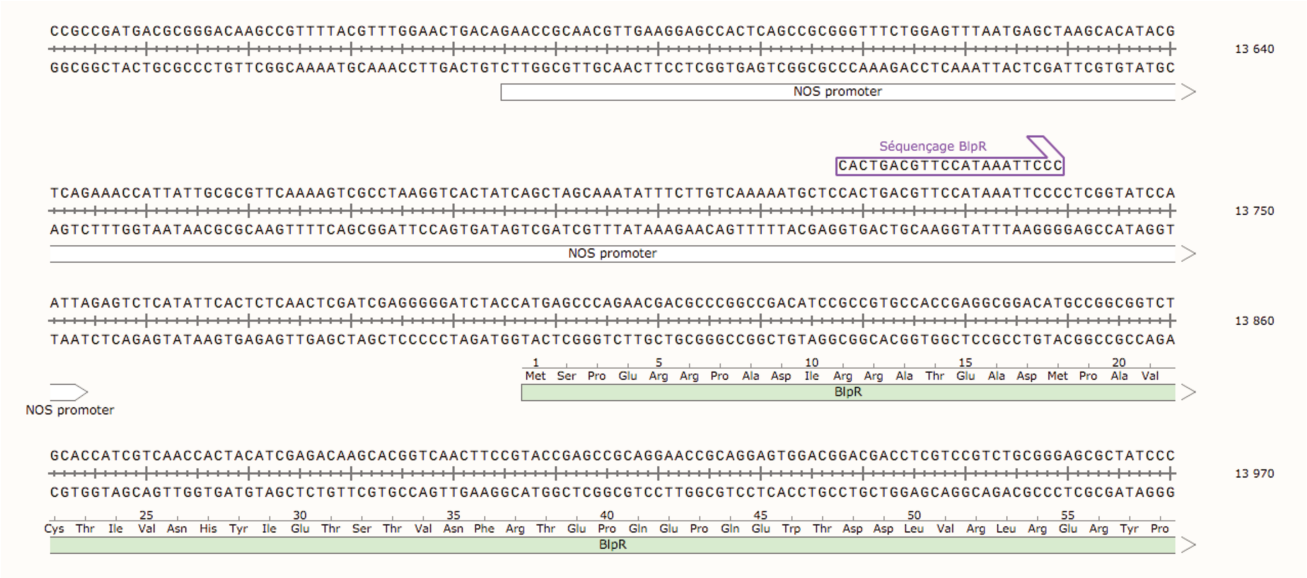


Figure 63: Design de l'amorce utilisée pour le séquençage de la cassette *BlpR* dans le plasmide natif.
L'amorce utilisée s'hybride à la séquence du promoteur NOS située en amont de la cassette *BlpR*.

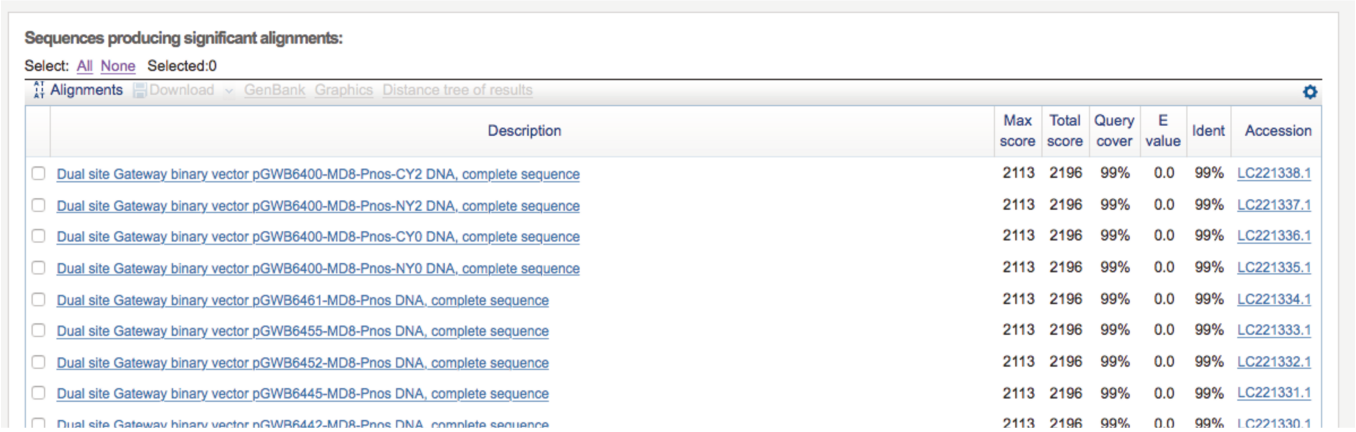


Figure 64: Alignement du résultat de séquençage avec la banque de données nucléotidiques de BLAST.
L'alignement de notre séquence avec la banque de données nucléotidiques révèle 99% d'identité avec des séquences *Pnos*, codant un gène de résistance à la kanamycine.
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

pDGE62	1sg_35SCas_nptII	pnos:nptII-tnos; 2x35S:Cas9-tnos; pAtU6-ATTG-BpiI_ccdB-Cm^R_BpiI-GTTT-sgRNA scaff.	Spec, Cm [Kan]
pDGE63	1sg_35SCas_PAT	pnos:PAT-tnos; 2x35S:Cas9-tnos; pAtU6-ATTG-BpiI_ccdB-Cm^R_BpiI-GTTT-sgRNA scaff.	Spec, Cm [BASTA]

Tableau 11: Description des vecteurs pDGE62 et pDGE63.
Le vecteur pDGE62 porte le gène *nptII* codant une néomycine phosphotransférase responsable de la résistance à la kanamycine, alors que le plasmide pDGE63 porte le gène *PAT* codant une phosphinotricine acétyltransférase, responsable de la résistance au glufosinate.
www.addgene.org

CHAPITRE VII. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ce projet de thèse se sont focalisés sur les différents aspects du phénomène de « *PAMP-triggered immunity* », de la perception de l 'éliciteur à la signalisation moléculaire, jusqu'à l'induction de résistance.

La chitine et le chitosan sont des PAMP actifs chez la vigne et induisent des évènements de signalisation précoces, l'expression de gènes de défense ainsi qu'une résistance induite contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea* et l'oomycète *P. viticola*. Nous avons mis en évidence que VvLYK1-1 et VvLYK1-2, appartenant au même clade que le récepteur AtCERK1, participent à la perception de la chitine et du chitosan. Nos résultats montrent que VvLYK1-1 et VvLYK1-2 complémentent fonctionnellement le mutant *Atcerk1*, affecté dans la perception de la chitine, en restaurant les évènements de signalisation. De plus, l'expression de *VvLYK1-1* chez *Atcerk1* restaure la résistance basale à l'agent de l'oïdium de la vigne. Il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux en recherchant des mutations naturelles dans le gène *VvLYK1-1* pouvant exister dans des espèces résistances à *E. necator* au sein des sous-genres *Euvitis* ou *Muscadinia*. L'identification de ces variants de *LYK1-1* pourrait conduire à l'identification de nouvelles sources de résistance à l'oïdium qui viendraient compléter celles des gènes *R* actuellement utilisés pour l'amélioration variétale de la vigne (Agurto et al., 2017; Feechan et al., 2013). De plus VvLYK1-1 et VvLYK1-2 participent à la perception du chitosan, une molécule aujourd'hui utilisée dans des produits SDP homologués en viticulture en association avec des OG actifs (COS-OGA ou Bastid ou Blason, van Aubel et al., 2014). La connaissance de ces 2 gènes participant à la perception du chitosan nous permettra d'étudier leur expression respective dans les différents organes et aux différents stades phénologiques de la vigne. Nous pourrons ainsi étudier précisément l'expression spatio-temporelle de *VvLYK1-1* et *VvLYK1-2* pour savoir à quel moment et à quel endroit ces récepteurs sont présents afin de mieux comprendre l'efficacité partielle des SDP utilisés au vignoble.

Ainsi, nos travaux ont permis d'identifier un nouveau couple PAMP/PRR chez la vigne, après l'identification de VvFLS2, le récepteur de flg22 de *Vitis vinifera* (Trdá et al, 2014). Néanmoins nous n'avons caractérisé que 2 des 15 gènes *VvLYK* présents dans le génome de vigne. Il serait donc intéressant de comprendre le rôle des 13 autres

récepteurs de cette famille multigénique. En particulier, il serait intéressant d'identifier des récepteurs VvLYK impliqués dans la perception d'autres ligands et/ou lors d'autres interactions entre la vigne et des organismes présents dans son environnement. En ce qui concerne l'interaction avec des microorganismes, nos résultats montrent qu'AtCERK1, VvLYK1-1 et VvLYK1-3 ne jouent pas de rôle dans la résistance contre *B. cinerea*. En revanche, l'expression des gènes *VvLYK4-1/2*, *VvLYK5-1* et *VvLYK6* est fortement augmentée lors de l'infection par *B. cinerea* sur les baies. *VvLYK5-1* et *VvLYK5-2* sont deux orthologues d'*AtLYK5*. Le mutant *Atlyk5* est plus sensible au champignon *Alternaria brassicicola* (Cao et al., 2014), il serait donc intéressant de tester la résistance basale d'*Atlyk5* en réponse à *B. cinerea* et de transformer le mutant *Atlyk5* avec les gènes *VvLYK5-1* et *VvLYK5-2* afin de vérifier s'ils peuvent restaurer une résistance. AtLYK5 est impliqué avec AtCERK1 dans la perception de la chitine chez Arabidopsis (Cao et al., 2014). Les lignées *Atlyk5*::*VvLYK5-1/2* pourront aussi être testées pour leur réponse à la chitine et au chitosan. Concernant la reconnaissance d'autres ligands, nous savons qu'AtCERK1 et OsCERK1 participent également à la reconnaissance du PGN chez Arabidopsis et le riz, respectivement (Gust, 2015). Il serait donc intéressant de tester nos lignées *Atcerk1::VVLYK1-1/2/3* pour leur réponse à cet éliciteur bactérien. Si l'expression de *VvLYK1-1*, *VvLYK1-2* ou *VvLYK1-3* ne restaure par la réponse au PGN chez *Atcerk1*, il faudra transformer ce mutant avec les autres gènes *VvLYK* afin d'identifier le(s) récepteur(s) participant à la perception du peptidoglycane chez la vigne. La connaissance de ce récepteur au PGN pourrait ensuite permettre de rechercher des variants naturels chez *Vitis* ou *Muscadinia* afin d'identifier un PRR à l'origine d'une résistance accrue aux infections bactériennes. L'arrivée récente en Europe de *Xyllela fastidiosa*, agent responsable de la maladie de Pierce chez la vigne, fait en effet craindre une épidémie dans les vignobles européens dans le siècle à venir. Il est donc important de rechercher rapidement des sources de résistance à cette bactérie afin de générer des nouveaux cépages résistants à *Xyllela fastidiosa*. L'utilisation de l'outil CRISPR-Cas9 pouvant être un outil utilisable en recherche pour valider rapidement l'efficacité de gènes candidats (Wang et al., 2018).

Chez les légumineuses, les facteurs Nod impliqués dans la symbiose fixatrice d'azote avec les rhizobiums sont des lipochitooligosaccharides (Nod-LCO) également reconnus par des récepteurs de type LysM-RLK (LYK, Choi et al., 2018). Les résultats de recherches récentes ont en effet montré que la fixation de ces Nod-LCO chez les

légumineuses (*Lotus japonicus* et *Medicago truncatula*) est réalisée par un complexe hétéromérique comprenant le récepteur LYK à kinase active LjNFR1/MtLYK3 (appelé NFR1) et le LYK à kinase inactive LjNFR5/MtNFP (appelé NFR5). Si la vigne n'est pas connue pour établir ce genre de symbiose, elle peut par contre établir des symbioses avec des champignons mycorhiziens à arbuscules *via* la reconnaissance de facteurs Myc qui sont également des lipochitooligosaccharides (Myc-LCO). Dans ce cadre, il serait intéressant de comprendre lequel des VvLYK participe à la reconnaissance des Myc-LCO chez la vigne. Dans ce but, il faudrait déjà connaitre le profil d'expression des 15 VvLYK dans les parties racinaires en contact avec les mycorhizes puis dans un deuxième temps tester la restauration des réponses aux Myc-LCO du mutant de *Mtlyk3* de Medicago transformé avec chacun des *VvLYK* candidats. L'identification de VvLYK participant à la perception de LCO-Myc permettra d'étudier finement les interactions bénéfiques établies entre la vigne et ces champignons symbiotiques afin de mieux comprendre comment se structurent les communautés microbiennes au vignoble, actuellement en cours de séquençage au sein du projet Holoviti (S. Trouvelot, communication personnelle).

Par ailleurs, nos travaux ont également consisté à étudier le mode d'action des xyloglucanes, des dérivés d'hémicellulose pariétale, chez la vigne et la plante modèle Arabidopsis. Les Xh sont capables d'induire la phosphorylation des MAPK, l'expression de gène de défense, la production de métabolites secondaires mais surtout une protection contre *B. cinerea* chez les deux espèces végétales. Nos résultats soulignent donc le caractère éliciteur des Xh. Néanmoins nous n'avons étudié que les Xh purifiés à partir de pommes. Etant donnée la diversité de composition des Xh existant dans les diverses espèces végétales, il serait intéressant de tester l'activité élicitrice de Xh provenant d'autres sources. En particulier, l'obtention de Xh de *Solanaceae* (Tabac, tomate…) serait intéressante car ils sont décrits pour contenir une part importante de motifs S impliquant de l'Arabinose (Schultink et al., 2014b), un monosaccharide qui semble jouer un rôle important pour éliciter l'immunité des plantes. Par une approche de génétique inverse, nous avons étudié le mode d'action des Xh dans la résistance induite contre la pourriture grise et mis en exergue l'implication des voies du JA, du SA, de la camalexine et de l'ET. Malheureusement, nos résultats ne nous ont pas permis d'identifier un unique récepteur impliqué dans la perception des Xh. Il est probable que l'existence de familles multigéniques de PRR conduise à une redondance fonctionnelle

qui nécessitera l'obtention de double ou triple mutants pour abolir complétement la signalisation induite par les Xh. Néanmoins, nous avons identifié de nouveaux candidats potentiels (SOBIR1, ARK1/2, WAKL3/7/14…) qui ouvrent le champ des possibles.

L'ensemble de nos résultats a permis de contribuer à la compréhension des mécanismes de reconnaissance des PAMP chez la vigne, mais également à l'identification d'une nouvelle molécule active d'origine naturelle. Les progrès dans l'identification des éliciteurs oligosaccharidiques pourront permettre de choisir les meilleures molécules actives au vignoble. La résistance aux agents pathogènes induite par ces éliciteurs est une stratégie de protection des cultures prometteuse mais dont l'utilisation est encore limitée. Très rapidement, les coûts économique et écologique de ces nouveaux traitements de biocontrôle devront être évalués pour savoir s'ils peuvent s'intégrer à des programmes de traitements en viticulture. Par conséquent, les pesticides restent utilisés pour prévenir les maladies, mais leurs effets secondaires indésirables sur la qualité de l'environnement, la santé humaine et la sélection de souches résistantes stimulent la recherche pour le développement de nouvelles stratégies dans un contexte de production agricole durable. L'identification des PRR reconnaissant ces éliciteurs pourra être utilisée comme un nouveau critère important à prendre en compte dans les programmes de sélection variétale.

A l'avenir, l'utilisation plus fréquente de produits de biocontrôle plus efficaces associée à l'obtention de cépages de vigne ayant une résistance accrue aux agents pathogènes devraient contribuer à diminuer l'utilisation d'intrants de synthèse et à promouvoir une viticulture durable et moins polluante.

AUTRES CONTRIBUTIONS

1. Article scientifique 3

Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity : pattern recognition receptors in the frontline

Lucie Trdá, Freddy Boutrot, Justine Claverie, Daphnée Brulé, Stephan Dorey, Benoit Poinssot (2015)
Frontiers in Plant Science, 6 :219

MINI REVIEW
published: 08 April 2015
doi: 10.3389/fpls.2015.00219

Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline

Lucie Trdá[1,2†], *Freddy Boutrot*[3†], *Justine Claverie*[1], *Daphnée Brulé*[1], *Stephan Dorey*[4] *and Benoit Poinssot*[1*]

[1] *Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, Pôle Interactions Plantes Micro-organismes - ERL CNRS 6300, Dijon, France,* [2] *Laboratory of Pathological Plant Physiology, Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of Czech Republic, Prague, Czech Republic,* [3] *The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, UK,* [4] *Laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, URVVC EA 4707, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France*

OPEN ACCESS

Edited by:
Brigitte Mauch-Mani, Université de Neuchâtel, Switzerland

Reviewed by:
Richard Bostock, University of California, Davis, USA
Delphine Chinchilla, University of Basel, Switzerland

***Correspondence:**
Benoit Poinssot, Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie INRA – uB – Agrosup, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France
benoit.poinssot@dijon.inra.fr

[†]*These authors have contributed equally to this work.*

Plants are continuously monitoring the presence of microorganisms to establish an adapted response. Plants commonly use pattern recognition receptors (PRRs) to perceive microbe- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs/PAMPs) which are microorganism molecular signatures. Located at the plant plasma membrane, the PRRs are generally receptor-like kinases (RLKs) or receptor-like proteins (RLPs). MAMP detection will lead to the establishment of a plant defense program called MAMP-triggered immunity (MTI). In this review, we overview the RLKs and RLPs that assure early recognition and control of pathogenic or beneficial bacteria. We also highlight the crucial function of PRRs during plant-microbe interactions, with a special emphasis on the receptors of the bacterial flagellin and peptidoglycan. In addition, we discuss the multiple strategies used by bacteria to evade PRR-mediated recognition.

Keywords: plant–microbe interactions, innate immunity, evasion, MAMP, PRR, flg22, FLS2, LysM

Cet article est disponible sur le lien suivant : https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00219

2. Article scientifique 4

Lutter contre les infections bactériennes : le système immunitaire des plantes est aussi très efficace !

Justine Claverie, Lény Teyssier, Daphnée Brulé, Marie-Claire Héloir, Jean-Louis Connat, Olivier Lamotte, Benoît Poinssot (2016)
Med Sci (Paris) 32 (4) 335-339

NOUVELLE

Lutter contre les infections bactériennes : le système immunitaire des plantes est aussi très efficace !

Justine Claverie[1*], Lény Teyssier[1,2*], Daphnée Brulé[1], Marie-Claire Héloir[1], Jean-Louis Connat[2], Olivier Lamotte[1], Benoît Poinssot[1]

[1] UMR 1347 Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France ;
[2] UMR 866 Lipides Nutrition Cancer, Inserm, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France.
* Ces auteurs ont contribué également à ce travail.
benoit.poinssot@dijon.inra.fr
olivier.lamotte@dijon.inra.fr

Cet article est disponible sur le lien suivant : https://doi.org/10.1051/medsci/20163204008

ACTIVITÉS SCIENTIFIQUES

Publications

1. **Claverie J.**, Balacey S., Lemaître-Guillier C., Brulé D., Granet L., Noirot E., Daire X., Héloir MC., Darblade B. & Poinssot B. (2018). The cell wall-derived xyloglucan is a new DAMP triggering plant immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2018.01725

2. Brulé D., Villano C., Davies L.J., Trdá L., **Claverie J.,** Héloir M.-C., Chiltz A., Adrian M., Darblade B., Tornero P., Stransfeld L., Boutrot F., Zipfel C., Dry IB., Poinssot B. (2018). The grapevine (Vitis vinifera) LysM receptor kinases VvLYK1-1 and VvLYK1-2 mediate chitooligosaccharide-triggered immunity. *Plant Biotechnol. J.* doi: 10.1111/pbi.13017

3. Trdà L., Boutrot F., **Claverie J**., Brulé D., Dorey S. & Poinssot B. (2015). Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Front. Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00219

4. **Claverie J.**, Teyssier L., Brulé D., Héloir MC., Connat JL., Lamotte O. & Poinssot B. (2016). Lutter contre les infections bactériennes : le système immunitaire des plantes est aussi très efficace ! *Med Sci (Paris),* 32 4 (2016) 335-339
doi: https://doi.org/10.1051/medsci/20163204008

Communications affichées

1. « Are the xyloglucans new elicitors of A. thaliana immunity ? »
Claverie J, Brulé D, Darblade B, Daire X & Poinssot B.
Natural Products and biocontrol, 2016, Perpignan

2. « The xyloglucans : are they new elicitors of plant immunity ?
Claverie J, Brulé D, Darblade B, Daire X & Poinssot B.
Journée des Doctorants de l'INRA, 2017, Dijon

3. « The xyloglucans : are they new elicitors of plant immunity ? »
Claverie J, Brulé D, Darblade B, Daire X & Poinssot B.
Forum des Jeunes Chercheurs, 2017, Besançon

Communications orales

1. Are the xyloglucans new elicitors of Arabidopsis thaliana immunity?
IPM3.0, 2017, Riva del Garda, Italie

2. Are the xyloglucans new elicitors of Arabidopsis thaliana immunity?
Natural Products and biocontrol, 2016, Perpignan (invitation)

3. Etude des éliciteurs : du laboratoire au vignoble.
Journée Recherche Vigne et Vin en Bourgogne, 2016, Beaune

Enseignements

64h Biochimie Biologie moléculaire (TP Licence 1 sur les acides aminés) et Biologie moléculaire et Enzymologie (TP Licence 3 sur la purification d'une catalase et suivi de son activité)

Formations

- Piloter et manager son projet de thèse
- Technique de recherche d'emploi et structurer son réseau
- Bioinformatique
- Analyse statistiques des données
- Organisation forum Jeunes chercheurs
- CRISPR-Cas9
- Publish or perish
- Préparation au TOEFL
- Piloter son évolution professionnelle avec la méthode Potentialis

Co-encadrements d'étudiants

- Antoine Sportès (Master 1) : Recherche de récepteurs aux éliciteurs saccharidiques chez *Arabidopsis thaliana*.
- 3 étudiants en licence : Stage découverte

ANNEXES

Composition pour un litre de milieux de culture Nitsch-Nitsch, Murashige and Skoog (MS), Lysogeny Broth (LB), Super Optimal Broth with Catabolite repression (SOC) et Yeast Extract YEP.

Annexe 1. Nitsch-Nitsch

Macroéléments	
$CaCl_2$, 2 H_2O	166 mg
KH_2PO_4	68 mg
KNO_3	950 mg
$MgSO_4$, 7 H_2O	185 mg
NH_4NO_3	720 mg

Microéléments	
$CoCl_2$, 6 H_2O	0,025 mg
$CuSO_4$, 5 H_2O	0,025 mg
H_3BO_3	10 mg
KI	0,83 mg
$MnSO_4$, 2 H_2O	19,5 mg
Na_2MoO_4, 2 H_2O	0,25 mg
$ZnSO_4$, 7 H_2O	10 mg

Fe-EDTA	
$FeSO_4$, 7 H_2O	27,85 mg
Na_2-EDTA	37,25 mg

Vitamines	
Acide folique	0,5 mg
Acide nicotinique	5 mg
Biotine	0,05 mg
Glycine	2 mg
Myo-inositol	100 mg
Panthénoate de calcium	3 mg
Pyridoxine HCl	0,5 mg
Thiamine HCl	0,5 mg

Annexe 2. Murashige and Skoog

Macroéléments	
$CaCl_2$	332,02 mg
KH_2PO_4	170 mg

KNO_3	1900 mg
$MgSO_4$	180,54 mg
NH_4NO_3	1650 mg

Microéléments

$CoCl_2$, 6 H_2O	0,025 mg
$CuSO_4$, 5 H_2O	0,025 mg
H_3BO_3	6,20 mg
KI	0,83 mg
$MnSO_4$, 1 H_2O	16,9 mg
Na_2MoO_4, 2 H_2O	0,25 mg
$ZnSO_4$, 7 H_2O	8,60 mg

Fe-EDTA

FeNa-EDTA	36,7 mg

Annexe 3. Luria-Bertani

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Gélose	15 g

Annexe 4. Super Optimal Broth with Catabolite repression

Tryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
MgCl	0,95 g
$MgSO_4$	1,20 g
Glucose	3,60 g

Annexe 5. Yeast Extract YEP

Extrait de levure	10 g
Bacto Peptone	10 g
NaCl	5 g

pH 7,0

RÉFÉRENCES

Abouraïcha, E.F., El Alaoui-Talibi, Z., Tadlaoui-Ouafi, A., El Boutachfaiti, R., Petit, E., Douira, A., Courtois, B., Courtois, J., and El Modafar, C. (2017). Glucuronan and oligoglucuronans isolated from green algae activate natural defense responses in apple fruit and reduce postharvest blue and gray mold decay. J. Appl. Phycol. *29*, 471–480.

Abreu, G.F. de, Talamini, V., and Stadnik, M.J. (2008). Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. Summa Phytopathol. *34*, 78–82.

Ádám, A.L., Nagy, Z.Á., Kátay, G., Mergenthaler, E., and Viczián, O. (2018). Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. Int. J. Mol. Sci. *19*, 1146.

Agrios (2005). Plant Pathology (Elsevier).

Agurto, M., Schlechter, R.O., Armijo, G., Solano, E., Serrano, C., Contreras, R.A., Zúñiga, G.E., and Arce-Johnson, P. (2017). RUN1 and REN1 Pyramiding in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Crimson Seedless) Displays an improved defense response leading to enhanced resistance to powdery mildew (*Erysiphe necator*). Front. Plant Sci. *8*, 758.

Ahn, I.-P., Lee, S.-W., and Suh, S.-C. (2007). Rhizobacteria-induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *20*, 759–768.

Akamatsu, A., Wong, H.L., Fujiwara, M., Okuda, J., Nishide, K., Uno, K., Imai, K., Umemura, K., Kawasaki, T., Kawano, Y., et al. (2013). An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity. Cell Host Microbe *13*, 465–476.

Akcakaya, P., Bobbin, M.L., Guo, J.A., Malagon-Lopez, J., Clement, K., Garcia, S.P., Fellows, M.D., Porritt, M.J., Firth, M.A., Carreras, A., et al. (2018). In vivo CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. Nature *561*, 416–419.

Akimoto C., Aoyagi H., Dicosmo F., Tanaka H. (2000). Synergistic effect of active oxygen species and alginate on chitinase production by *wasabia japonica* cells and its application. J Biosci. Bioeng. 89, 131–137. 10.1016/S1389-1723(00)88726-5

Ali, A., Zahid, N., Manickam, S., Siddiqui, Y., Alderson, P.G., and Maqbool, M. (2014). Induction of lignin and pathogenesis related proteins in dragon fruit plants in response to submicron chitosan dispersions. Crop Prot. *63*, 83–88.

Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J.R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. Science *284*, 2148–2152.

Alonso-Villaverde, V., Voinesco, F., Viret, O., Spring, J.-L., and Gindro, K. (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae*: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. Plant Physiol. Biochem. PPB *49*, 265–274.

Amborabe B. E., Bonmort J., Fleurat-Lessard P., Roblin G. (2008). Early events induced by chitosan on plant cells. J. Exp. Bot. 59, 2317–2324.

An Q. D., Zhang G. L., Wu H. T., Zhang Z. C., Zheng G. S., Luan L., et al. . (2009). Alginate-deriving oligosaccharide production by alginase from newly isolated *flavobacterium sp*. Lxa and its potential application in protection against pathogens. J. Appl. Microbiol. 106, 161–170. 10.1111/j.1365-2672.2008.03988.x

Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., and Van Loon, L.C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol. *47*, 79–87.

Ao, Y., Li, Z., Feng, D., Xiong, F., Liu, J., Li, J.-F., Wang, M., Wang, J., Liu, B., and Wang, H.-B. (2014). OsCERK1 and OsRLCK176 play important roles in peptidoglycan and chitin signaling in rice innate immunity. Plant J. *80*, 1072–1084.

Araujo, L., and Stadnik, M.J. (2013). Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases - doi: 10.4025/actasciagron.v35i3.16174. Acta Sci. Agron. *35*.

Asai, S., and Shirasu, K. (2015). Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. Curr. Opin. Plant Biol. *28*, 1–8.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature *415*, 977–983.

Asano, T., Tanaka, N., Yang, G., Hayashi, N., and Komatsu, S. (2005). Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. Plant Cell Physiol. *46*, 356–366.

van Aubel, G., Buonatesta, R., and Van Cutsem, P. (2014). COS-OGA: A novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. Crop Prot. *65*, 129–137.

Ayers, A.R., Ebel, J., Valent, B., and Albersheim, P. (1976). Host-pathogen interactions: X. fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. sojae. Plant Physiol. *57*, 760–765.

Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M., and Pugin, A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *16*, 1118–1128.

Aziz, A., Heyraud, A., and Lambert, B. (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. Planta *218*, 767–774.

Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., and Vernet, G. (2006). Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. Phytopathology *96*, 1188–1194.

Aziz, A., Gauthier, A., Bezier, A., Poinssot, B., Joubert, J.-M., Pugin, A., Heyraud, A., and Baillieul, F. (2007). Elicitor and resistance-inducing activities of -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with -1,3 glucans and -1,4 oligogalacturonides. J. Exp. Bot. *58*, 1463–1472.

Balagué, C., Gouget, A., Bouchez, O., Souriac, C., Haget, N., Boutet-Mercey, S., Govers, F., Roby, D., and Canut, H. (2017). The *Arabidopsis thaliana* lectin receptor kinase LecRK-I.9 is required for full resistance to *Pseudomonas syringae* and affects jasmonate signalling. Mol. Plant Pathol. *18*, 937–948.

Barber, M.S., Bertram, R.E., and Ride, J.P. (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. Physiol. Mol. Plant Pathol. *34*, 3–12.

Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol. Biol. *69*, 473–488.

Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A.-F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R., and Di Gaspero, G. (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine "Bianca" is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet. *120*, 163–176.

Berrocal-Lobo, M., and Molina, A. (2004). Ethylene response factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *17*, 763–770.

Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca2+ signaling. Mol. Plant *1*, 218–228.

Bi, G., Liebrand, T.W.H., Bye, R.R., Postma, J., van der Burgh, A.M., Robatzek, S., Xu, X., and Joosten, M.H.A.J. (2016). SOBIR1 requires the GxxxG dimerization motif in its transmembrane domain to form constitutive complexes with receptor-like proteins. Mol. Plant Pathol. *17*, 96–107.

Binet, M.N., Humbert, C., Lecourieux, D., Vantard, M., and Pugin, A. (2001). Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. Plant Physiol. *125*, 564–572.

Bleecker, A.B., and Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *16*, 1–18.

Bohman, S., Staal, J., Thomma, B.P.H.J., Wang, M., and Dixelius, C. (2004). Characterisation of an Arabidopsis-*Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. Plant J. Cell Mol. Biol. *37*, 9–20.

Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu. Rev. Plant Biol. *60*, 379–406.

Borsato, L.C., Di Piero, R.M., and Stadnik, M.J. (2010). Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. Trop. Plant Pathol. *35*, 318–322.

Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., and Glawischnig, E. (2009). The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell *21*, 1830–1845.

Bouarab K., Potin P., Correa J., Kloareg B. (1999). Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. Plant Cell 11, 1635–1650. 10.1105/tpc.11.9.1635

Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., and Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via $Ca^{(2+)}$ sensor protein kinases. Nature *464*, 418–422.

Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Rayapuram, C., Idänheimo, N., Hunter, K., Kimura, S., Merilo, E., et al. (2015). Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress. PLOS Genet. *11*, e1005373.

Bourque, S., Ponchet, M., Binet, M.N., Ricci, P., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (1998). Comparison of binding properties and early biological effects of elicitins in tobacco cells. Plant Physiol. *118*, 1317–1326.

Bourque, S., Lemoine, R., Sequeira-Legrand, A., Fayolle, L., Delrot, S., and Pugin, A. (2002). The elicitor cryptogein blocks glucose transport in tobacco cells. Plant Physiol. *130*, 2177–2187.

Boutegrabet, L., Fekete, A., Hertkorn, N., Papastamoulis, Y., Waffo-Téguo, P., Mérillon, J.M., Jeandet, P., Gougeon, R.D., and Schmitt-Kopplin, P. (2011). Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography. Anal. Bioanal. Chem. *401*, 1513–1521.

Boutrot, F., and Zipfel, C. (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol. *55*, 257–286.

Bouwmeester, K., and Govers, F. (2009). Arabidopsis L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles. J. Exp. Bot. *60*, 4383–4396.

Bozsoki, Z., Cheng, J., Feng, F., Gysel, K., Vinther, M., Andersen, K.R., Oldroyd, G., Blaise, M., Radutoiu, S., and Stougaard, J. (2017). Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception. Proc. Natl. Acad. Sci. *114*, E8118–E8127.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. *72*, 248–254.

Breen, S., Williams, S.J., Outram, M., Kobe, B., and Solomon, P.S. (2017). Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. Trends Plant Sci. *22*, 871–879.

Bricchi, I., Occhipinti, A., Bertea, C.M., Zebelo, S.A., Brillada, C., Verrillo, F., De Castro, C., Molinaro, A., Faulkner, C., Maule, A.J., et al. (2013). Separation of early and late responses to herbivory in Arabidopsis by changing plasmodesmal function: *Plasmodesmata involvement in response to herbivory*. Plant J. *73*, 14–25.

Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. Annu. Rev. Plant Biol. *60*, 183–205.

Brulé, D., Villano, C., Davies, L.J., Trdá, L., Claverie, J., Héloir, M.-C., Chiltz, A., Adrian, M., Darblade, B., Tornero, P., et al. (2018). The grapevine (*Vitis vinifera*) LysM receptor kinases VvLYK1-1 and VvLYK1-2 mediate chitooligosaccharide-triggered immunity. Plant Biotechnol. J. doi: 10.1111/pbi.13017.

Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 9452–9457.

Bueter, C.L., Specht, C.A., and Levitz, S.M. (2013). Innate sensing of chitin and chitosan. PLoS Pathog. *9*, e1003080.

Burra, D.D., Mühlenbock, P., and Andreasson, E. (2015). Salicylic and jasmonic acid pathways are necessary for defence against Dickeya solani as revealed by a novel method for Blackleg disease screening of in vitro grown potato. Plant Biol. Stuttg. Ger. *17*, 1030–1038.

Cabrera J. C., Boland A., Cambier P., Frettinger P., Van Cutsem P. (2010). Chitosan oligosaccharides modulate the supramolecular conformation and the biological activity of oligogalacturonides in Arabidopsis. Glycobiology 20, 775–786.

Cabrera J. C., Messiaen J., Cambier P., Van Cutsem P. (2006). Size, acetylation and concentration of chitooligosaccharide elicitors determine the switch from defense involving *PAL* activation to cell death and water peroxide production in Arabidopsis cell suspensions. Physiol. Plant 127, 44–56

Cai, R., Lewis, J., Yan, S., Liu, H., Clarke, C.R., Campanile, F., Almeida, N.F., Studholme, D.J., Lindeberg, M., Schneider, D., et al. (2011). The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. PLoS Pathog. *7*, e1002130.

Caillot, S., Rat, S., Tavernier, M.-L., Michaud, P., Kovensky, J., Wadouachi, A., Clément, C., Baillieul, F., and Petit, E. (2012). Native and sulfated oligoglucuronans as elicitors of defence-related responses inducing protection against *Botrytis cinerea* of *Vitis vinifera*. Carbohydr. Polym. *87*, 1728–1736.

Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X. (1997). The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell *88*, 57–63.

Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A., and Stacey, G. (2014). The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. ELife *3*.

Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., and Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. J. Biol. Chem. *275*, 36734–36740.

Chandía N. P., Matsuhiro B., Mejías E., Moenne A. (2004). Alginic acids in *Lessonia vadosa*: partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. J. Appl. Phycol. 16, 127–133 10.1023/B:JAPH.0000044778.44193.a8

Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., and Chatterjee, B.P. (2005). Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. Process Biochem. *40*, 395–400.

Cheong, J.J., and Hahn, M.G. (1991). A specific, high-affinity binding site for the hepta-beta-glucoside elicitor exists in soybean membranes. Plant Cell *3*, 137–147.

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. Plant Cell *18*, 465–476.

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature *448*, 497–500.

Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. Nature *448*, 666–671.

Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., Lee, S.Y., and Stacey, G. (2014). Identification of a plant receptor for extracellular ATP. Science *343*, 290–294.

Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Sci. *177*, 143–155.

Choudhary, D.K., Prakash, A., and Johri, B.N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. Indian J. Microbiol. *47*, 289–297.

Claverie, J., Teyssier, L., Brulé, D., Héloir, M.-C., Connat, J.-L., Lamotte, O., and Poinssot, B. (2016). Lutter contre les infections bactériennes : le système immunitaire des plantes est aussi très efficace ! Médecine/Sciences *32*, 335–339.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana:* Floral dip transformation of Arabidopsis. Plant J. *16*, 735–743.

Cluzet S., Torregrosa C., Jacquet C., Lafitte C., Fournier J., Mercier L., et al. (2004). Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *ulva spp*. Plant Cell Environ. 27, 917–928 10.1111/j.1365-3040.2004.01197.x

Cordelier, S., de Ruffray, P., Fritig, B., and Kauffmann, S. (2003). Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitin. Plant Mol. Biol. *51*, 109–118.

Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., and Boulay, M. (2001). In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible *PR 10* promoter. J. Exp. Bot. *52*, 901–910.

Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J.E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. Annu. Rev. Plant Biol. *66*, 487–511.

Czechowski, T. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. PLANT Physiol. *139*, 5–17.

Dave, A., and Graham, I.A. (2012). Oxylipin signaling: A distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). Front. Plant Sci. *3*, 42.

Davidsson, P., Broberg, M., Kariola, T., Sipari, N., Pirhonen, M., and Palva, E.T. (2017). Short oligogalacturonides induce pathogen resistance-associated gene expression in *Arabidopsis thaliana.* BMC Plant Biol. *17,* 19.

De Vleesschauwer, D., Xu, J., and Höfte, M. (2014). Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to Arabidopsis. Front. Plant Sci. *5*, 611.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., et al. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science *266*, 1247–1250.

Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., and Cordelier, S. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. Environ. Sci. Pollut. Res. *21*, 4837–4846.

Delgado, D.Z., de Freitas, M.B., and Stadnik, M.J. (2013). Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). Crop Prot. *47*, 67–73.

Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. Mol. Plant *1*, 423–445.

Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P.R. (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor *TGA1*. Plant Cell *15*, 2181–2191.

Doares S. H., Syrovets T., Weiler E. W., Ryan C. A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 4095–4098.

Dobón, A., Wulff, B.B.H., Canet, J.V., Fort, P., and Tornero, P. (2013). An allele of Arabidopsis *COI1* with hypo- and hypermorphic phenotypes in plant growth, defence and fertility. PloS One *8*, e55115.

Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. Annu. Rev. Plant Biol. *61*, 593–620.

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. Curr. Opin. Plant Biol. *7*, 547–552.

Droillard, M.-J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C. (2004). Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana* : activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. FEBS Lett. *574*, 42–48.

Dubreuil-Maurizi, C., Trouvelot, S., Frettinger, P., Pugin, A., Wendehenne, D., and Poinssot, B. (2010). β-aminobutyric acid primes an NADPH oxidase–dependent reactive oxygen species production during grapevine-triggered immunity. Mol. Plant. Microbe Interact. *23*, 1012–1021.

Dubreuil-Maurizi, C., Vitecek, J., Marty, L., Branciard, L., Frettinger, P., Wendehenne, D., Meyer, A.J., Mauch, F., and Poinssot, B. (2011). Glutathione deficiency of the Arabidopsis mutant *pad2-1* affects oxidative stress-related events, defense gene expression, and the hypersensitive response. Plant Physiol. *157*, 2000–2012.

Edwards, M., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V., and Reid, J.S.G. (1985). Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus L*. seeds following germination. Planta *163*, 133–140.

El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F. (2010). Chitosan in plant protection. Mar. Drugs 8, 968–987.

Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S.C., and Voigt, C.A. (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. Plant Physiol. *161*, 1433–1444.

Elmer, P.A.G., and Michailides, T.J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Orchard and Vine Crops. In Botrytis: Biology, Pathology and Control, Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 243–272.

El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfaiti, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., El Alaoui-Talibi, Z., Courtois, B., and Courtois, J. (2012). Induction of natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. Sci. Hortic. *138*, 55–63.

Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H. (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. Plant Physiol. *109*, 813–820.

Falk, S. (1996). *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. Phytopathology *86*, 1010.

Farnham, G., and Baulcombe, D.C. (2006). Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 18828–18833.

Faulkner, C., Petutschnig, E., Benitez-Alfonso, Y., Beck, M., Robatzek, S., Lipka, V., and Maule, A.J. (2013). LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 9166–9170.

Feechan, A., Anderson, C., Torregrosa, L., Jermakow, A., Mestre, P., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Walker, A.R., Cadle-Davidson, L., Reisch, B., et al. (2013). Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. Plant J. *76*, 661–674.

Felix, G., Baureithel, K., and Boller, T. (1998). Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. Plant Physiol. *117*, 643–650.

Felix, G., Regenass, M., and Boller, T. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. Plant J. *4*, 307–316.

Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone and Lorenzo GD. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. Front. Plant Sci. *4*, 49.

Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., and 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 J. Cell Mol. Biol. *35*, 193–205.

Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* Induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires *PHYTOALEXIN DEFICIENT 3*. Plant Physiol. *144*, 367–379.

de Freitas, M.B., and Stadnik, M.J. (2012). Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. *78*, 8–13.

Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.-P., Kato, Y., Lorences, E.P., Maclachlan, G.A., McNeil, M., et al. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. Physiol. Plant. *89*, 1–3.

Fu, Y., Yin, H., Wang, W., Wang, M., Zhang, H., Zhao, X., and Du, Y. (2011). β-1,3-Glucan with different degree of polymerization induced different defense responses in tobacco. Carbohydr. Polym. *86*, 774–782.

Fuchs, K., Cardona Gloria, Y., Wolz, O., Herster, F., Sharma, L., Dillen, C.A., Täumer, C., Dickhöfer, S., Bittner, Z., Dang, T., et al. (2018). The fungal ligand chitin directly binds TLR2 and triggers inflammation dependent on oligomer size. EMBO Rep. e201846065.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science *261*, 754–756.

Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., De Lorenzo, G., and Ferrari, S. (2008). The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. *148*, 1695–1706.

Galletti, R., Ferrari, S., and De Lorenzo, G. (2011). Arabidopsis MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. *157*, 804–814.

Gamm, M. (2011) Impact de *Plasmopara viticola* sur le métabolisme de l'amidon et le fonctionnement stomatique chez la vigne (Thèse)

Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., and Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. Plant J. Cell Mol. Biol. *89*, 502–509.

Gao, M., Wang, X., Wang, D., Xu, F., Ding, X., Zhang, Z., Bi, D., Cheng, Y.T., Chen, S., Li, X., et al. (2009). Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. Cell Host Microbe *6*, 34–44.

García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., and Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. Trends Microbiol. *3*, 72–74.

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *19*, 711–724.

Garcion, C., and Métraux, J.-P. (2007). Salicylic Acid. In Annual Plant Reviews Volume 24: Plant Hormone Signaling, P. Hedden, and S.G. Thomas, eds. (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), pp. 229–255.

Gauthier, A. Comparaison de différents éliciteurs des réactions de défense de la vigne : étude du mode d'action de la laminarine sulfatée, un inducteur de résistance à P. viticola**,** 2009 (Thèse)

Gauthier, A., Lamotte, O., Reboutier, D., Bouteau, F., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2007). Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. Plant Signal. Behav. *2*, 86–95.

Gauthier, A., Trouvelot, S., Kelloniemi, J., Frettinger, P., Wendehenne, D., Daire, X., Joubert, J.-M., Ferrarini, A., Delledonne, M., Flors, V., et al. (2014). The sulfated laminarin triggers a stress transcriptome before priming the SA- and ROS-dependent defenses during grapevine's induced resistance against *Plasmopara viticola*. PloS One *9*, e88145.

Gessler, C., Pertot, I., and Perazzolli, M. (2011). Plasmopara viticola : a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. Phytopathologia Mediterranea. 50 (1), 3-44.

Geu-Flores, F., Møldrup, M.E., Böttcher, C., Olsen, C.E., Scheel, D., and Halkier, B.A. (2011). Cytosolic γ-glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in Arabidopsis. Plant Cell *23*, 2456–2469.

Ghannam A., Jacques A., De Ruffray P., Baillieul F., Kauffmann S. (2005). Identification of tobacco ESTs with a hypersensitive response (HR)-specific pattern of expression and likely involved in the induction of the HR and/or localized acquired resistance (LAR). Plant Physiol. Biochem. 43, 249–259.

Gimenez-Ibanez, S., Ntoukakis, V., and Rathjen, J.P. (2009a). The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in Arabidopsis. Plant Signal. Behav. *4*, 539–541.

Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., and Rathjen, J.P. (2009b). AvrPtoB targets the lysm receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. Curr. Biol. *19*, 423–429.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. *43*, 205–227.

Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., and Ausubel, F.M. (1997). Phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. Genetics *146*, 381–392.

Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. Mol. Cell *5*, 1003–1011.

Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. Cell Mol. Biol. *18*, 277–284.

Gong, B.-Q., Xue, J., Zhang, N., Xu, L., Yao, X., Yang, Q.-J., Yu, Y., Wang, H.-B., Zhang, D., and Li, J.-F. (2017). Rice chitin receptor OsCEBiP is not a transmembrane protein but targets the plasma membrane via a GPI anchor. Mol. Plant *10*, 767–770.

González-Pérez, L., Perrotta, L., Acosta, A., Orellana, E., Spadafora, N., Bruno, L., Bitonti, B.M., Albani, D., Cabrera, J.C., Francis, D., et al. (2014). In tobacco BY-2 cells xyloglucan oligosaccharides alter the expression of genes involved in cell wall metabolism, signalling, stress responses, cell division and transcriptional control. Mol. Biol. Rep. *41*, 6803–6816.

Green, T.R., and Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. Science *175*, 776–777.

Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cell. Microbiol. *6*, 201–211.

Gubaeva, E., Gubaev, A., Melcher, R.L.J., Cord-Landwehr, S., Singh, R., El Gueddari, N.E., and Moerschbacher, B.M. (2018). 'Slipped Sandwich' model for chitin and chitosan perception in *Arabidopsis*. Mol. Plant. Microbe Interact. *31*, 1145–1153.

Guerreiro, A., Figueiredo, J., Sousa Silva, M., and Figueiredo, A. (2016). Linking jasmonic acid to grapevine resistance against the biotrophic oomycete *Plasmopara viticola*. Front. Plant Sci. *7*, 565.

Guo, M., Chen, K., and Zhang, P. (2012). Transcriptome profile analysis of resistance induced by burdock fructooligosaccharide in tobacco. J. Plant Physiol. *169*, 1511–1519.

Guo, W., Wang, C., Zuo, Z., and Qiu, J.-L. (2014). The roles of anion channels in *Arabidopsis* immunity. Plant Signal. Behav. *9*, e29230.

Gust, A.A. (2015). Peptidoglycan perception in plants. PLOS Pathog. *11*, e1005275.

Gust, A.A., and Felix, G. (2014). Receptor like proteins associate with SOBIR1-type of adaptors to form bimolecular receptor kinases. Curr. Opin. Plant Biol. *21*, 104–111.

Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M., and Nürnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. Trends Plant Sci. *17*, 495–502.

Hadwiger, L.A. (2013). Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype. Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol. *208*, 42–49.

Hahn, F., Eisenhut, M., Mantegazza, O., and Weber, A. (2017). generation of targeted knockout mutants in *Arabidopsis thaliana* using CRISPR-Cas9. BIO-Protoc. *7*.

Hahn, M.G., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1981). Host-pathogen interactions : XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. Plant Physiol. *68*, 1161–1169.

Hamel, L.-P., and Beaudoin, N. (2010). Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. Planta *232*, 787–806.

Hann, D.R., and Rathjen, J.P. (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. Plant J. Cell Mol. Biol. *49*, 607–618.

Harmon, A.C., Gribskov, M., and Harper, J.F. (2000). CDPKs - a kinase for every Ca2+ signal? Trends Plant Sci. *5*, 154–159.

Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., Arima, S., Squeglia, F., Ruggiero, A., Tokuyasu, K., et al. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, E404–E413.

He, Z.H., Cheeseman, I., He, D., and Kohorn, B.D. (1999). A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. Plant Mol. Biol. *39*, 1189–1196.

Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 12217–12222.

Higaki, T., Goh, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Kadota, Y., Hasezawa, S., Sano, T., and Kuchitsu, K. (2007). Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: in vivo imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. Plant Cell Physiol. *48*, 1414–1425.

Holton, N., Nekrasov, V., Ronald, P.C., and Zipfel, C. (2015). The Phylogenetically-Related Pattern Recognition Receptors EFR and XA21 Recruit Similar Immune Signaling Components in Monocots and Dicots. PLOS Pathog. *11*, e1004602.

Hrmova, M., Farkas, V., Lahnstein, J., and Fincher, G.B. (2007). A Barley xyloglucan xyloglucosyl transferase covalently links xyloglucan, cellulosic substrates, and (1,3;1,4)-beta-D-glucans. J. Biol. Chem. *282*, 12951–12962.

Hurtado-Gaitán, E., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Samper-Herrero, A., and Bru-Martínez, R. (2017). A focused multiple reaction monitoring (MRM) quantitative method for bioactive grapevine stilbenes by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple-quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ). Molecules *22*, 418.

Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K., and Shirasu, K. (2006). MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. J. Biol. Chem. *281*, 36969–36976.

Idänheimo, N., Gauthier, A., Salojärvi, J., Siligato, R., Brosché, M., Kollist, H., Mähönen, A.P., Kangasjärvi, J., and Wrzaczek, M. (2014). The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinases CRK6 and CRK7 protect against apoplastic oxidative stress. Biochem. Biophys. Res. Commun. *445*, 457–462.

Iizasa, E., Mitsutomi, M., and Nagano, Y. (2010). Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin in vitro. J. Biol. Chem. *285*, 2996–3004.

Inui, H., Yamaguchi, Y., and Hirano, S. (1997). Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. Biosci. Biotechnol. Biochem. *61*, 975–978.

Iriti M., Faoro F. (2009). Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. Plant Signal. Behav. 4, 66–68.

Iriti, M., Sironi, M., Gomarasca, S., Casazza, A.P., Soave, C., and Faoro, F. (2006). Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. Plant Physiol. Biochem. PPB *44*, 893–900.

Jacobs, A.K. (2003). An Arabidopsis callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. Plant cell online *15*, 2503–2513.

Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S., and Venkataraman, G. (2018). CRISPR for crop improvement: An update review. Front. Plant Sci. *9*, 985.

Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M.-T., and Dumas, B. (2010). Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. J. Biomed. Biotechnol. *2010*, 1–11.

Jaulneau, V., Lafitte, C., Corio-Costet, M.-F., Stadnik, M.J., Salamagne, S., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M.-T., and Dumas, B. (2011). An *Ulva armoricana* extract protects plants against three powdery mildew pathogens. Eur. J. Plant Pathol. *131*, 393–401.

Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. J. Agric. Food Chem. *50*, 2731–2741.

Jeandroz, S., Lamotte, O., Astier, J., Rasul, S., Trapet, P., Besson-Bard, A., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Ma, W., Berkowitz, G.A., et al. (2013). There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca^{2+} signaling. Plant Physiol. *163*, 459–470.

Johnson, R., and Ryan, C.A. (1990). Wound-inducible potato inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. Plant Mol. Biol. *14*, 527–536.

Jones, D.A., and Takemoto, D. (2004). Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. Curr. Opin. Immunol. *16*, 48–62.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature *444*, 323–329.

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

Kamoun, S., Klucher, K.M., Coffey, M.D., and Tyler, B.M. (1993). A gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *6*, 573–581.

Kano, A., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Satoh, M., Fukumoto, T., Ohtani, K., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ishida, Y., et al. (2010). A rare sugar, d-allose, confers resistance to rice bacterial blight with upregulation of defense-related genes in *Oryza sativa*. Phytopathology *100*, 85–90.

Kano, A., Hosotani, K., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Shirakawa, C., Fukumoto, T., Ohtani, K., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., et al. (2011). D-psicose induces upregulation of defense-related genes and resistance in rice against bacterial blight. J. Plant Physiol. *168*, 1852–1857.

Kawano, Y., and Shimamoto, K. (2013). Early signaling network in rice PRR-mediated and R-mediated immunity. Curr. Opin. Plant Biol. *16*, 496–504.

Kawasaki, T., Yamada, K., Yoshimura, S., and Yamaguchi, K. (2017). Chitin receptor-mediated activation of MAP kinases and ROS production in rice and Arabidopsis. Plant Signal. Behav. *12*, e1361076.

Keen, N.T., Ersek, T., Long, M., Bruegger, B., and Holliday, M. (1981). Inhibition of the hypersensitive reaction of soybean leaves to incompatible *Pseudomonas spp*. by blasticidin S, streptomycin or elevated temperature. Physiol. Plant Pathol. *18*, 325–337.

Keller, H., Blein, J.P., Bonnet, P., and Ricci, P. (1996). Physiological and molecular characteristics of elicitin-induced systemic acquired resistance in tobacco. Plant Physiol. *110*, 365–376.

Kiefer, L.L., York, W.S., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (1990). Structural characterization of an arabinose-containing heptadecasaccharide enzymically isolated from sycamore extracellular xyloglucan. Carbohydr. Res. *197*, 139–158.

Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim, Y.C., Ryu, C.-M., Yang, K.Y., Chung, G.C., and Cho, B.H. (2008). Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by pseudomonas chlororaphis O6 root colonization. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *21*, 1643–1653.

Kishi-Kaboshi, M., Okada, K., Kurimoto, L., Murakami, S., Umezawa, T., Shibuya, N., Yamane, H., Miyao, A., Takatsuji, H., Takahashi, A., et al. (2010). A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis: Rice MAPK regulates antimicrobial biosynthesis. Plant J. *63*, 599–612.

Kishimoto, K., Kouzai, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., and Nishizawa, Y. (2010). Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice: Enhancement of MAMP signaling improves resistance. Plant J. *64*, 343–354.

Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.-C., Kloareg, B., and Fritig, B. (2003). Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. Mol. Plant. Microbe Interact. *16*, 115–122.

Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J.C., Kopp, M., Kloareg, B., and Fritig, B. (2000). Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. Plant Physiol. *124*, 1027–1038.

Kobayashi A., Tai A., Kanzaki H., Kawazu K. (1993). Elicitor-active oligosaccharides from algal laminaran stimulate the production of antifungal compounds in alfalfa. Z. Naturforsch 48C, 575–579.

Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr. Opin. Struct. Biol. *11*, 725–732.

Kohle H., Jeblick W., Poten F., Blaschek W., Kauss H. (1985). Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca-dependent process. Plant Physiol. 77, 544–551.

Kourelis, J., and van der Hoorn, R.A.L. (2018). Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. Plant Cell *30*, 285–299.

Kouzai, Y., Nakajima, K., Hayafune, M., Ozawa, K., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., and Nishizawa, Y. (2014). CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers. Plant Mol. Biol. *84*, 519–528.

Kuchitsu K., Kikuyama M., Shibuya N. (1993). *N*-Acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. Protoplasma 174, 79–81.

Kuchitsu, K., Kosaka, H., Shiga, T., and Shibuya, N. (1995). EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered byN-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. Protoplasma *188*, 138–142.

Kulik, A., Noirot, E., Grandperret, V., Bourque, S., Fromentin, J., Salloignon, P., Truntzer, C., Dobrowolska, G., Simon-Plas, F., and Wendehenne, D. (2015). Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signalling. Plant Cell Environ. *38*, 331–348.

Kunze, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. Plant cell online *16*, 3496–3507.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P.H.J., Staskawicz, B., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nat. Biotechnol. *28*, 365–369.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680–685.

Lafontaine P. J., Benhamou N. (1996). Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. radicis-lycopersici. Biocontrol. Sci. Technol. 6, 111–124

Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., and Rothstein, S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *84*, 7542–7546.

Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. *48*, 251–275.

Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. Plant Physiol. *135*, 516–529.

Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2006). Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca2+ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Free Radic. Biol. Med. *40*, 1369–1376.

Langner, T., Kamoun, S., and Belhaj, K. (2018). CRISPR Crops: Plant Genome Editing Toward Disease Resistance. Annu. Rev. Phytopathol. *56*, 479–512.

Lawton, K. (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. Mol. Plant. Microbe Interact. *8*, 863.

LeBlanc, C., Zhang, F., Mendez, J., Lozano, Y., Chatpar, K., Irish, V.F., and Jacob, Y. (2018). Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR-Cas9 in plants using heat stress. Plant J. Cell Mol. Biol. *93*, 377–386.

Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. Plant Cell *14*, 2627–2641.

Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. New Phytol. *171*, 249–269.

Lee, W.-S., Rudd, J.J., Hammond-Kosack, K.E., and Kanyuka, K. (2014). *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *27*, 236–243.

Lemarié, S., Robert-Seilaniantz, A., Lariagon, C., Lemoine, J., Marnet, N., Levrel, A., Jubault, M., Manzanares-Dauleux, M.J., and Gravot, A. (2015). Camalexin contributes to the partial resistance of *Arabidopsis thaliana* to the biotrophic soilborne protist *Plasmodiophora brassicae*. Front. Plant Sci. *6*.

Lehti-Shiu, M.D., Zou, C., Hanada, K., and Shiu, S.-H. (2009). Evolutionary History and Stress Regulation of Plant Receptor-Like Kinase/Pelle Genes. Plant Physiol. *150*, 12–26.
Lherminier, J., Benhamou, N., Larrue, J., Milat, M.-L., Boudon-Padieu, E., Nicole, M., and Blein, J.-P. (2003). Cytological characterization of elicitin-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. Phytopathology *93*, 1308–1319.

Li B., Liu B., Shan C., Ibrahim M., Lou Y., Wang Y., et al. . (2014). Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on rice bacterial leaf blight and leaf streak. Pest. Manag. Sci. 69, 312–320.

Li, C., Schilmiller, A.L., Liu, G., Lee, G.I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J.J., Yagi, K., Kobayashi, Y., et al. (2005). Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. Plant Cell *17*, 971–986.

Li, J., Brader, G., and Palva, E.T. (2004). The *WRKY70* transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. Plant Cell *16*, 319–331.

Liaqat, F., and Eltem, R. (2018). Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. Carbohydr. Polym. *184*, 243–259.

Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M., and Stacey, G. (2007). Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *20*, 900–911.

Liebrand, T.W.H., van den Burg, H.A., and Joosten, M.H.A.J. (2014). Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. Trends Plant Sci. *19*, 123–132.

Lim, C.W., Baek, W., Jung, J., Kim, J.-H., and Lee, S.C. (2015). Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. Int. J. Mol. Sci. *16*, 15251–15270.

Liu, S., Wang, J., Han, Z., Gong, X., Zhang, H., and Chai, J. (2016). molecular mechanism for fungal cell wall recognition by rice chitin receptor OsCEBiP. Struct. Lond. Engl. 1993 *24*, 1192–1200.

Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., et al. (2012). Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. Science *336*, 1160–1164.

Liu, Y., Liu, D., Zhang, H., Gao, H., Guo, X., Fu, X., and Zhang, A. (2006). Isolation and characterisation of six putative wheat cell wall-associated kinases. Funct. Plant Biol. *33*, 811.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif *25*, 402–408.

Lizzi Y., Coulomb C., Polian C., Coulomb P. J., Coulomb P. O. (1998). L'algue face au Mildiou quel avenir? Phytoma 508, 29–30.

van Loon, L.C., and van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. “Samsun” and “Samsun NN”. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology *40*, 190–211.

van Loon, L.C., Bakker, P.A., and Pieterse, C.M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. *36*, 453–483.

van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. *44*, 135–162.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell *15*, 165–178.

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004). *Jasmonate-insensitive1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. Plant Cell *16*, 1938–1950.

Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. Mol. Plant. Microbe Interact. *24*, 183–193.

Luo, X., Xu, N., Huang, J., Gao, F., Zou, H., Boudsocq, M., Coaker, G., and Liu, J. (2017). A lectin receptor-like kinase mediates pattern-triggered salicylic acid signaling. Plant Physiol. *174*, 2501–2514.

Ma, P., Liu, J., Yang, X., and Ma, R. (2013). Genome-wide identification of the maize calcium-dependent protein kinase gene family. Appl. Biochem. Biotechnol. *169*, 2111–2125.

Macho, A.P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. Mol. Cell *54*, 263–272.

Maekawa, T., Kracher, B., Vernaldi, S., Ver Loren van Themaat, E., and Schulze-Lefert, P. (2012). Conservation of NLR-triggered immunity across plant lineages. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 20119–20123.

Manzoor, H., Kelloniemi, J., Chiltz, A., Wendehenne, D., Pugin, A., Poinssot, B., and Garcia-Brugger, A. (2013). Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Plant J. *76*, 466–480.

Mathieu, Y., Armen, K., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, M.D., O'Neill, M., Albersheim, P., and Darvill, A. (1991). Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. Plant J. Cell Mol. Biol. *1*, 333–343.

Melchers, L.S., Apotheker-de Groot, M., van der Knaap, J.A., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M.B., Bol, J.F., Cornelissen, B.J., van den Elzen, P.J., and Linthorst, H.J. (1994). A new class of chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. Plant J. Cell Mol. Biol. *5*, 469–480.

Mélida, H., Sopeña-Torres, S., Bacete, L., Garrido-Arandia, M., Jordá, L., López, G., Muñoz-Barrios, A., Pacios, L.F., and Molina, A. (2018). Non-branched β-1,3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in Arabidopsis. Plant J. *93*, 34–49.

Ménard R., Alban S., De Ruffray P., Jamois F., Franz G., Fritig B., et al. . (2004). *Beta*-1,3 glucan sulfate, but not *beta*-1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and Arabidopsis. Plant Cell 16, 3020–3032.

Ménard R., De Ruffray P., Fritig B., Yvin J. C., Kauffmann S. (2005). Defense and resistance-inducing activities in tobacco of the sulfated *beta*-1,3 glucan PS3 and its synergistic activities with the unsulfated molecule. Plant Cell Physiol. 46, 1964–1972.

Meng, X., and Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. Annu. Rev. Phytopathol. *51*, 245–266.

Merchante, C., Alonso, J.M., and Stepanova, A.N. (2013). Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. Curr. Opin. Plant Biol. *16*, 554–560.

Mercier L., Lafitte C., Borderies G., Briand X., Esquerré-Tugayé M. T., Fournier J. (2001). The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. New Phytol. 149, 43–51

Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. Eur. J. Cell Biol. *90*, 759–769.

Meszka, B. and Bielenin, A. (2011) Activity of laminarin in control of strawberry diseases. Phytopathologia. *62*, 15-23.

Métraux, J.P., Streit, L., and Staub, T. (1988). A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. Physiol. Mol. Plant Pathol. *33*, 1–9.

Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D., and Ausubel, F.M. (2010). Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. Plant Cell *22*, 973–990.

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

Monaghan, J., Matschi, S., Shorinola, O., Rovenich, H., Matei, A., Segonzac, C., Malinovsky, F.G., Rathjen, J.P., MacLean, D., Romeis, T., et al. (2014). The calcium-dependent protein kinase CPK28 buffers plant immunity and regulates BIK1 turnover. Cell Host Microbe *16*, 605–615.

Monaghan, J., Matschi, S., Romeis, T., and Zipfel, C. (2015). The calcium-dependent protein kinase CPK28 negatively regulates the BIK1-mediated PAMP-induced calcium burst. Plant Signal. Behav. *10*, e1018497.

Moore, J.W., Loake, G.J., and Spoel, S.H. (2011). Transcription dynamics in plant immunity. Plant Cell *23*, 2809–2820.

Morales, J., Kadota, Y., Zipfel, C., Molina, A., and Torres, M.-A. (2016). The Arabidopsis NADPH oxidases *RbohD* and *RbohF* display differential expression patterns and contributions during plant immunity. J. Exp. Bot. *67*, 1663–1676.

Moscatiello, R., Mariani, P., Sanders, D., and Maathuis, F.J.M. (2006). Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. J. Exp. Bot. *57*, 2847–2865.

Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? J. Exp. Bot. *59*, 501–520.

Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.-S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in Brassica self-incompatibility signaling. Science *303*, 1516–1519.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. *15*, 473–497.

Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischnig, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A., and Glazebrook, J. (2007). Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. Plant Cell *19*, 2039–2052.

Nakagami, H., Soukupová, H., Schikora, A., Zárský, V., and Hirt, H. (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. J. Biol. Chem. *281*, 38697–38704.

Nars, A., Lafitte, C., Chabaud, M., Drouillard, S., Mélida, H., Danoun, S., Le Costaouëc, T., Rey, T., Benedetti, J., Bulone, V., et al. (2013). *Aphanomyces euteiches* cell wall fractions containing novel glucan-chitosaccharides induce defense genes and nuclear calcium oscillations in the plant host *Medicago truncatula*. PLoS ONE *8*, e75039.

Nawrath, C., and Métraux, J.P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. Plant Cell *11*, 1393–1404.

Newman, M.-A., Dow, J.M., Molinaro, A., and Parrilli, M. (2007). Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. J. Endotoxin Res. *13*, 69–84.

Nishimura, M.T. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. Science *301*, 969–972.

Nitsch, J.P., and Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. Science *163*, 85–87.

Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N., and Omori, T. (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. Plant Physiol. *110*, 387–392.

Norman-Setterblad, C., Vidal, S., and Palva, E.T. (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from Erwinia carotovora. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *13*, 430–438.

Nozue, M., Tomiyama, K., and Doke, N. (1977). Effect of blasticidin S on development of potential of potato tuber cells to react hypersensitively to infection by *Phytophthora infestans*. Physiol. Plant Pathol. *10*, 181–189.

Ono, E., Wong, H.L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., and Shimamoto, K. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 759–764.

Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., and Sano, H. (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. *42*, 479–488.

Ordon, J., Gantner, J., Kemna, J., Schwalgun, L., Reschke, M., Streubel, J., Boch, J., and Stuttmann, J. (2017). Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. Plant J. *89*, 155–168.

Panabières, F., Ponchet, M., Allasia, V., Cardin, L., and Ricci, P. (1997). Characterization of border species among *Pythiaceae*: several *Pythium* isolates produce elicitins, typical proteins from *Phytophthora spp*. Mycol. Res. *101*, 1459–1468.

Paparella, C., Savatin, D.V., Marti, L., De Lorenzo, G., and Ferrari, S. (2014). The Arabidopsis LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE3 regulates the cross talk between immunity and abscisic acid responses. PLANT Physiol. *165*, 262–276.

Paris, F., Krzyżaniak, Y., Gauvrit, C., Jamois, F., Domergue, F., Joubès, J., Ferrières, V., Adrian, M., Legentil, L., Daire, X., et al. (2015). An ethoxylated surfactant enhances the penetration of the sulfated laminarin through leaf cuticle and stomata, leading to increased induced resistance against grapevine downy mildew. Physiol. Plant. *156*, 338–350.

Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., and Mauch, F. (2007). Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. Plant J. Cell Mol. Biol. *49*, 159–172.

Patier P., Potin P., Rochas C., Kloareg B., Yvin J. C., Liénart Y. (1995). Free and silica-bound oligokappa-carrageenans elicit laminarase activity in *Rubus* cells and protoplasts. Plant Sci. 110, 27–35 10.1016/0168-9452(95)04182-T

Pauly, M., and Keegstra, K. (2016). Biosynthesis of the plant cell wall matrix polysaccharide xyloglucan. Annu. Rev. Plant Biol. *67*, 235–259.

Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. Plant J. Cell Mol. Biol. *20*, 629–639.

Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A.C., Chico, J.M., Bossche, R.V., Sewell, J., Gil, E., et al. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. Nature *464*, 788–791.

Pavlova ZN, N.A. L, V.A. V, Muromtsev GS, Usov AI, Shibaev VN (1996) Xyloglucan oligosaccharins as elicitors of plant defense responses. Russian Journal of Plant Physiology 43: 242-246

Pearce R. B., Ride J. P. (1982). Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. Physiol. Plant Pathol. 20, 119–123

Peña, M.J., Darvill, A.G., Eberhard, S., York, W.S., and O'Neill, M.A. (2008). Moss and liverwort xyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. Glycobiology *18*, 891–904.

Peña, M.J., Kong, Y., York, W.S., and O'Neill, M.A. (2012). A galacturonic acid-containing xyloglucan is involved in Arabidopsis root hair tip growth. Plant Cell *24*, 4511–4524.

Peng, K.-C., Wang, C.-W., Wu, C.-H., Huang, C.-T., and Liou, R.-F. (2015). Tomato SOBIR1/EVR homologs are involved in elicitin perception and plant defense against the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica.* Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *28*, 913–926.

Petutschnig, E.K., Jones, A.M.E., Serazetdinova, L., Lipka, U., and Lipka, V. (2010). The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. J. Biol. Chem. *285*, 28902–28911.

Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. and Richter H. (2004) Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility nd disease development. Vitis 43 (2), 145–148.

Pieterse, C.M., and van Loon LC, (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends Plant Sci. *4*, 52–58.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat. Chem. Biol. *5*, 308–316.

Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. Plant Cell *10*, 1571–1580.

Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *28*, 489–521.

Pietraszewska-Bogiel, A., Lefebvre, B., Koini, M.A., Klaus-Heisen, D., Takken, F.L.W., Geurts, R., Cullimore, J. V., Gadella, T.W.J., Masson-Boivin, C., Giraud, E., et al. (2013). Interaction of *Medicago truncatula* lysin motif receptor-like kinases, NFP and LYK3, produced in *Nicotiana benthamiana* induces defence-like responses. PLoS ONE *8*, e65055.

Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P., and Pugin, A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. Mol. Plant. Microbe Interact. *16*, 553–564.

Potin P., Bouarab K., Kupper F., Kloareg B. (1999). Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. Curr. Opin. Microbiol. 2, 276–283. 10.1016/S1369-5274(99)80048-4

Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Kapetis, D., Zolezzi, F., Piaggesi, A., and Perata, P. (2011). Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. J. Plant Res. *124*, 619–629.

Pozo, M.J., and Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Curr. Opin. Plant Biol. *10*, 393–398.

Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in Tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. Plant Cell *9*, 2077–2091.

Qu, X., Hall, B.P., Gao, Z., and Schaller, G.E. (2007). A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on Arabidopsis plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. BMC Plant Biol. *7*, 3.

Rai, M.K., Shekhawat, N.S., Harish, Gupta, A.K., Phulwaria, M., Ram, K., and Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC *106*, 179–190.

Randoux, B., Renard-Merlier, D., Duyme, F., Sanssené, J., Courtois, J., Durand, R., and Reignault, P. (2009). Oligogalacturonides induce resistance in wheat against powdery mildew. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. *74*, 681–685.

Ranf, S., Wünnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D., and Dietrich, P. (2008). Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca^{2+} signals induced by abiotic and biotic stresses. Plant J. Cell Mol. Biol. *53*, 287–299.

Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A., Sánchez-Carballo, P.M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J., et al. (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana.* Nat. Immunol. *16*, 426–433.

Rasul, S., Dubreuil-Maurizi, C., Lamotte, O., Koen, E., Poinssot, B., Alcaraz, G., Wendehenne, D., and Jeandroz, S. (2012). Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ. *35*, 1483–1499.

Rauhut, T., and Glawischnig, E. (2009). Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. Phytochemistry *70*, 1638–1644.

Reignault, P., Cogan, A., Muchembled, J., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Durand, R., and Sancholle, M. (2002). Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. New Phytol. *149*, 519–529.

Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S., and Liang, Z. (2016). CRISPR-Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). Sci. Rep. *6*, 32289.

Ren, D., Yang, H., and Zhang, S. (2002). Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. J. Biol. Chem. *277*, 559–565.

Ren, D., Liu, Y., Yang, K.-Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., and Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 5638–5643.

Renard-Merlier D., Randoux B., Nowak E., Farcy F., Durand R., Reignault P. (2007). Iodus 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. Phytochemistry 68, 1156–1164. 10.1016/j.phytochem.2007.02.011

Rentel, M.C. (2004). Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. Plant Physiol. *135*, 1471–1479.

Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., and Pernollet, J.C. (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. Eur. J. Biochem. *183*, 555–563.

Ricroch, A., Clairand, P., and Harwood, W. (2017). Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. Emerg. Top. Life Sci. *1*, 169–182.

Robatzek, S., Bittel, P., Chinchilla, D., Köchner, P., Felix, G., Shiu, S.-H., and Boller, T. (2007). Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. Plant Mol. Biol. *64*, 539–547.

Robertsen, B. (1986). Elicitors of the production of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls. Physiol. Mol. Plant Pathol. *28*, 137–148.

Roby, D., Gadelle, A., and Toppan, A. (1987). Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. *143*, 885–892.

Rodriguez-Moreno, L., Song, Y., and Thomma, B.P. (2017). Transfer and engineering of immune receptors to improve recognition capacities in crops. Curr. Opin. Plant Biol. *38*, 42–49.

Rogers, E.E., and Ausubel, F.M. (1997). Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in *PR-1* gene expression. Plant Cell *9*, 305–316.

Romeiro, R.S., and Kimura, O. (1997). Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified bacterial elicitors from *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. J. Phytopathol. *145*, 495–498.

Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F.G., Tör, M., de Vries, S., and Zipfel, C. (2011). The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. Plant Cell *23*, 2440–2455.

Saga, H., Ogawa, T., Kai, K., Suzuki, H., Ogata, Y., Sakurai, N., Shibata, D., and Ohta, D. (2012). Identification and characterization of ANAC042, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in Arabidopsis. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *25*, 684–696.

Sagi, M. & Fluhr R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. Plant Physiol. *141*, 336–340.

Salvador, P., Lasserre, T. (2010) Process for increasing plants resistance to an abiotic stress. In USPAU 20100304975, ed, United States Patent Application US 20100304975 Ed A01N 43/16 20060101 A01N043/16; A01P 21/00 20060101 A01P021/00. ELICITYL, Crolle, FR, pp 1-8

Sangha J. S., Ravichandran S., Prithiviraj K., Critchley A. T., Prithiviraj B. (2010). Sulfated macroalgal polysaccharides λ-carrageenan and λ-carrageenan differentially alter *Arabidopsis thaliana* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 75, 38–45

Santos, H.P. d. (2004). The control of storage xyloglucan mobilization in cotyledons of *Hymenaea courbaril*. Plant Physiol. *135*, 287–299.

Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. Annu. Rev. Plant Biol. *61*, 263–289.

Schlaeppi, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F., and Reymond, P. (2008). The glutathione-deficient mutant *pad2-1* accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. Plant J. Cell Mol. Biol. *55*, 774–786.

Schlaeppi, K., Abou-Mansour, E., Buchala, A., and Mauch, F. (2010). Disease resistance of Arabidopsis to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. Plant J. Cell Mol. Biol. *62*, 840–851.

Schluepmann, H. (2004). Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. PLANT Physiol. *135*, 879–890.

Schnee, S., Viret, O., and Gindro, K. (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. Physiol. Mol. Plant Pathol. *72*, 128–133.

Schultink, A., Liu, L., Zhu, L., and Pauly, M. (2014). Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents. Plants *3*, 526–542.

Schwessinger, B., Bahar, O., Thomas, N., Thomas, N., Holton, N., Nekrasov, V., Ruan, D., Canlas, P.E., Daudi, A., Petzold, C.J., et al. (2015). Transgenic expression of the dicotyledonous pattern recognition receptor EFR in rice leads to ligand-dependent activation of defense responses. PLoS Pathog. *11*, e1004809.

Schwessinger, B., Roux, M., Kadota, Y., Ntoukakis, V., Sklenar, J., Jones, A., and Zipfel, C. (2011). Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. PLoS Genet. *7*, e1002046

Sharp, J.K., Valent, B., and Albersheim, P. (1984). Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. J. Biol. Chem. *259*, 11312–11320.

Sharp, R. (2013). A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. Agronomy *3*, 757–793.

Shibuya, N., and Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. Physiol. Mol. Plant Pathol. *59*, 223–233.

Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., et al. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. Plant J. Cell Mol. Biol. *64*, 204–214.

Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H., and Shibuya, N. (2012). Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in Arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. Plant Cell Physiol. *53*, 1696–1706.

Shiu, S.-H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.-H., Mayer, K.F.X., and Li, W.-H. (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. Plant Cell *16*, 1220–1234.

Shukla, P.S., Borza, T., Critchley, A.T., and Prithiviraj, B. (2016). Carrageenans from red seaweeds as promoters of growth and elicitors of defense response in plants. Front. Mar. Sci. *3*.

Shumayla, null, Sharma, S., Pandey, A.K., Singh, K., and Upadhyay, S.K. (2016). Molecular characterization and global expression analysis of lectin receptor kinases in Bread Wheat (*Triticum aestivum*). PloS One *11*, e0153925.

Simon-Plas, F., Rusterucci, C., Milat, M.-L., Humbert, C., Montillet, J.-L., and Blein, J.-P. (1997). Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. Plant Cell Environ. *20*, 1573–1579.

Singh, P., and Zimmerli, L. (2013). Lectin receptor kinases in plant innate immunity. Front. Plant Sci. *4*, 124.

Slováková, L., Lišková, D., Capek, P., Kubačková, M., Kákoniová, D., and Karácsonyi, Š. (2000) Defence responses against TNV infection induced by galactoglucomannan-derived oligosaccharides in cucumber cells. European Journal of Plant Pathology, vol. 106, no. 6, pp. 543–553.

Somerville, C. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. Science *306*, 2206–2211.

Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., and Hahlbrock, K. (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 2427–2430.

Souza, C. de A., Li, S., Lin, A.Z., Boutrot, F., Grossmann, G., Zipfel, C., and Somerville, S.C. (2017). Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. Plant Physiol. *173*, 2383–2398.

Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., et al. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell *15*, 760–770.

Staats, M. (2004). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. Mol. Biol. Evol. *22*, 333–346.

Stadnik, M.J., and Freitas, M.B. de (2014). Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. Trop. Plant Pathol. *39*, 111–118.

Staswick, P.E., and Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. Plant Cell *16*, 2117–2127.

Steimetz E., Trouvelot S., Gindro K., Bordier A., Poinssot B. T., Adrian M., et al. (2012). Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 79, 89–96 10.1016/j.pmpp.2012.05.004

Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. *35*, 235–270.

Stintzi, A., and Browse, J. (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 10625–10630.

Stüobler, D., and Buchenauer, H. (1996). Antiviral activity of the glucan lichenan (Poly-β(→ 3,1 → 4)D-anhydroglucose).: 2. Studies on the Mode of Action. J. Phytopathol. *144*, 45–52.

Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, J., Liu, G., and Ren, D. (2011). Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell *23*, 364–380.

Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., and Krysan, P.J. (2007). MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. Plant Physiol. *143*, 661–669.

Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H., and Shimamoto, K. (2002). The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 13307–13312.

Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., and Bent, A.F. (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris pv* campestris and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. Plant Cell *18*, 764–779.

Sun, Y., Li, L., Macho, A.P., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J.-M., and Chai, J. (2013). Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. Science *342*, 624–628.

Takai, R., Isogai, A., Takayama, S., and Che, F.-S. (2008). Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *21*, 1635–1642.

Takeda, T., Furuta, Y., Awano, T., Mizuno, K., Mitsuishi, Y., and Hayashi, T. (2002). Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 9055–9060.

Tayeh, C., Randoux, B., Tisserant, B., Khong, G., Jacques, P., and Reignault, P. (2015). Are ineffective defence reactions potential target for induced resistance during the compatible wheat-powdery mildew interaction? Plant Physiol. Biochem. PPB *96*, 9–19.

Teixeira, M.A., Rajewski, A., He, J., Castaneda, O.G., Litt, A., and Kaloshian, I. (2018). Classification and phylogenetic analyses of the Arabidopsis and tomato G-type lectin receptor kinases. BMC Genomics *19*.

Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus L.*) seeds. J. Biol. Chem. *267*, 15301–15309.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. Nature *448*, 661–665.

Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 15107–15111.

Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K., and Broekaert, W.F. (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. Plant J. Cell Mol. Biol. *19*, 163–171.

Thorpe, G.H., and Kricka, L.J. (1986). Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. Methods Enzymol. *133*, 331–353.

Ton, J., Davison, S., Van Wees, S.C., Van Loon, L., and Pieterse, C.M. (2001). The Arabidopsis *ISR1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. Plant Physiol. *125*, 652–661.

Tordai, H., Bányai, L., and Patthy, L. (1999). The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. FEBS Lett. *461*, 63–67.

Torres, M.A., and Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. Curr. Opin. Plant Biol. *8*, 397–403.

Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 517–522.

Trapet, P., Kulik, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Rosnoblet, C., Besson-Bard, A., and Wendehenne, D. (2015). NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. Phytochemistry *112*, 72–79.

Trdà, L., Boutrot, F., Claverie, J., Brulé, D., Dorey, S., and Poinssot, B. (2015). Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. Front. Plant Sci. *6*.

Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S., et al. (2014). The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. New Phytol. *201*, 1371–1384.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., and Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol. *114*, 405–413.

Trouvelot, S., Varnier, A.-L., Allègre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.-M., Pugin, A., et al. (2008). A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *21*, 232–243.

Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdà, L., Daire, X., and Adrian, M. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. Front. Plant Sci. *5*, 592.

Tuomivaara, S.T., Yaoi, K., O'Neill, M.A., and York, W.S. (2015). Generation and structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides, including an update on xyloglucan nomenclature. Carbohydr. Res. *402*, 56–66.

Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. Front. Plant Sci. *3*, 85.

Vaid, N., Pandey, P.K., and Tuteja, N. (2012). Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from Arabidopsis and rice. Plant Mol. Biol. *80*, 365–388.

Vaid, N., Macovei, A., and Tuteja, N. (2013). Knights in action: lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. Mol. Plant *6*, 1405–1418.

Valent, B.S., and Albersheim, P. (1974). The structure of plant cell walls: On the binding of xyloglucan to cellulose fibers. Plant Physiol. *54*, 105–108.

Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M.C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Korbes, A.P., Memelink, J., Ritsema, T., et al. (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. Plant Cell *25*, 744–761.

Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M.G., Pel, M.J.C., Joosten, R.G., Proveniers, M.C.G., Van Loon, L.C., Ton, J., et al. (2008). *MYB72* is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. Plant Physiol. *146*, 1293–1304.

Van Loon, L.C. (1982). Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defence against virus infection. In Active Defense Mechanisms in Plants, R.K.S. Wood, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 247–273.

Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. *55*, 85–97.

Van Oosten, V.R., Bodenhausen, N., Reymond, P., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Dicke, M., and Pieterse, C.M.J. (2008). Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in Arabidopsis. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *21*, 919–930.

van Wees, S.C., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. Plant Mol. Biol. *41*, 537–549.

Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentéjac, M., and Pugin, A. (2006). Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *19*, 429–440.

Varnier, A.-L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., Renault, J.-H., Kauffmann, S., Pugin, A., et al. (2009). Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. Plant Cell Environ. *32*, 178–193.

Vasil'ev L. A., Dzyubinskaya E. V., Zinovkin R. A., Kiselevsky D. B., Lobysheva N. V., Samuilov V. D. (2009). Chitosan-induced programmed cell death in plants. Biochemistry (Moscow) 74, 1035–1043.

Vasyukova N. I., Zinov'eva S. V., Il'inskaya L. I., Perekhod E. A., Chalenko G. I., Gerasimova N. G., et al. . (2001). Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. App. Biochem. Microbiol. 37, 103–109.

Vera J., Castro J., Contreras R. A., GonzÃlez A., Moenne A. (2012). Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (*var. Xanthi*). Physiol. Mol. Plant Pathol. 79, 31–39

Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., and Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. Mar. Drugs *9*, 2514–2525.

Vera, P., and Conejero, V. (1988). Pathogenesis-related proteins of tomato : p-69 as an alkaline endoproteinase. Plant Physiol. *87*, 58–63.

Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *17*, 895–908.

Verica, J.A., and He, Z.-H. (2002). The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. Plant Physiol. *129*, 455–459.

Verica, J.A., Chae, L., Tong, H., Ingmire, P., and He, Z.-H. (2003). Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like kinase genes in Arabidopsis. Plant Physiol. *133*, 1732–1746.

Vierhuis, E., York, W.S., Kolli, V.S., Vincken, J., Schols, H.A., Van Alebeek, G.W., and Voragen, A.G. (2001). Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. Carbohydr. Res. *332*, 285–297.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annu. Rev. Phytopathol. *47*, 177–206.

Vo, T.-S., Ngo, D.-H., Kang, K.-H., Jung, W.-K., and Kim, S.-K. (2015). The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. Mol. Nutr. Food Res. *59*, 129–138.

Vogel, J., and Somerville, S. (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 1897–1902.

Vorhölter, F.-J., Wiggerich, H.-G., Scheidle, H., Sidhu, V.K., Mrozek, K., Küster, H., Pühler, A., and Niehaus, K. (2012). Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris pv. campestris* pectate lyases. BMC Microbiol. *12*, 239.

Wagner, T.A., and Kohorn, B.D. (2001). Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. Plant Cell *13*, 303–318.

Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S. -y., Stacey, M.G., and Stacey, G. (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. PLANT CELL ONLINE *20*, 471–481.

Wan, J., Tanaka, K., Zhang, X.-C., Son, G.H., Brechenmacher, L., Nguyen, T.H.N., and Stacey, G. (2012). LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis. PLANT Physiol. *160*, 396–406.

Wang, C., Wang, G., Zhang, C., Zhu, P., Dai, H., Yu, N., He, Z., Xu, L., and Wang, E. (2017). OsCERK1-mediated chitin perception and immune signaling requires receptor-like cytoplasmic kinase 185 to Activate an MAPK cascade in Rice. Mol. Plant *10*, 619–633.

Wang, F., Feng, G., and Chen, K. (2009). Burdock fructooligosaccharide induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco seedlings. Physiol. Mol. Plant Pathol. *74*, 34–40.

Wang, K.L.-C., Li, H., and Ecker, J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. Plant Cell *14 Suppl*, S131-151.

Wang, W., Li, S., Zhao, X., Du, Y., and Lin, B. (2008). Oligochitosan induces cell death and hydrogen peroxide accumulation in tobacco suspension cells. Pestic. Biochem. Physiol. *90*, 106–113.

Wang, X., Tu, M., Wang, D., Liu, J., Li, Y., Li, Z., Wang, Y., and Wang, X. (2018). CRISPR-Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. Plant Biotechnol. J. *16*, 844–855.

Wang, Y., Weide, R., Govers, F., and Bouwmeester, K. (2015). L-type lectin receptor kinases in *Nicotiana benthamiana* and tomato and their role in *Phytophthora* resistance. J. Exp. Bot. *66*, 6731–6743.

Wasternack, C., and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. Ann. Bot. *111*, 1021–1058.

van Wees, S.C., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. Plant Mol. Biol. *41*, 537–549.

Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V., and Thordal-Christensen, H. (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Mol. Biol. *36*, 101–112.

Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., and Beer, S.V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science *257*, 85–88.

Weinberger, F., Friedlander, M., and Hoppe, H.-G. (1999). Oligoagars elicit a physiological response in *gracilaria conferta* (rhodophyta). J. Phycol. *35*, 747–755.

Wendehenne, D. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. Plant cell online *14*, 1937–1951.

Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.-M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. Plant Cell *14*, 1937–1951.

Whitney, S.E.C., Wilson, E., Webster, J., Bacic, A., Reid, J.S.G., and Gidley, M.J. (2006). Effects of structural variation in xyloglucan polymers on interactions with bacterial cellulose. Am. J. Bot. *93*, 1402–1414.

Wiesel, L., Newton, A.C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E.M., Birch, P.R.J., and Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. Front. Plant Sci. *5*, 655.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature *414*, 562–565.

Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.-A., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J.-J., Cullimore, J.V., et al. (2011). Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 19824–19829.

Wu, Y., and Zhou, J.-M. (2013). Receptor-like kinases in plant innate immunity: RLKs in plant innate immunity. J. Integr. Plant Biol. *55*, 1271–1286.

Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., and Akatsuka, T. (1993). Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetyl-chitooligosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem. *57*, 405–409.

Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K., Ishihama, N., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Tsuge, S., et al. (2013). A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. Cell Host Microbe *13*, 347–357.

Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., and Shibuya, N. (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. Plant Cell *12*, 817–826.

Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E.E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. Plant Cell *19*, 2470–2483.

Yin, K., Gao, C., and Qiu, J.-L. (2017). Progress and prospects in plant genome editing. Nat. Plants *3*, 17107.

York, W.S., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1984). Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. Plant Physiol. *75*, 295–297.

Yu, X., Feng, B., He, P., and Shan, L. (2017). From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. Annu. Rev. Phytopathol. *55*, 109–137.

Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 15811–15816.

Zhang, L., Kars, I., Essenstam, B., Liebrand, T.W.H., Wagemakers, L., Elberse, J., Tagkalaki, P., Tjoitang, D., van den Ackerveken, G., and van Kan, J.A.L. (2014). Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the arabidopsis receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. Plant Physiol. *164*, 352–364.

Zhang, P., Foerster, H., Tissier, C.P., Mueller, L., Paley, S., Karp, P.D., and Rhee, S.Y. (2005). MetaCyc and AraCyc. Metabolic pathway databases for plant research. Plant Physiol. *138*, 27–37.

Zhang, X., Zhou, Y., Li, Y., Fu, X., and Wang, Q. (2017). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. Crop Prot. *96*, 173–179.

Zhang, Z., Collinge, D.B., and Thordal-Christensen, H. (1995). Germin-like oxalate oxidase, a H_2O_2-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant J. *8*, 139–145.

Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., and Glazebrook, J. (1998). *PAD4* functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. Plant Cell *10*, 1021–1030.

Zhou, N., Tootle, T.L., and Glazebrook, J. (1999). Arabidopsis *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. Plant Cell *11*, 2419–2428.

Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A, M., Jiang, Z., Kim, J.-M., To, T.K., Li, W., et al. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (*EIN3/EIL1*) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 12539–12544.

Zimmerli, L., Métraux, J.P., and Mauch-Mani, B. (2001). Beta-aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. *126*, 517–523.

Zuo, R., Hu, R., Chai, G., Xu, M., Qi, G., Kong, Y., and Zhou, G. (2013). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (Populus trichocarpa). Mol. Biol. Rep. *40*, 2645–2662.

Zuppini, A., Baldan, B., Millioni, R., Favaron, F., Navazio, L., and Mariani, P. (2004). Chitosan induces Ca^{2+} -mediated programmed cell death in soybean cells. New Phytol. *161*, 557–568.

RÉSUMÉ

L'activation des réponses immunitaires des plantes repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (aussi appelés PAMP) par des récepteurs de l'immunité, également nommés PRR (*pattern recognition receptors*). La chitine, principal composant de la paroi des champignons, est un PAMP bien caractérisé qui induit des réponses de défense aussi bien chez les mammifères que chez les plantes.

La première partie de cette étude met en évidence que deux chito-oligosaccharides, la chitine et le chitosan, agissent comme des PAMP chez la vigne (*Vitis vinifera*) puisqu'ils induisent des évènements précoces de signalisation, l'expression de gènes de défense et une résistance contre des agents pathogènes. Ces résultats suggèrent que des systèmes de perception existent chez la vigne. Une analyse phylogénétique a permis d'identifier trois récepteurs kinases à domaine LysM (LysM-RK ou LYK) chez *V. vinifera* (VvLYK1-1, -2, -3) appartenant au même clade que le récepteur à la chitine chez Arabidopsis et nommé AtCERK1 (*Arabidopsis thaliana Chitin Elicitor Receptor Kinase 1*). Leur analyse fonctionnelle a été réalisée par complémentation du mutant d'Arabidopsis *Atcerk1*, affecté dans la perception de la chitine. Nos résultats montrent que VvLYK1-1 et VvLYK1-2, mais pas VvLYK1-3, complémentent fonctionnellement le mutant *Atcerk1* en restaurant l'activation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et l'expression de gènes de défense induits par les chito-oligosaccharides. De plus, l'expression de VvLYK1-1 chez *Atcerk1* restaure la résistance basale à l'agent de l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*).

La seconde partie du projet s'est focalisée sur les éliciteurs oligosaccharidiques de type « *damage-associated molecular patterns* (DAMP) ». Ces molécules endogènes peuvent provenir de la dégradation de la paroi lors d'une attaque et sont capables d'activer les réponses immunitaires de la plante. Les DAMP les mieux caractérisés actuellement sont les oligogalacturonates (OG), des fragments de pectine qui induisent des réponses immunitaires chez de nombreuses espèces végétales dont l'activation de MAPK, la production d'H_2O_2, l'expression de gènes de défense et le dépôt de callose. Nous avons montré dans cette étude que les xyloglucanes (Xh), des fragments d'hémicellulose pariétale purifiés, induisaient l'activation de MAPK et l'expression de gènes de défense chez la vigne et Arabidopsis, afin d'induire une résistance contre le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Les Xh induisent également la production de resvératrol, une phytoalexine majoritaire chez la vigne, et un dépôt de callose chez Arabidopsis. Par une approche génétique, nous avons identifié certains composants de la signalisation induite par les Xh chez Arabidopsis. L'utilisation de mutants suggère que la résistance induite par les Xh *contre B. cinerea* est dépendante des voies de la camalexine, de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène chez Arabidopsis. De manière globale, nos résultats mettent en lumière que les xyloglucanes peuvent être considérés comme de nouveaux éliciteurs de l'immunité chez la vigne et Arabidopsis.

ABSTRACT

Activation of the plant immune responses requires recognition of common pathogen-associated molecular pattern (PAMP) by their cognate pattern recognition receptors (PRR). Chitin, a major component of fungal cell walls, is a well-known PAMP that triggers defense responses in several mammal and plant species.

In the first part of this study, we show that two chitooligosaccharides, chitin and chitosan, act as PAMPs in grapevine (*Vitis vinifera*) as they elicit immune signaling events, defense gene expression, and resistance against pathogens. These two PAMPs are active in grapevine suggesting that at least one perception system exists. Phylogenetic analysis clearly distinguished three *V. vinifera* LysM Receptor Kinases (VvLYK1-1, -2, -3) located in the same clade as the Arabidopsis Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (AtCERK1), which mediates chitin-induced immune responses. Their functional characterization was achieved by complementation assays in the *Atcerk1* mutant, impaired in chitin perception. Our results provide evidence that VvLYK1-1 and VvLYK1-2, but not VvLYK1-3, functionally complement the loss of AtCERK1 function by restoring chitooligosaccharide-induced MAPK activation and immune gene expression. Moreover, expression of VvLYK1-1 in *Atcerk1* restored penetration resistance to the non-adapted grapevine powdery mildew (Erysiphe necator).

The second part of this study focused on damaged-associated molecular patterns (DAMP), endogenous molecules that can be released from the plant cell wall during an attack and activate the plant innate immunity. Until now, the best characterized DAMPs are oligogalacturonides (OG) coming from pectin fragments that induce innate immune responses in various plant species, including MAPK activation, H_2O_2 production, defense gene expression and callose deposition. In this study, we showed that purified xyloglucans (Xh), derived from the plant cell wall hemicellulose, elicit MAPK activation and immune gene expression in grapevine (*V. vinifera*) and Arabidopsis to trigger induced resistance against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. Xh also elicit the production of resveratrol, the main grapevine phytoalexin, and callose deposition in Arabidopsis. Using a genetic approach, we identified some signaling components of Xh-induced immunity. The use of Arabidopsis mutants suggests that Xh-induced resistance against *B. cinerea* is dependent on the camalexin, salicylate, jasmonate and ethylene pathways. Taken together, our data highlight that Xh can be considered as new elicitors of grapevine and Arabidopsis immunity.